

Aus dem
CharitéCentrum für Diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel

Habilitationsschrift

Molekulare Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen kommensaler Darmmikrobiota und Wirtsimmunität bei intestinalen Entzündungen der Maus

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
Für das Fach Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Markus M. Heimesaat

Eingereicht: November 2014
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grütters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Buer
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Bärbel Stecher

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die kommensale Darmmikrobiota.....	1
1.2. Das Wechselspiel zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirtsimmunität.....	2
1.3. Die Wechselwirkungen von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems mit der Mikrobiota.....	8
1.4. Induktion von Immunpathologien des Darms infolge gestörter Hämöostase von Darmmikrobiota und Wirtsimmunität.....	12
1.5. Experimentelle Modelle für Darmentzündungen des Menschen.....	14
1.5.1. Modell der akuten <i>Toxoplasma gondii</i> -induzierten Ileitis.....	14
1.5.2. Modell der akuten DSS-Kolitis.....	14
1.5.3. Modell der akuten <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierten Enteritis.....	15
1.6. Zielsetzungen.....	16
2. EIGENE ARBEITEN.....	17
2.1. Die Rolle von Gram-negativen bakteriellen Spezies im akuten <i>T. gondii</i> -induzierten Ileitismodell.....	17
2.2. Verstärkung der akuten <i>T. gondii</i> -induzierten Ileitis durch die von TLR-4 abhängige Signalantwort auf das Lipopolysaccharid kommensaler <i>E. coli</i>	30
2.3. Einfluß von Mikrobiotaveränderungen auf den Schweregrad der akuten Kolitis der Maus in Abhängigkeit von TLR-2 und -4.....	40
2.4. Anstieg intestinaler Konzentrationen von biologisch aktiven TLR-2, -4 und -5 Liganden bei akuter Ileitis und Kolitis der Maus.....	49
2.5. Wechselwirkungen zwischen <i>Campylobacter jejuni</i> , der kommensalen Darmmikrobiota und dem Immunsystem der Maus.....	60
3. DISKUSSION.....	75
3.1. Dysbiosis - Die Rolle von Gram-negativen Spezies der kommensalen Darmmikrobiota in verschiedenen Darmentzündungs-Modellen.....	75
3.2. Die Rolle von Rezeptoren der angeborenen Immunität bei der Vermittlung von Darmentzündungen.....	82
3.3. Florenverschiebungen bei Patienten mit Darmentzündungen.....	85
3.4. Ausblick: Bakterien der Mikrobiota als Zielstrukturen für innovative Therapie von Darmentzündungen.....	87
4. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
Danksagung.....	107
Erklärung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

AIEC.....	Adhärente Invasive <i>E. coli</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
CED.....	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
DCs.....	Dendritische Zellen
DSS.....	Dextransodiumsulphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FISH.....	„Fluorescent <i>in situ</i> hybridization“
Fpr.....	N-Formyl Peptid Rezeptor
GvHD.....	„Graft-versus-Host Disease“
HEK.....	„Human embryonic kidney“
IECs.....	Intraepitheliale Zellen
IEL.....	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN.....	Interferon
Ig.....	Immunglobulin
ILCs.....	„Innate lymphoid cells“
iODN.....	inhibitorisches Oligonukleotid
LPS.....	Lipopolysaccharid
M. Cohn.....	Morbus Crohn
MLNs.....	Mesenteriale Lymphknoten
MyD88.....	„Myeloid differentiation primary response gene 88“
NF- κ B.....	„Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
NLRs.....	„NOD-like receptors“
NO.....	Stickstoffoxid
NOD.....	„Nucleotide-binding oligomerization domain“
PAMP.....	„Pathogen-associated molecular patterns“
PP.....	„Peyer's patches“
PRR.....	„Pattern recognition receptor“
RAPD-PCR.....	„Random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction“
SFB.....	Segmentierte filamentöse Bakterien
Sog.	Sogenante
TGF.....	„Transforming growth factor“
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th1/2.....	T-Helferzellen Typ 1/2
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
TOLLIP.....	„Toll-interacting protein“
TLR.....	„Toll-like-Rezeptor“
Tregs.....	regulatorische T-Zellen
TRIF.....	„TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “

1. EINLEITUNG

Jedes Individuum kommt aus der Sterilität der Gebärmutter heraus nackt und frei von Mikroorganismen auf die Welt. Dieser sterile Zustand ist aber nur von kurzer Dauer. Durch den Geburtsakt wird das Neugeborene der mütterlichen Mikrobiota exponiert. In deren Folge kommt es zur Kolonisierung des mukosalen Gewebes des Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltraktes sowie der Haut mit einer komplexen Mikrobiota [1]. Dabei besteht ein fein justiertes und dynamisches Wechselspiel zwischen der Mikrobiota und dem Immunsystem des Wirtes, das sich im Zuge der von Millionen von Jahren bestehenden Ko-Evolution von Mikroorganismen und Vertebraten entwickelt hat [1]. Die Tragweite dieses Mutualismus wird insbesondere im Gastrointestinaltrakt deutlich, in dem die Mikrobiota in größter Menge und Diversität auf den Wirt trifft.

1.1. Die kommensale Darmmikrobiota

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen wird von mehr als 10^{14} Bakterien besiedelt, wobei die Gesamtbakterienlast von proximalen zu distalen Abschnitten zunimmt [2, 3]. Die geschätzte Anzahl der unterschiedlichen Spezies variiert erheblich in Abhängigkeit von den verwendeten Analysemethoden. Mittels herkömmlicher kultureller Methoden konnten etwa 100 verschiedene bakterielle Spezies aus dem Darm des Menschen isoliert werden [2], während kulturunabhängige molekulare Verfahren die Identifizierung von bis zu 1000 Spezies ermöglichten [3-5]. Nach neuesten, auf der Sequenzierung von bakteriellen 16S rRNA beruhenden Methoden (mit Niedrig-Fehler Amplikon-Sequenzierung) machen etwa 160 Spezies die menschliche Mikrobiota aus [5]. Die Gesamtzahl aller Gene des Darmmikrobioms ist bemerkenswerterweise etwa 100-mal höher als die des gesamten menschlichen Genoms [6]. Mehr als 90% der Darmbakterien gehören zu den Phyla Firmicutes und Bacteroides, während der Rest sich auf die Phyla Proteobakterien, Actinobakterien, Verrucomicrobia und Cyanobakterien aufteilen läßt [3, 4, 6-8]. Wenngleich die Zusammensetzung der gesunden menschlichen Darmmikrobiota eher stabil ist [5, 8, 9], bestehen doch erhebliche inter-individuelle Unterschiede, die von zahlreichen unabhängigen Faktoren wie (Epi-) Genetik, Geschlecht, Diät, Umgebung und anderen beeinflusst werden [8, 10, 11]. Obgleich diätetische Änderungen wie auch

Antibiotika-Behandlungen maßgeblichen Einfluß auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota nehmen, sind diese dennoch prinzipiell reversibler Natur; dieser Umstand wird auch als Resilienz bezeichnet [12, 13]. Die Rolle von Umweltfaktoren und (Epi-) Genetik auf die Prägung der menschliche Mikrobiota wird aktuell intensiv beforscht [9, 14]. Bei monozygoten Zwillingen ist die Darmmikrobiota zwar relativ vergleichbar, aber dennoch verschiedenartig zusammengesetzt. Nicht miteinander verwandte Menschen, die in derselben Umgebung mit etwa denselben Eßgewohnheiten lebten, wiesen weniger stark ausgeprägte Ähnlichkeiten ihrer Darmmikrobiota auf [15].

1.2. Das Wechselspiel zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirtsimmunität

Das Mikrobiom des Menschen enthält zehnmal mehr Zellen als der gesamte Körper zusammen und wird daher als „Super-Organismus“ verstanden [3, 4, 6-8]. Die jeweiligen bakteriellen Spezies des Darms lassen sich hinsichtlich der funktionellen Wechselwirkung mit dem Wirt in Kommensale, Symbionten und Pathobionten unterteilen [16]. Als Symbionten bezeichnet man hierbei bakterielle Spezies, die eher gesundheitsfördernde Funktionen erfüllen, während kommensale Spezies ihren Nutzen aus dem Wirt ziehen, ohne diesem zum Vor- oder Nachteil zu gereichen. Pathobionten hingegen können unter bestimmten Bedingungen Immunpathologien induzieren [16, 17]. Die Darmmikrobiota erfüllt in ihrer Gesamtheit die wichtige Funktion der physiologischen Kolonisationsresistenz. Durch diese Barrierefunktion wird verhindert, daß Pathogene im Wettstreit um Nährstoffe und Nischen sich im Darmlumen vermehren und dauerhaft ansiedeln [18]. Weiterhin stellen Symbionten dem Wirt Energiesubstrate (z.B. kurzkettige Fettsäuren) sowie Vitamine als Endprodukte ihres bakteriellen Stoffwechsels bereit [15, 19] und sind in ihrer Komplexität maßgeblich an der Entwicklung und Reifung des mukosalen Immunsystems sowie der Induktion von Immuntoleranz beteiligt [8, 20] (Abbildung 1). So können bestimmte Spezies wie segmentierte filamentöse Bakterien (SFB) und Clostridien-Arten ein immuntolerantes und -regulierendes Milieu induzieren und aufrechterhalten, indem sowohl die Generierung von Th17- und Th1-Zellen als auch die Produktion von IgA gefördert [21-23] sowie spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege inhibiert und anti-inflammatorische Effekte in der Darmmukosa erzielt werden [24-26].

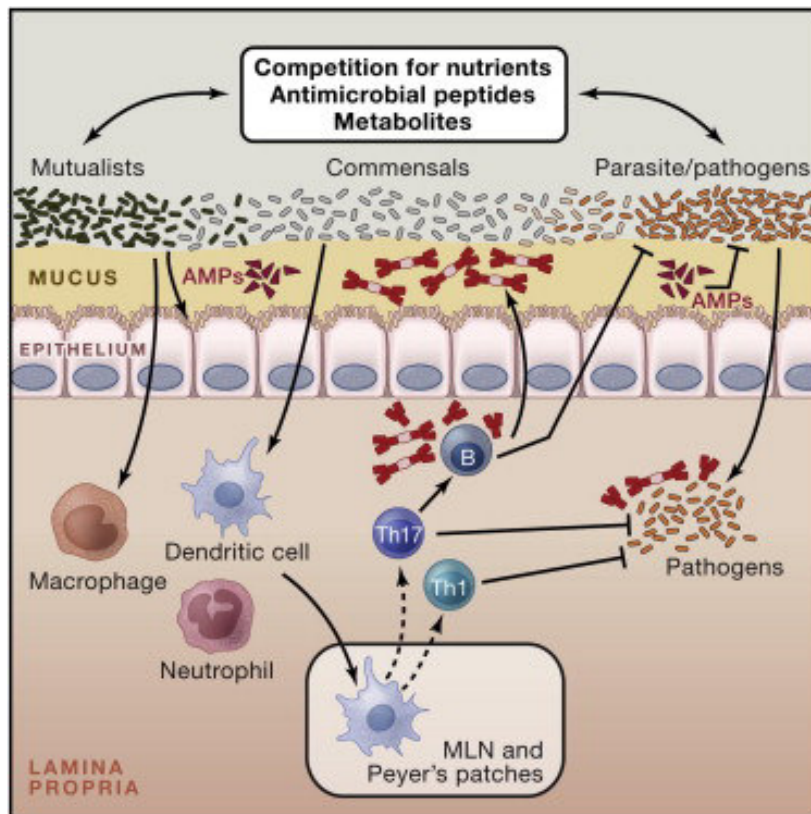


Abbildung 1: Einfluß der Darmmikrobiota auf die Ausbildung der protektiven Immunität. Die Wechselwirkung zwischen der Darmmikrobiota und dem menschlichen Wirt ist geprägt durch Mutualismus, Kommensalismus und Pathogenität. Das Vermögen einer bestimmten bakteriellen Spezies, Pathologien zu triggern oder auszulösen, ist kontextabhängig. So können sich Bakterien in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand, ihrer Lokalisation oder bei Ko-Infektion mutualistisch, kommensal oder pathogen verhalten. Kommensale Bakterien können dabei potentiell pathogene Spezies über verschiedene Mechanismen kontrollieren. So konkurrieren Kommensale mit Pathogenen um Nährstoffe und Nischen, können antimikrobiell wirksame Moleküle und Metabolite produzieren, in deren Folge das Überleben und die Virulenz der pathogenen Spezies beeinträchtigt werden. Weiterhin können kommensale Bakterien Epithelzellen zur Produktion antimikrobieller Peptide (AMP) anregen und die Expression von Tight junction-Proteinen fördern. Schließlich können kommensale Spezies die Funktion dendritischer Zellen und anderer Zelltypen der angeborenen Immunität sowohl lokal als auch systemisch modulieren, in deren Folge gegen Pathogene gerichtete Effektor-T- und B-Zell-Antworten induziert werden. Im unkontrollierten Zustand hingegen können kommensale Spezies der Mikrobiota Entzündungs- und Autoimmunprozesse fördern. Entnommen aus [24].

Große Mengen an bakteriellen Antigenen treten auf einer Oberfläche von mehr als 300 m² Darmmukosa mit dem menschlichen Wirt in Kontakt. Somit muß unser Organismus zahlreiche Mechanismen entwickeln, um etwa zu gewährleisten, daß trotz physiologischer Kolonisationsresistenz eingedrungene Spezies auf das Kompartiment Darm beschränkt und eine mögliche Translokation in den systemischen Kreislauf mit potentiell fatalen Folgen verhindert wird [27, 28]. Entsprechend hat der Mensch einige Schutzmechanismen entwickelt, um den

direkten Kontakt der Bakterien mit dem Darmepithel in Grenzen zu halten, mikrobielle Antigene zu detektieren, die die Epithelbarriere überwunden haben, und diese möglichst zeitnah zu eliminieren. Eine maßgebliche Barrierefunktion erfüllt hierbei die lumenwärts das Darmepithel auskleidende Schleimschicht. Während der Dünndarm mit einer lockeren Mukusschicht ausgestattet ist, die aber nicht direkt am Epithel adhäriert, befindet sich im Dickdarm diese dünnere, lockere Mukusschicht auf einer dickeren, die direkt dem Kolonepithel aufsitzt [29]. Interessanterweise können bestimmte Spezies, wie die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz bedeutsamen segmentierten filamentösen Bakterien und Clostridien-Arten ungehindert die Mukusbarriere penetrieren und an das Epithel adhären, ohne aber krankhafte Prozesse auszulösen, sondern vielmehr die Feinabstimmung der protektiven intestinalen Immunreaktionen zu übernehmen [30].

Ein weiterer Schutzmechanismus des Wirtes besteht in der Sekretion antibakteriell wirksamer Substanzen aus Epithelzellen. Zu nennen sind hier etwa die bakterizid wirkenden Lectine wie z.B. RegIII [27, 31]. Des Weiteren findet man im Mukus antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelicidine [32, 33], die in der Lage sind, bakterielle Zellmembranen zu permeabilisieren, sowie Lipocalin-2 und Cathepsin K, die von Epithelzellen in das Darmlumen sezerniert werden [34, 35]. Ein dritter Mechanismus, der vom intestinalen Immunsystem genutzt wird, um den Kontakt zwischen Darmbakterien und Epithelzellen zu begrenzen, stellt die Sekretion des Immunglobulins IgA dar [36]. Dendritische Zellen (DCs), die sich in den Peyerschen Platten (PP) des Dünndarms sowie in der intestinalen Lamina propria befinden, sammeln kontinuierlich Bakterien der luminalen kommensalen Darmmikrobiota mittels Endozytose [28]. Mit Bakterien oder deren Antigenen beladene DCs, die in die PP oder über afferente Lymphbahnen in die mesenterialen Lymphknoten (MLNs) gelangt sind, führen zu einer Aktivierung und Differenzierung naiver B-Zellen zu Plasmazellen, die für die jeweiligen kommensalen Spezies spezifisches IgA produzieren [27, 37]. Via efferente Lymphbahnen gewinnen diese spezifischen B-Zellen Anschluß an den systemischen Kreislauf und gelangen wieder in die intestinale Lamina propria zurück, von wo aus IgA in das Darmlumen sezerniert wird. Entsprechend bleibt die IgA-vermittelte Immunantwort auf den Darm beschränkt [27, 38-40]. Bemerkenswerterweise gewinnen die von den DCs bis in die MLNs transportierten Bakterien niemals Anschluß an den systemischen Kreislauf

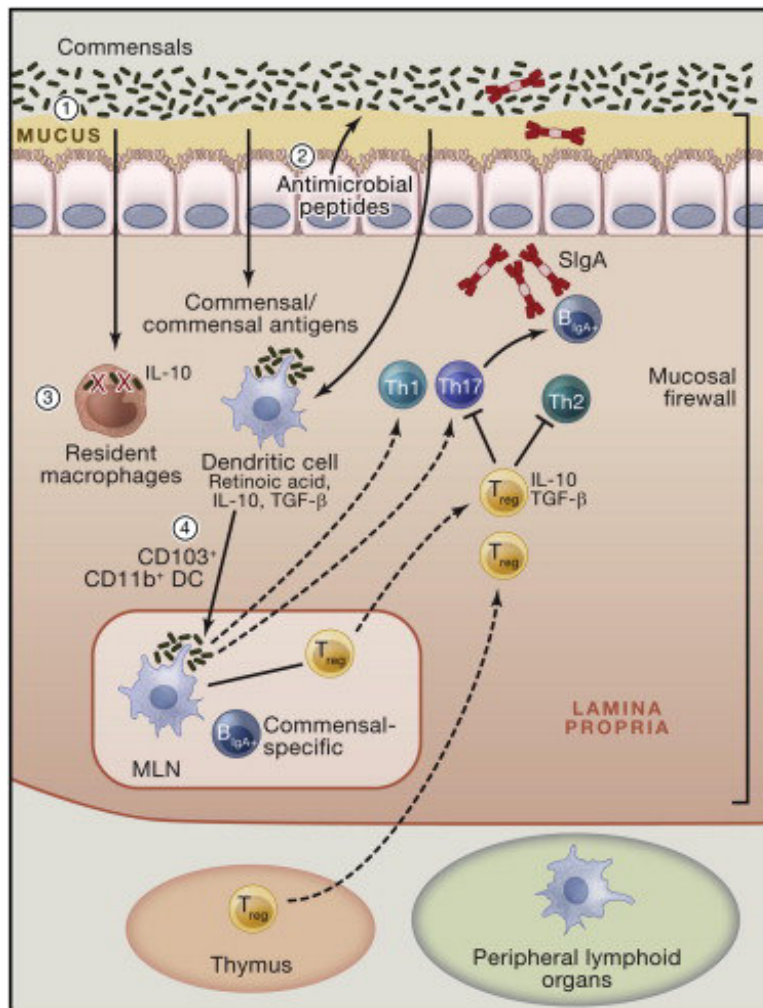


Abbildung 2. Der mukosale Schutzwall. (1) Der Schleimschicht stellt einen primären Teil der Epithelbarriere dar, die den direkten Kontakt zwischen der Mikrobiota und dem Darmepithel begrenzen und eine mögliche Translokation lebender Bakterien aus der Darmmikrobiota verhindern soll. (2) Von Darmepithelzellen produzierte und in den Mucus sezernierte antimikrobielle Peptide tragen hierbei ebenfalls zur Separierung von Mikrobiota und Darmepithel bei. (3) Translozierte Bakterien werden umgehend von in der Lamina propria ansässigen Makrophagen eliminiert. (4) Weiterhin können kommensale Bakterien und/oder deren Antigene von dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen und von der Lamina propria aus in mesenteriale Lymphknoten (MLNs) transportiert werden. Die nachfolgende Präsentation bakterieller Antigene durch DCs führt zur Differenzierung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen (Tregs), Th17-Zellen sowie IgA-produzierender B-Zellen. Antigen-spezifische Lymphozyten wandern dann in die Lamina propria und Peyerschen Platten. In den Peyerschen Platten wiederum können Tregs Th-Zell-Klassenwechsel fördern. Weiterhin sezernieren B-Zellen gegen die kommensalen Bakterien gerichtetes IgA. Epithelbarriere, Schleimschicht, IgA, DCs und T-Zellen bilden zusammen den mukosalen Schutzwall. Hierdurch wird die Passage und Präsentation von kommensalen Bakterien und/oder Antigenen in mit dem Darm assoziierten lymphatischen Strukturen limitiert und deren Aktivierung und in der Folge ausgelöste Immunpathologien verhindert. Entnommen aus [28].

und sind somit auch nicht in der Lage, systemische Immunreaktionen und extra-intestinale Entzündungen auszulösen. Diese Barrierefunktion wird daher auch als mukosaler Schutzwall bezeichnet [38, 39, 41, 42] (Abbildung 2).

Angesichts der Vielzahl von luminalen Darmbakterien und der riesigen Kontaktfläche der das Darmlumen auskleidenden Schleimhaut ist es unausweichlich, daß einzelne Bakterien die epitheliale Barriere überwinden und in die Lamina propria vordringen. Hier treffen sie auf eine weitere, zelluläre Barriere, die maßgeblich von phagozytierenden Makrophagen ausgestattet ist, um eine weitere bakterielle Translokation in den systemischen Kreislauf zu unterbinden [43]. Interessanterweise produzieren diese intestinalen Makrophagen wesentlich geringere Mengen an pro-inflammatorischen Mediatoren im Vergleich zu peripheren inflammatorischen Makrophagen, wodurch die Gefahr potentieller Gewebsschädigungen im Darm limitiert wird [43-45].

Bei Eindringen von pathogenen Bakterien in das Darmgewebe greifen gut aufeinander abgestimmte Immunmechanismen [46]. Hierbei wandern mit Antigen beladene DCs von der Darmmukosa in die drainierenden MLNs, treten dort in Kontakt mit naiven T-Zellen, die daraufhin aktiviert und polarisiert werden und in Th1- und Th17-Effektorzellen klonal expandieren [28]. Diese Effektor-T-Zellen gelangen dann über efferente Lymphbahnen in den Körperkreislauf und von dort in die Lamina propria zurück, wo sich die eingedrungenen Pathogene befinden. Im Zusammenspiel mit durch Th1- und Th17-Typ-Zytokinen (wie z.B. IFN- γ , TNF, IL-17) aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen und gewebständigen Makrophagen werden zusätzliche pro-inflammatorische Mediatoren (z.B. IL-1 β , IL-6, IL-12) sowie reaktive Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid (NO) generiert. Durch diese freigesetzten Mediatoren werden im Zusammenspiel mit den phagozytierenden Makrophagen die eingedrungenen Pathogene in der Folge eliminiert [28]. Weiterhin tragen zur mukosalen Barriere im Darmepithel und in MLNs befindliche, sog. innate lymphoide Zellen (ILCs) bei, die z.B. IL-22 produzieren können und die weitere systemische Translokation von Darmbakterien mit verhindern [47, 48]. Hierzu tragen auch bestimmte Subtypen von „Natural Killer-“ Zellen in IL-22- und RegIII-abhängiger Manier bei [28, 47-51] (Abbildung 3). Unter normalen Bedingungen werden die intestinalen Immunantworten auf Pathogene derart fein justiert, daß mögliche Mediator-bedingte Kollateralschäden für das Gewebe in Grenzen gehalten werden. An dieser Feinabstimmung sind maßgeblich CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) beteiligt, die ihrerseits anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF (Transforming growth factor) - β produzieren können [52]. Bestimmte kommensale Bakterienpopulationen wie segmentierte filamentöse Bakterien und Clostridien-Arten

tragen hierbei zur Entwicklung und Expansion von Tregs im Darm und angrenzender lymphatischer Strukturen wie beispielsweise PP und MLNs bei [46, 52, 53].

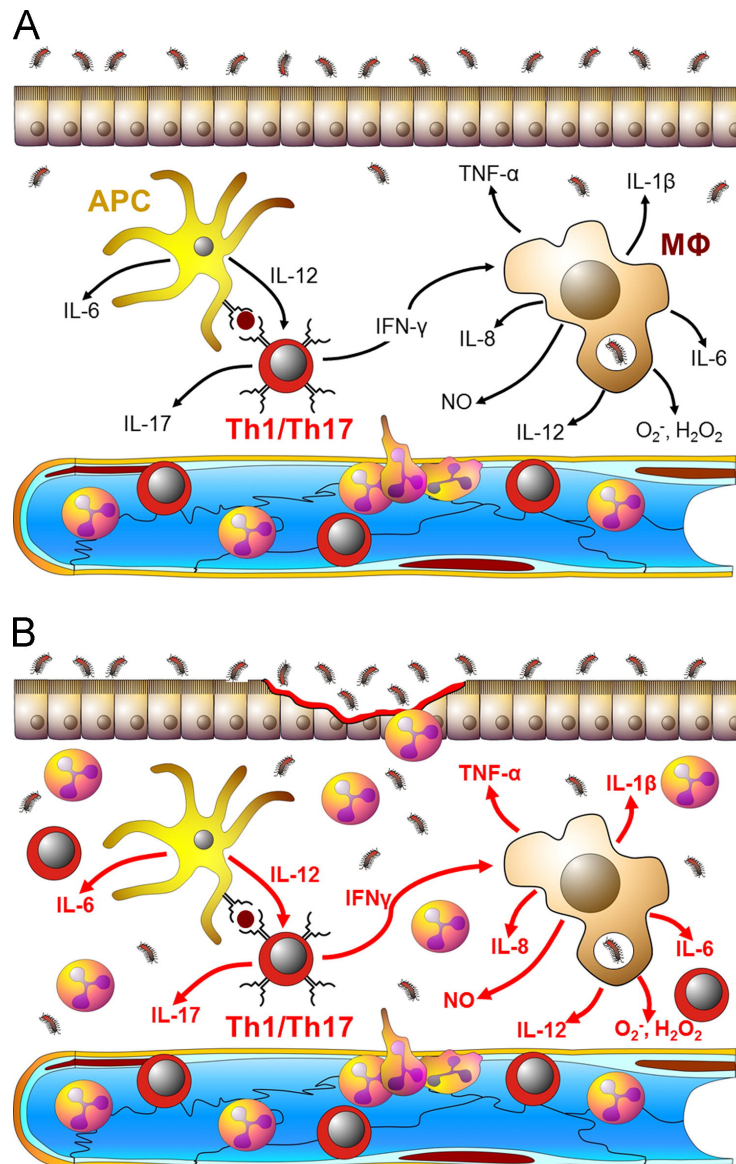


Abbildung 3. Adaptive und angeborene Immunantworten auf eingedrungene Pathogene. (A) Durch bakterielle Antigene aktivierte Th1- und Th17-Effektor-T-Zellen produzieren in der Lamina propria große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-17, TNF- α). Diese Zytokine aktivieren Antigen-präsentierende Zellen (APC) sowie Gewebs-Makrophagen (M Φ), die wiederum weitere pro-inflammatorische Mediatoren (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffradikale) sezernieren. Diese pro-inflammatorischen Mediatoren unterstützen die Phagozyten bei der Eliminierung der eingedrungenen Pathogene. Weiterhin induzieren einige der Mediatoren die Expression diverser Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) auf der Oberfläche von postkapillären Venolen, wodurch die Rekrutierung zusätzlicher Leukozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) in den Darm gefördert wird, um die Abtötung der Bakterien zu forcieren. Diese Immunantworten werden in der Regel fein reguliert, um durch die protektive Immunantwort bedingten entzündlichen Kollateralschäden im Gewebe in Grenzen zu halten. (B) Bei Fehlsteuerung dieser Mechanismen führt die überschießende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zu Endothel- und Epithelschäden und in der Folge zu Ödem, Erosionen, Ulzerationen und Fibrose [28].

1.3. Die Wechselwirkungen von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems mit der Mikrobiota

Aufgrund der Masse an luminalen Darmbakterien, die auf einer großen Oberfläche der Darmmukosa mit dem Wirt in Kontakt treten, ist es unausweichlich, daß trotz der beschriebenen Schutzmechanismen bakterielle Spezies die Epithelbarriere überwinden. Zellen der angeborenen Immunität müssen daher in ihrer Entwicklung erlernen, schnell zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ bzw. „Fremd“ zu unterscheiden. Diese Unterscheidung basiert auf spezifischen konservierten molekularen Mustern („Pattern“), sog. „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), die durch sogenannte „Pattern-recognition“ Rezeptoren (PRRs) detektiert werden [54]. Hierzu zählen u.a. die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), eine Klasse von insgesamt bisher 13 bekannten, während der Evolution hoch konservierten Transmembran-PRRs, die eine Schlüsselrolle bei der Induktion von pro- und anti-inflammatorischen Genen und der Kontrolle von adaptiven Immunantworten spielen [55, 56] (Tabelle 1) sowie die intrazellulären „NOD-like“-Rezeptoren (NLRs), zu denen Proteine wie NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain) 1, NOD2 und NALP gehören [57, 58]. Hierbei führt die Bindung von bakteriellen Molekülen an die TLRs zu einer klassischen inflammatorischen Immunantwort mit dem Ziel, die Bakterien zu eliminieren. Da allerdings die zahlreichen symbiontischen und kommensalen Bakterien unserer Darmmikrobiota viele derselben molekularen Muster wie Pathogene besitzen, erfordert es vonseiten des Wirtes fein aufeinander abgestimmte Regulationsmechanismen, um Schaden durch chronische Entzündungsreize zu verhindern. Außerdem werden die TLR-Expressionsmuster der Darmmukosa durch die Mikrobiota moduliert [59]. Im Gastrointestinaltrakt werden TLRs von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen exprimiert, darunter den intestinalen Epithelzell- (IEC-) Linien wie Enterozyten, Paneth-Zellen, Goblet-Zellen und enteroendokrinen Zellen [56-69] (Abbildung 4), von subepithelialen Myofibroblasten [70, 71] und verschiedenen professionellen Immunzelltypen innerhalb der Lamina propria wie etwa Monozyten und Makrophagen, DCs und CD4+ T-Zellen [71-75]. Spezifische Zelltypen können dabei individuelle TLR-Muster im jeweiligen Kontext (wie z.B. Aktivierungszustand) und an unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen exprimieren. So verlieren gewebständige Monozyten, wenn sie sich in unreife DCs differenzieren, die Expression gewisser TLRs, während die Expression anderer hinzukommen [76].

Tabelle 1: Expression und Lokalisation von Toll-like-Rezeptoren (TLR) im Darm von Mensch und Maus. Entnommen aus [69].

TLR	Expression in the small intestine (and method of detection)		Expression in the colon (and method of detection)		Cellular localization		Functions in intestinal epithelium	
	Mouse	Human	Mouse	Human	Mouse	Human	Mouse	Human
1	RNA	Protein (IHC)	ND	RNA and protein (IHC)	ND	ND	ND	ND
2	RNA and protein	RNA and protein (IHC)	RNA and protein (IHC)	RNA and protein (IHC)	Apical in villi and crypts; apical and basolateral in FAE	Basolateral in ileal crypts (fetus); low in adult ileum or colon, mainly in crypts	Chemokine and cytokine production; RELA phosphorylation; ZO1 redistribution and TFF3 expression	Preserved tight junction structure; increased TFF3 expression
3	RNA	Protein*	RNA	RNA and protein (IHC)*	ND	Basolateral in ileum and colon; top of colonic crypts	Blocking of TLR3 reduces IL-15 production	ND
4	RNA and protein (IHC and WB) [†]	RNA and protein (IHC and WB) [§]	RNA and protein (IHC)	RNA and protein (IHC)	Apical in terminal ileum; basolateral in colon (low); intracellular in fetal small intestine	Basolateral in ileal crypts (fetus); basolateral in colon (low); apical in active Crohn's disease (ileum and colon)	Cell growth, chemokine and cytokine production, phagocytosis and translocation of bacteria, and uptake of microparticles by M cells; expression leads to increased TNF production, apoptosis and NF- κ B activation; lack of expression leads to decreased TNF production and protects against NEC	ND
5	RNA and protein (IHC)	Protein*	ND	RNA and protein (IHC)*	Basolateral in ileum and colon; apical in FAE (small intestine)	Basolateral and intracellular in colon	Chemokine expression	Chemokine expression
6	RNA	ND	ND	RNA	ND	ND	ND	ND
7	RNA	ND	ND	RNA	ND	ND	ND	ND
8	RNA	ND	ND	RNA and protein (IHC)	ND	Top of colonic crypts in ulcerative colitis and Crohn's disease; not in normal intestine	ND	Chemokine secretion
9	RNA and protein (IHC)	Protein (IHC)	Protein (IHC and WB)	RNA and protein (IHC)	Apical and basolateral (ileum); in granules and cytoplasm of Paneth cells	Apical and basolateral in colon	Protects against NEC; signalling causes degranulation of Paneth cells	IL-8 secretion (whole biopsy)
10	ND	ND	ND	NE	ND	ND	ND	ND
11	RNA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

FAE: Follikel-assoziiertes Epithel; IHC: Immunhistochemie; NEC: nekrotisierende Enterokolitis; ND: nicht determiniert; NE: nicht exprimiert; TFF3: trefoil factor-3.

Vom Knochenmark stammende CD11c⁺ DCs exprimieren TLR-4 in hohem Maße, um schädigende Pathogene schnellstmöglich erkennen zu können [77]. In der Lamina propria vorkommende CD11c⁺ DCs hingegen exprimieren TLR-4 nicht, um sich gegenüber dem omnipräsenten Lipopolysaccharid (LPS) aus dem Darmlumen in einem weniger empfindlichen („hypo-responsiven“) Zustand zu halten [74, 78, 79]. Definierte TLR-Expressionsmuster spiegeln die jeweiligen funktionellen Notwendigkeiten an bestimmten strategischen Lokalisationen wider (Abbildung 4). So sind TLR-1, -2, -4, -5 und -6 auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR-3, -7, -8, und -9 in intrazellulären Kompartimenten wiederzufinden sind [80].

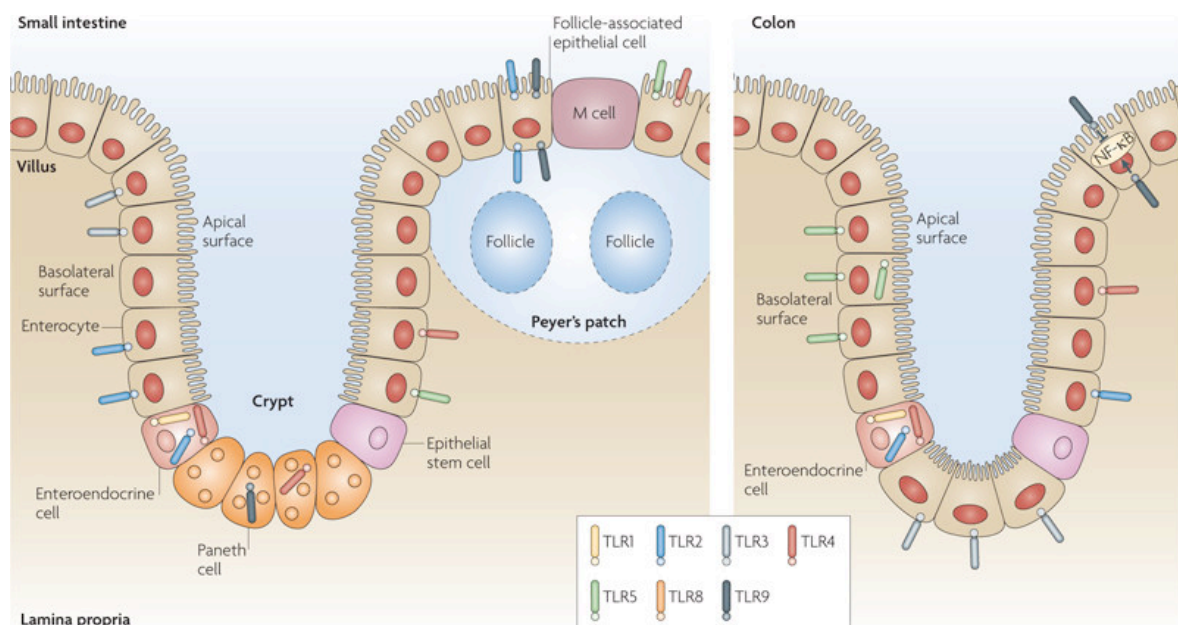


Abbildung 4. Polarisierter Expression von Toll-like-Rezeptoren in Darm-Epithelzellen. Das Dün- und Dickdarm-Epithel besteht aus einer einzelnen Schicht polarisierter Epithelzellen mit apikalen und basolateralen Oberflächen. Die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) in intestinalen Epithelzellen (IEC) erfolgt ebenfalls in polarisierter Manier. Im Dünndarm des Menschen befinden sich TLR-3, -4, -5 an der basolateralen Oberfläche der Zotten-Epithelzellen. Bei Mäusen exprimieren die Follikel-assoziierten Epithelzellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu M-Zellen und Peyerschen Platten TLR-2 und -9 sowohl an apikalen als auch basolateralen Oberflächen. Enteroendokrine Zellen exprimieren TLR-1, -2 und -4, wobei deren exakte Lokalisation bislang unklar ist. Im menschlichen Colon werden TLR-3 und -5 exprimiert, während die Expressionsraten von TLR-2 und -4 eher gering ausfallen. Die Wirkung von TLR-9 auf NF-κB zeigte je nach Lokalisation gegensätzliche Effekte. Dieses Schema basiert auf *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten mit humanen Epithelzellen, während die TLR-Expressionsmuster in Follikel-assoziiertem Epithel auf murinen Daten fußt. Entnommen aus [69].

Die Lokalisation der TLR-Expression im Darmepithel und deren Ansprechvermögen auf bestimmte Stimuli hängen maßgeblich von dem zellulären Aktivierungszustand, der Polarität und dem Differenzierungsgrad des Zelltyps bzw. Gewebes sowie hemmenden Faktoren ab [60, 81, 82]. So finden sich im gesunden Darm TLR-2 und TLR-4 nur in geringen Mengen auf IECs und mononukleären Zellen der Lamina propria wieder, um die Erkennung der antigenen Signale aus der luminalen Mikrobiota in Grenzen zu halten und somit lediglich einen basaler Aktivierungszustand aufrechtzuerhalten, ohne Zellschaden anzurichten [61, 80, 83]. Die funktionelle Konsequenz der TLR-Signaltransduktion hängt zudem davon ab, mit welchem Bereich bzw. Pol der Zelle der Ligand in Berührung tritt. *In vivo* werden TLRs vorwiegend in den basolateralen Abschnitten der IECs exprimiert [59, 69]. Hierdurch wird gewährleistet, daß eine Immunantwort erst dann ausgelöst wird, wenn Bakterien die Epithelschicht des Wirtes überwinden und nicht schon bei bloßem Kontakt der luminalen Mikrobiota mit dem Epithel [69]. Während TLR-9 etwa auch an der apikalen Seite der IECs exprimiert wird, entstehen inflammatorische Signale erst, wenn am basolateralen Pol exprimiertes TLR-9 mit dem entsprechenden Liganden in Wechselwirkung tritt [82]. Des Weiteren werden negative Regulatoren der TLR-Signalwege wie etwa das Toll-interacting protein (TOLLIP) vorzugsweise in IECs exprimiert, so daß eine tolerante Umgebung im Darm gewährleistet ist [84]. Sobald aber eine Bedrohung für den Wirt wahrgenommen worden ist, können diese inhibitorischen Mechanismen ausgeschaltet werden, und positive Regulatoren erlauben im Gegenzug eine angemessene Immunantwort, um die Gefahr abzuwenden [62, 80, 85]. Eine anhaltende TLR-vermittelte Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort wiederum kann zur chronischen Entzündung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus (M.) Crohn und Colitis ulcerosa beitragen. So ist TLR-4 auf primären IEC und mononukleären Zellen der Lamina propria entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes sowohl bei Patienten mit M. Crohn als auch Colitis ulcerosa stärker als bei Gesunden exprimiert [60, 81, 86-88], wodurch auf antigene Stimuli aus dem Darm in unangemessener Weise überreagiert wird. Zudem können von T-Zellen produzierte Zytokine wie IFN- γ und TNF, die wiederum eine maßgebliche Rolle bei der Immunpathogenese von CED spielen, die TLR-4 Expression in Darmepithelzellen steigern [86, 88, 89].

1.4. Induktion von Immunpathologien des Darms infolge gestörter Homöostase von Darmmikrobiota und Wirtsimmunität

Es mehren sich experimentelle und klinische Evidenzen, daß fehlgesteuerte Immunantworten auf Komponenten der intestinalen Mikrobiota bei genetisch prädisponierten Personen maßgeblich an der Entwicklung von CED beteiligt sind [4, 47, 90-92]. Durch die gestörte Homöostase zwischen Wirtsimmunität und Darmmikrobiota kommt es zur überschießenden Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren, die an der Entstehung von Gewebsschäden wie Erosionen, Ulzerationen und Fibrosen direkt oder indirekt beteiligt sind (Abbildung 5) [93].

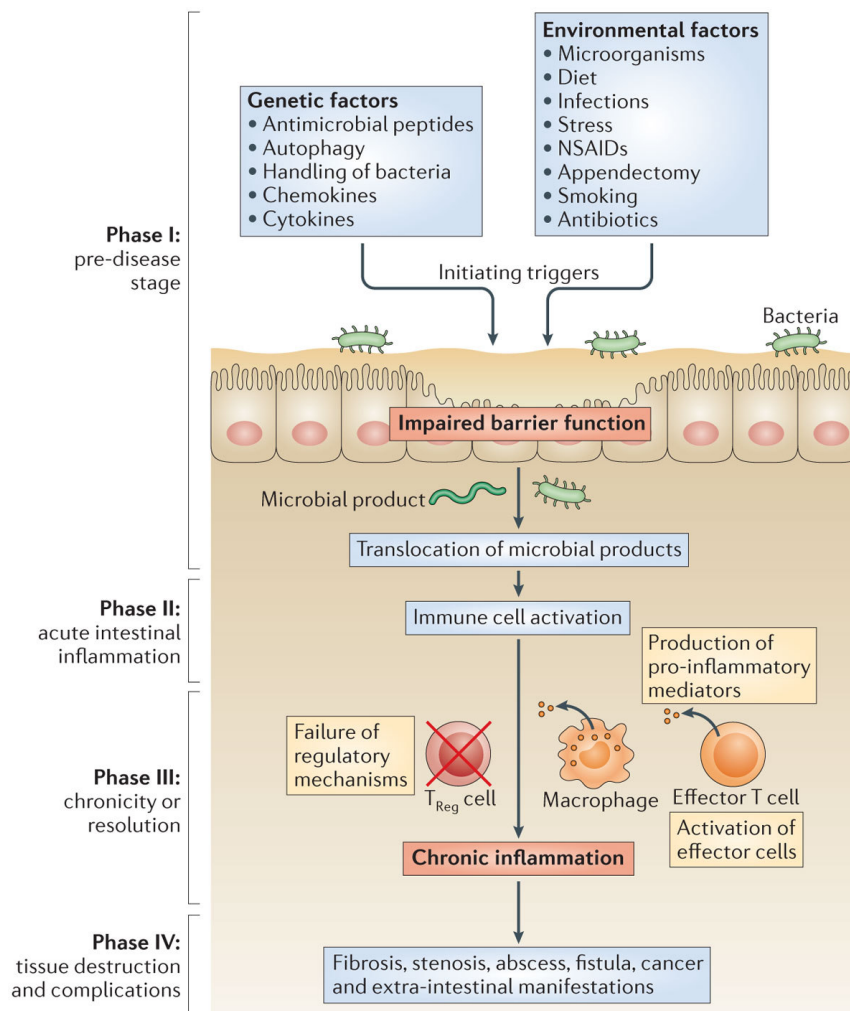


Abbildung 5: Stadien der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Genetische und Umweltfaktoren sowie Infektionen können die Funktion der Darmepithelbarriere beeinträchtigen. Eine gestörte Epithelbarriere wiederum erleichtert die Translokation von lebenden kommensalen Darmbakterien und deren Zellwandbestandteilen vom Darmlumen in die Darmwand, was eine Aktivierung von Immunzellen nach sich zieht. Wenn die folgende akute Entzündungsreaktion nicht durch

anti-inflammatorische Gegenmaßnahmen aufgelöst werden kann, kommt es zu einem chronisch entzündlichen Verlauf. Im Zuge dessen können Komplikationen wie Gewebsdestruktion durch mukosale Zytokinantworten weiter unterhalten werden. Entnommen aus [93].

Genom-weite Assoziationsstudien der vergangenen zwei Jahrzehnte konnten zeigen, daß zahlreiche Suszeptibilitätsgene für M. Crohn und Colitis ulcerosa den IL-23-/Th17- und IL-10 Signalweg betreffen [94, 95]. Darüberhinaus konnten Gene, die in der angeborenen Immunität sowie bei Autophagie eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. NOD2, TLR-2, TLR-4 und Autophagy-related protein 16-like 1, als Suszeptibilitätsgene für den M. Crohn identifiziert werden [28, 80]. Diese Befunde legen nahe, daß eine gestörte Prozessierung intrazellulärer Bakterien an der Pathogenese von M. Crohn beteiligt sein könnte [94, 95].

Die Zunahme der Inzidenz- und Prävalenzraten von CED vor allem in industrialisierten Ländern in den zurückliegenden 50 Jahren deutet darauf hin, daß Lebensumstände in einer „modernen“ industrialisierten Gesellschaft bei genetisch prädisponierten Menschen die Entstehung von CED fördern. Hierzu zählen etwa Ernährungsgewohnheiten, „verbessertes“ Hygienestatus sowie zunehmender Antibiotikaverbrauch bereits im Kindesalter [94-98]. Sämtliche dieser Faktoren können wiederum Einfluß auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota nehmen.

1.5. Experimentelle Modelle für akute Darmentzündungen

Während es eine Vielzahl von experimentellen Modellen gibt, um die Wechselwirkungen zwischen kommensalen Bakterien und Wirt im Bereich des Dickdarms zu untersuchen, sind Dünndarm-Entzündungsmodelle eher rar [99-103]. Eine akute Entzündung im Bereich des terminalen Ileum entwickelt sich spontan bei der SAMP1/YitFc Maus [104]. Bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen war die Bedeutung der Darmmikrobiota bei der Immunpathogenese der Ileitis allerdings noch nicht untersucht worden [105-107].

1.5.1 Modell der akuten *Toxoplasma gondii*-induzierten Ileitis

Suszeptible Mäuse entwickeln innerhalb von 7 bis 9 Tagen nach einer oralen Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* akut nekrotische Veränderungen im terminalen Ileum, die sämtliche Schichten betreffen (Pan-Ileitis), und in deren Folge die Tiere schließlich versterben [108]. Der akuten Ileitis liegt eine klassische Th1-Typ-Immunantwort zugrunde, in deren Zuge es zu einer von CD4+ T-Zellen abhängigen exzessiven Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie z.B. IFN- γ , TNF und NO kommt [108-110]. An der Stimulation der T-Lymphozyten wiederum sind maßgeblich IL-12, IL-23 und IL-18 beteiligt [111, 112]. Somit spiegelt die der akuten *T. gondii*-induzierten Ileitis zugrunde liegende Th1-Typ-Immunpathologie wichtige Merkmale des M. Crohn im akuten Schub beim Menschen wider [113].

1.5.2 Modell der akuten DSS-Kolitis

Gewebeschäden führen zu einer Aktivierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, in deren Folge bestimmte Zellpopulationen rekrutiert werden und proliferieren, um letztlich zur Wundheilung beizutragen. Bei der durch Dextrannatriumsulfat (DSS) induzierten Kolitis kommt es zu einem toxischen Schaden der Kolon-Epithelzellen nebst Krypten, wodurch Entzündungsantworten in der Lamina propria in Gang gesetzt werden. Im Zuge dessen können durch die gestörte Epithelbarriere ungehindert TLR-Liganden aus der luminalen Darmmikrobiota in Kontakt mit in der Lamina propria gelegenen Immunzellen treten,

in deren Folge der Gewebeschaden zunimmt [80]. Bei im Isolator aufgezogenen keimfreien Mäusen sowie bei mit Antibiotika behandelten konventionellen Mäusen entwickelt sich jedoch keine akute DSS-Kolitis [114]. Weiterhin wiesen in früheren Studien C57B1 und C3H Mäuse, die gegenüber LPS weniger empfindlich waren, weniger stark ausgeprägte Entzündungszeichen im DSS-Kolitismodell auf und waren trotz erhöhter LPS-Spiegel im Serum vor der Immunpathogenese geschützt [115]. Die Bedeutung der Darmmikrobiota am Zustandekommen der Kolitis wird auch in einem anderen Mausmodell nahegelegt. So entwickeln IL-10-gendefiziente Mäuse innerhalb von 3 bis 6 Monaten aufgrund antigener Stimuli aus der Darmmikrobiota eine chronische Kolitis, während Antibiotika-Behandlung oder Aufzucht unter sterilen Bedingungen deren Entstehung verhindert [116].

1.5.3 Modell der akuten *Campylobacter jejuni*-induzierten Enteritis

Die Inzidenzraten von durch *Campylobacter jejuni* hervorgerufenen Durchfallerkrankungen nehmen weltweit zu [117, 118]. Das über die Nahrungskette übertragene Pathogen verursacht beim Menschen Symptome unterschiedlichen Schweregrades. Klassischerweise imponiert bei der selbst-limitierenden Campylobacteriose eine akute Enteritis mit wäßrigen oder blutigen Durchfällen, Tenesmen, Fieber, Erbrechen und Myalgien [117]. Über die molekularen Mechanismen, die der durch *C. jejuni*-induzierten Immunpathologie beim Menschen zugrunde liegen, ist bislang relativ wenig bekannt. Einer der Gründe hierfür liegt am Fehlen geeigneter *in vivo*-Modelle [119]. Aufgrund der physiologischen Kolonisationsresistenz, die durch die Zusammensetzung der wirtsspezifischen Darmmikrobiota determiniert wird, kann nach einer oraler Infektion *C. jejuni* - wenn überhaupt - nur sporadisch im Intestinaltrakt von Mäusen ansiedeln und in der Folge keine Immunpathologie auslösen [118, 120]. Wir haben daher den experimentellen Ansatz verfolgt, die physiologische Kolonisationsresistenz durch eine Modifizierung der murinen Mikrobiotazusammensetzung zu durchbrechen, so daß eine stabile Etablierung des Pathogens und Auslösung der Immunpathologie im Darm *C. jejuni*-infizierter Mäuse ermöglicht wird und somit die Wechselwirkungen zwischen dem Pathogen, der Darmmikrobiota und dem Immunsystem des Wirtes näher untersucht werden können.

1.6. Zielsetzungen

Ziel der vorliegenden Habilitationsschrift ist es, die dynamischen Veränderungen der murinen Mikrobiota-Zusammensetzung in Modellen akuter Darmentzündung unterschiedlicher Ätiologie und Lokalisation zu untersuchen. Mittels kultureller und molekularer Analysen sollen bakterielle Kommensalen der Darmmikrobiota mit inflammatorischer Aktivität in Entzündungsmodellen identifiziert und Wechselwirkungen zwischen diesen Kommensalen und den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems des Wirtes auf molekularer Ebene aufgeklärt werden.

2. EIGENE ARBEITEN

2.1. Die Rolle von Gram-negativen bakteriellen Spezies im akuten *Toxoplasma gondii*-induzierten Ileitismodell

(Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fischer, A., Fuchs, D., Struck, D., Niebergall, J., Jahn, H.K., Dunay, I.R., Moter, A., Gescher, D.M., Schumann, R.R., Göbel, U.B., Liesenfeld, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, Journal of Immunology, 12/2006, 8785-8795, 177).

<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>

In dieser Arbeit wurden mittels kultureller und molekularer Methoden die quantitativen sowie qualitativen Veränderungen der luminalen Dünndarmmikrobiota der Maus im Verlauf der akuten Ileitis nach oraler Infektion mit *T. gondii* analysiert und die Translokationsraten lebender kommensaler intestinaler Bakterien in subepitheliale sowie extra-intestinale Kompartimente bestimmt. Weiterhin untersuchten wir, ob die festgestellten ausgeprägten Florenverschiebungen in Richtung Gram-negativer Spezies ursächlich an der Entzündungsentstehung und Aufrechterhaltung der Th1-Typ-Immunpathologie beteiligt waren. Für diese Fragestellung behandelten wir zum einen *T. gondii*-infizierte Mäuse mit gegen Gram-negative Spezies gerichteten Antibiotika wie Ciprofloxacin und Metronidazol. Zum anderen generierten wir gnotobiotische Mäuse, bei denen zuvor die kommensale Darmmikrobiota mittels Breitspektrumantibiotika-Therapie eradiziert worden war, und rekolonisierten diese selektiv mit den respektiven Gram-negativen Spezies oder der kompletten komplexen Dünndarmmikrobiota, um nachfolgend mittels oraler Infektion mit *T. gondii* die Entzündung zu induzieren. So konnten wir in dieser Arbeit mittels kultureller und molekularer Methoden zeigen, daß die Entwicklung einer akuten Ileitis nach oraler *T. gondii*-Infektion mit massiven quantitativen wie qualitativen Veränderungen der luminalen Dünndarmmikrobiota vergesellschaftet war. Innerhalb einer Woche nach *T. gondii*-Infektion kam es zu einer Überwucherung des entzündeten Dünndarmlumens mit Gram-negativen Spezies wie z.B. *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. auf Kosten einer allgemein reduzierten Diversität der Mikrobiota und Abnahme der *Lactobacillus*- und *Clostridium*-Populationen. Weiterhin

translozierten lebende Gram-negative Bakterien durch die entzündete Epithelbarriere in sub-epitheliale Kompartimente und konnten ebenfalls aus MLNs und Leber isoliert werden. Im Folgenden konnten wir zeigen, daß diese ausgeprägten Florenverschiebungen in Richtung Gram-negativer Spezies ursächlich an der Entzündungsentstehung und Aufrechterhaltung der Th1-Typ-Immunpathologie beteiligt waren. So waren mit Ciprofloxacin und Metronidazol behandelte Mäuse vor akuter Ileitis geschützt. Weiterhin blieb die Th1-Typ-Immunpathologie nach *T. gondii*-Infektion gnotobiotischer Mäuse aus. Nach selektiver Rekolonisierung dieser gnotobiotischen Mäuse mit den respektiven Gram-negativen Spezies oder der kompletten komplexen Dünndarmmikrobiota hingegen konnte das Vollbild der akuten Ileitis induziert werden. Zusammenfassend, konnten wir zeigen, daß Gram-negative Spezies der kommensalen Darmmikrobiota wie z.B. *E. coli* die akute *T. gondii*-induzierte Th1-Typ-Immunpathologie des Dünndarms verstärken. Wir können aus den geschilderten Ergebnissen zum einen schlußfolgern, daß das verwendete Tiermodell geeignet ist, um die molekularen Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen Darmbakterien und Wirtsimmunantwort zu untersuchen, und daß zum anderen die kommensale Darmmikrobiota modulierende Strategien zukünftige Optionen für die Prophylaxe und Therapie von akuten Darmentzündungen wie beispielsweise CED darstellen könnten.

2.2 Verstärkung der akuten *T. gondii*-induzierten Ileitis durch die von TLR-4 abhängige Signalantwort auf das Lipopolysaccharid kommensaler *E. coli*

(Heimesaat, M.M., Fischer, A., Jahn, H.K., Niebergall, J., Freudenberg, M, Blaut, M., Liesenfeld, O., Schumann, R.R., Göbel, U.B., Bereswill, S. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*, Gut, 07/2007, 941-948, 56).

<http://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.104497>

In dieser Arbeit untersuchten wir die molekularen Mechanismen des Beitrags der Gram-negative Spezies an der *T. gondii*-induzierten Ileitis näher. Wir banden hierfür Mäuse, die für TLR-4, dem maßgeblichen Rezeptor für das LPS Gram-negativer Bakterien, und/oder TLR-2, dem Rezeptor für Lipoprotein und Lipoteichonsäuren v.a. Gram-positiver Spezies, gendefizient waren, in unsere Infektionsversuche ein. Um zu beweisen, daß von TLR-4 abhängige Signalantworten auf das LPS die Entzündungsantworten verstärkten, wurden gnotobiotische Wildtyp-Mäuse mit *E. coli* oder hochgereinigtem Lipid A des LPS behandelt und entsprechend mit TLR4^{-/-} Mäusen im akuten Ileitis-Modell verglichen. So konnten wir *in vitro* und *in vivo* zeigen, daß die induzierte Th1-Typ-Immunpathologie maßgeblich vom TLR-4-Signalweg abhängig war. Ein kommensaler *E. coli*-Stamm, den wir vorab aus dem entzündeten Ileum von Wildtyp-Mäusen isoliert hatten, führte in embryonalen Nierenzellen und murinen Peritonealmakrophagen zu einer TLR-4-abhängigen NF-κB-Aktivierung und gesteigerter NO-Produktion. Weiterhin wiesen TLR-4^{-/-} im Vergleich zu TLR-2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen nach *T. gondii*-Infektion höhere Überlebensraten und eine verminderte Th1-Typ-Immunpathologie auf. Während mit lebenden *E. coli* oder synthetischem gereinigtem *E. coli*-Lipid A behandelte gnotobiotische TLR-4^{-/-} Mäuse vor der Ileitis geschützt waren, entwickelten entsprechend behandelte Wildtyp-Mäuse das Vollbild der Erkrankung. Schließlich konnte bei konventionell besiedelten Wildtyp-Mäusen, die mit dem LPS-Antagonisten Polymyxin behandelt worden waren, in Abhängigkeit von der Therapiedauer vor der Dünndarmentzündung geschützt werden. Zusammenfassend, sind an der Entstehung und Unterhaltung der *T. gondii*-induzierten Ileitis maßgeblich die TLR-4-abhängige Signalübertragung, ausgehend vom LPS Gram-negativer *E. coli*, die das Dünndarmlumen überwuchern, beteiligt. Wir können aus den Ergebnissen

schlußfolgern, daß bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis das angeborene Immunsystem eine Schlüsselrolle spielt und LPS- oder TLR-4-Antagonisten möglicherweise als zukünftige Behandlungsoptionen von Dünndarmentzündungen bei Patienten mit CED in Frage kommen.

2.3 Einfluß von Mikrobiotaveränderungen auf den Schweregrad der akuten Kolitis der Maus in Abhängigkeit von TLR-2 und -4

(Heimesaat, M.M., Fischer, A., Siegmund, B., Kupz, A., Niebergall, J., Fuchs, D., Jahn, H.K., Freudenberg, M., Loddenkemper, C., Batra, A., Lehr, H.A., Liesenfeld, O., Blaut, M., Göbel, U.B., Schumann, R.R., Bereswill, S. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4, PLoS One, 07/2007, e662, 2)

In dieser Publikation wurden mögliche Florenverschiebungen und die Beteiligung bakterieller Zellwandbestandteile an der Entzündungsinduktion in einem weiteren akuten Darmentzündungsmodell anderer Ätiologie und Lokalisation untersucht. Hierfür verwendeten wir DSS, um bei Mäusen chemisch eine akute Kolitis zu induzieren. Wir analysierten hierbei Unterschiede des Schweregrades der Entzündung bei TLR-2^{-/-}, TLR-4^{-/-} sowie TLR-2/4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen und analysierten die von TLR-2 und TLR-4 abhängigen Immunzellantworten und die Dynamik der Veränderungen der luminalen Dickdarmmikrobiota während der akuten Entzündung mittels kultureller und molekularer Methoden. So konnten wir zeigen, dass im akuten DSS-Kolitismodell Mäuse, die für TLR-2 und/oder TLR-4 gendefizient waren, im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen weniger stark ausgeprägte Krankheitssymptome und lokale pro-inflammatorische Immunantworten aufwiesen. Des Weiteren kam es 7 Tage nach Kolitis-Induktion ebenfalls zu markanten quantitativen und qualitativen Veränderungen der luminalen Dickdarmmikrobiota. So wurde bei Mäusen mit Kolitis ein signifikanter Anstieg kommensaler *E. coli* verzeichnet, wobei der Anstieg mit der Schwere des Krankheitsbildes korrelierte. Entsprechend waren die *E. coli*-Lasten im Kolonlumen von Wildtyp-Mäusen höher als bei Tieren, die für TLR-2 und/oder TLR-4 gendefizient waren. Weiterhin konnten im Kolon von TLR-2/4^{-/-} Mäusen niedrigere luminal Lasten an *Bacteroides/Prevotella* spp. sowie Enterokokken als bei Wildtyp-Kontrollen nachgewiesen werden. Interessanterweise waren im naiven Zustand, unabhängig vom Genotyp der Mäuse, die Kolon-Mikrobiota vergleichbar. Demzufolge erfolgte die mikrobielle Besiedlung im Darm der Mäuse von TLR-2 und TLR-4 unabhängig, während sich die Mikrobiota bei akuter DSS-Kolitis von TLR-2 und TLR-4 abhängig verschob. Ferner kam es TLR-2- und TLR-4-abhängig zu einer

Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und regulatorischen T-Zellen in die entzündete Dickdarm-Mukosa und Lamina propria. Zusammenfassend, kam es auch im akuten DSS-induzierten Kolitis-Modell zu ausgeprägten Verschiebungen der kommensalen Darmmikrobiota in Richtung Gram-negativer Spezies wie z.B. *E. coli*. Hierbei verstärkten bakterielle Zellwandbestandteile von TLR-2 und TLR-4 abhängig die Entzündungsreaktion. Wir können aus den geschilderten Ergebnissen schlußfolgern, daß die intestinale *E. coli*-Dichte quasi als Biomarker für die Schwere der Kolitis verwendet werden kann und das verwendete Kolitismodell geeignet ist, um zukünftig bakterielle Faktoren zu identifizieren, die an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt sind und als mögliche Kandidaten zur Behandlung von akuten Darmentzündungen wie z.B. CED in Frage kommen.

Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4

Markus M. Heimesaat^{1,2}, André Fischer^{1,2}, Britta Siegmund², Andreas Kupz¹, Julia Niebergall¹, David Fuchs¹, Hannah-Katharina Jahn¹, Marina Freudenberg³, Christoph Loddenkemper⁴, Arvind Batra², Hans-Anton Lehr⁵, Oliver Liesenfeld¹, Michael Blaut⁶, Ulf B. Göbel¹, Ralf R. Schumann¹, Stefan Bereswill^{1*}

1 Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany, **2** Medizinische Klinik I, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus-Benjamin-Franklin, Berlin, Germany, **3** Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, Germany, **4** Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus-Benjamin-Franklin, Berlin, Germany, **5** Institut Universitaire de Pathologie, Centre Universitaire Hospitalier Vaudois, Lausanne, Switzerland, **6** Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Germany

Background. Gut bacteria trigger colitis in animal models and are suspected to aggravate inflammatory bowel diseases. We have recently reported that *Escherichia coli* accumulates in murine ileitis and exacerbates small intestinal inflammation via Toll-like receptor (TLR) signaling. **Methodology and Principal Findings.** Because knowledge on shifts in the intestinal microflora during colitis is limited, we performed a global survey of the colon flora of C57BL/10 wild-type (wt), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice treated for seven days with 3.5% dextrane-sulfate-sodium (DSS). As compared to wt animals, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice displayed reduced macroscopic signs of acute colitis and the amelioration of inflammation was associated with reduced IFN-gamma levels in mesenteric lymph nodes, lower amounts of neutrophils, and less FOXP3-positive T-cells in the colon *in situ*. During acute colitis *E. coli* increased in wt and TLR-deficient mice ($P < 0.05$), but the final numbers reached were significantly lower in TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} and TLR2/4^{-/-} animals, as compared to wt controls ($P < 0.01$). Concentrations of *Bacteroides/Prevotella* spp., and enterococci did not increase during colitis, but their numbers were significantly reduced in the colon of DSS-treated TLR2/4^{-/-} animals ($P < 0.01$). Numbers of lactobacilli and clostridia remained unaffected by colitis, irrespective of the TLR-genotype of mice. Culture-independent molecular analyses confirmed the microflora shifts towards enterobacteria during colitis and showed that the gut flora composition was similar in both, healthy wt and TLR-deficient animals. **Conclusions and Significance.** DSS-induced colitis is characterized by a shift in the intestinal microflora towards pro-inflammatory Gram-negative bacteria. Bacterial products exacerbate acute inflammation via TLR2- and TLR4-signaling and direct the recruitment of neutrophils and regulatory T-cells to intestinal sites. *E. coli* may serve as a biomarker for colitis severity and DSS-induced barrier damage seems to be a valuable model to further identify bacterial factors involved in maintaining intestinal homeostasis and to test therapeutic interventions based upon anti-TLR strategies.

Citation: Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, et al (2007) Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4. PLoS ONE 2(7): e662. doi:10.1371/journal.pone.0000662

INTRODUCTION

In inflammatory bowel diseases (IBD) the disturbance of intestinal barrier functions results in increased immunoreactivity against bacterial antigens [1–3]. Patients with active intestinal inflammation display accumulation of commensal *Escherichia coli* or *Bacteroides* spp. at inflamed tissue sites [4–6]. These bacterial groups, also suspected to trigger intestinal inflammation in acute graft-versus-host-disease after bone marrow transplantation [7], can further potentiate immunopathology by translocation via microlesions and ulcerations [5,8]. The role of the commensal intestinal microflora in colitis has been studied in a number of experimental models [9,10], but detailed knowledge on the gut microbiota composition in acute intestinal inflammation is still limited. Recently, we have demonstrated that acute murine ileitis is accompanied by a rigorous *E. coli* overgrowth in the terminal ileum. During acute inflammation, *E. coli* numbers increased by up to nine orders of magnitude and their presence was found to be essential for the induction and progression of ileal immunopathology [8]. High numbers of *E. coli* in the inflamed ileum point towards an important role of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the exacerbation of acute intestinal inflammation. LPS and products from Gram-positive bacteria are recognized by toll-like-receptors (TLRs) 4 and 2, respectively, both of which are expressed in the murine intestinal mucosa [11]. Similar observations have been made in human IBD

where TLRs are upregulated at inflamed tissue sites [12,13]. In line with this, we found that LPS-mediated TLR4 signaling is responsible for a major part of the immunostimulatory potential of *E. coli* in acute ileitis, whereas TLR2, the main receptor for Gram-positive bacteria, was not involved [14].

Academic Editor: Alejandro Aballay, Duke University Medical Center, United States of America

Received May 20, 2007; **Accepted** June 22, 2007; **Published** July 25, 2007

Copyright: © 2007 Heimesaat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to U.B.G., O.L., R.R.S., C.L. (KFO104/ project 6; SFB633/ projects A7, B6, Z1), to B.S. (Emmy-Noether-Programm of the DFG, 749/3-4, 749/5-1) and to M.F. (DFG-SPP1110/ project Fr448/4-3). A.F. is supported by a grant from the Sonnenfeld Foundation Berlin, Germany.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* **To whom correspondence should be addressed.** E-mail: stefan.bereswill@charite.de

☯ These authors contributed equally to this work.

Acute colitis induced by the barrier-damaging agent dextran-sulfate-sodium (DSS) is exacerbated by gut bacteria, as evidenced by the amelioration of inflammation in germ-free animals and in mice treated with antibiotics [15]. Early studies on roles of bacterial LPS in triggering acute intestinal inflammation revealed that LPS-hyporesponsive C57BL and C3H mice displayed reduced macroscopic signs of colitis as compared to controls and were protected from inflammatory responses initiated by elevated serum LPS levels during inflammation [16]. Another study reported that DSS-induced colitis activity varies with the mouse strain used, but claims that the severity of colitis does not differ in LPS-unresponsive as compared to control mice, irrespective of their genetic background [17]. Furthermore, TLR-mediated sensing of gut bacteria has been suggested to play a role in intestinal homeostasis and TLR4 was shown to limit bacterial translocation during colitis [18–21]. In contrast, recent findings demonstrated that TLR-signaling via the adapter protein MyD88 is essential for spontaneous development of colitis in IL10-deficient mice [22]. However, global gut flora analysis in DSS-induced barrier-damage, which could account for some of the contradictory results mentioned above, has not been performed and bacterial species most abundant in acute colitis have not been investigated so far. To further extend our knowledge on potential roles of a bacterial interplay with innate immunity in acute colitis, we performed a global survey of the intestinal microflora and determined numbers of inflammatory cells in DSS-treated C57BL/10 mice lacking TLRs 2 and/or 4. Because major groups of gut bacteria cannot be cultivated, we complemented classical microbiological analyses with culture-independent molecular approaches such as denaturing-gradient-gel-electrophoresis (DGGE) based on separation of PCR-amplified bacterial 16S rRNA gene fragments [8,14]. Besides identification of gut residents specifically associated with the severity of DSS-induced colitis, we also studied the impact of TLRs 2 and 4 on i) macroscopic signs of acute colitis, ii) changes in relevant immune cell populations in the inflamed colon, and iii) the composition and dynamics of the intestinal microflora in healthy and diseased TLR-deficient animals.

RESULTS

Severity of acute intestinal inflammation depends on TLR2- and TLR4-signaling

We have recently demonstrated that commensal *E. coli* increase and exacerbate small intestinal inflammation in C57BL/10 mice via LPS-mediated TLR4-signaling [8,14]. To determine whether TLR2 or TLR4 may be involved in the aggravation of acute colitis, we compared macroscopic signs of disease in C57BL/10 wild-type (wt) mice and animals lacking TLR2, TLR4, or both (Figure 1). After seven days of DSS-treatment, wt mice developed severe signs of colitis as indicated by a total clinical score of 11.3 ± 1 (Figure 1A). In contrast, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} animals displayed significantly ($P < 0.001$) lower clinical scores of 7.1 ± 1.6 , 7.0 ± 3 , and 4.2 ± 2.3 , respectively, as compared to wt animals, thus indicating that colitis is exacerbated via TLR2- and TLR4-signaling (Figure 1A). Furthermore, reduced macroscopic signs of colitis in TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} were associated with diminished inflammatory activity as demonstrated by lower IFN-gamma concentrations (Figure 1B) in colonic mesenteric lymph nodes.

TLR2- and TLR4-dependent accumulation of effector immune cells in the inflamed colon

The acute stage of DSS-colitis is characterized by recruitment of neutrophils and T-cells to damaged tissue areas [23]. In addition,

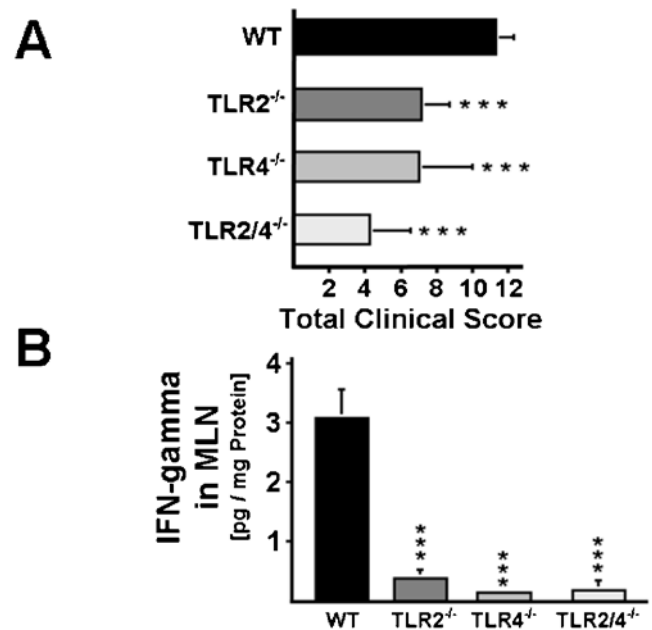


Figure 1. Colitis severity and inflammatory responses in TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice, as compared to wt controls. (A) Severity of colitis in DSS-treated animals. Clinical outcome of colitis was recorded in wt mice (WT, n = 10) and in mice lacking TLR2 (TLR2^{-/-}, n = 10), TLR4 (TLR4^{-/-}, n = 12), or both (TLR2/4^{-/-}, n = 11). Clinical parameters of colitis were monitored daily (see methods). The data sets from two independent experiments were pooled. Total colitis scores were analyzed at day eight after DSS-treatment for seven days.

(B) IFN-gamma concentrations in supernatants of colonic MLN cultures from wt and TLR-deficient animals. Supernatants from MLN cultures of wt mice (WT, black bars, n = 3), and animals lacking TLR2 (TLR2^{-/-}, n = 4), TLR4 (TLR4^{-/-}, n = 5), or both (TLR2/4^{-/-}, n = 4) with colitis were analyzed at day eight after DSS-treatment for seven days.

(A/B) Mean values, standard deviations and significance levels (as compared to the wt animals) determined by Student's t-test are indicated (***, $P < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0000662.g001

there is strong evidence that regulatory T-cells accumulate at inflamed tissue sites in DSS-treated mice and in IBD patients [23,24]. However, their numbers in diseased animals have not been investigated so far. Therefore, we quantified CD3⁺ total T-cells, FOXP3⁺ regulatory T-cells, and myeloperoxidase⁺ neutrophils by immunohistochemistry of colon sections *in situ*. The results demonstrated that numbers of CD3⁺ T-cells were slightly increased in the colons of DSS-treated wt and TLR2-deficient, but not TLR4- and TLR2/4-deficient mice, as compared to the respective naive animals (Figure 2). Most strikingly, the numbers of neutrophils and FOXP3⁺ regulatory T-cells in the inflamed colon were significantly lower in the colons of TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice as compared to DSS-treated wt animals (Figure 2). Independent histochemical analyses of HE-stained tissue sections and histological scoring by two pathologists (C.L. and H.A.L.) showed that DSS-induced tissue damage and histopathological changes in the colon were similar in wt, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-} mice, but significantly reduced in TLR2/4^{-/-} mice, as compared to the wt animals (not shown).

Development of a complex gut flora in TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice

To determine whether sensing of gut bacteria via TLR4 or TLR2 has a general impact on the composition of the intestinal

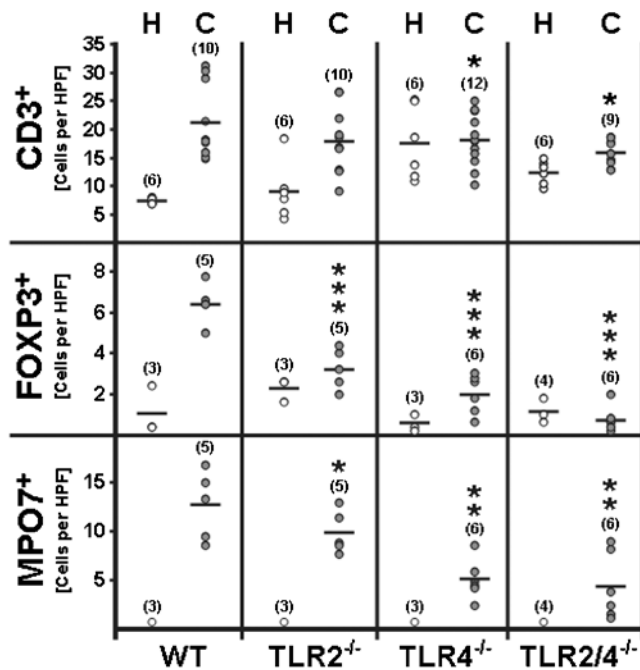


Figure 2. Quantification of immune cells in the colon of DSS-treated mice. Numbers of T-cells, regulatory T-cells, and neutrophils in the colon of DSS-treated wt mice and mice lacking TLR2 and/or TLR4. The average number of cells positive for CD3, FOXP3, or myeloperoxidase from at least five high power fields (HPF, 400×magnification) per animal were determined microscopically in immunostained colon sections of wt mice (WT), and animals lacking TLR2 (TLR2^{-/-}), TLR4^{-/-} (TLR4^{-/-}), or both (TLR2/4^{-/-}) at day eight after DSS-treatment for seven days (C, grey circles). Healthy animals served as controls (H, white circles). The numbers of analyzed animals are given in parenthesis. Mean values (black bars), and significance levels (as compared to wt animals with colitis) determined by Student's t-test are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0000662.g002

microflora (which could influence the outcome of colitis), we performed a global molecular survey of the colon microbiota in healthy C57BL/10 mice lacking TLR2, TLR4, or both receptors (Figure 3). Therefore, offspring mice were sacrificed, and the bacterial communities within the colon characterized by analysis of cloned bacterial 16S rRNA genes in DNA libraries (Figure 3A), as well as by high-resolution DGGE (Figure 3B). Comparative analysis of 16S rRNA gene libraries revealed that the overall diversity and composition of the gut microflora did not differ significantly among healthy TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice, as compared to wt animals (Figure 3A). The number and position of bands in DGGE profiles showed that the molecular pattern of the colon flora of TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice were similar to the reference pattern of wt animals, showing 100%, 92%, and 92% concordance, respectively. Two DGGE bands that were less intense in mice lacking TLR4 (Figure 3B, grey arrows) when compared to wt or TLR2^{-/-} animals contained DNA from so far uncultured bacteria of the *Bacteroidales* group (Figure 3B). The fact that i) bacteria represented by the upper band completely absent in TLR4^{-/-} mice were present in the luminal colon contents from TLR4^{-/-} animals that grew up in another facility (Figure 3B, black arrow), and ii) that the lower band was detected in one of the TLR4^{-/-} animals (Figure 3B) provided strong evidence that these differences are most likely caused by interindividual variability.

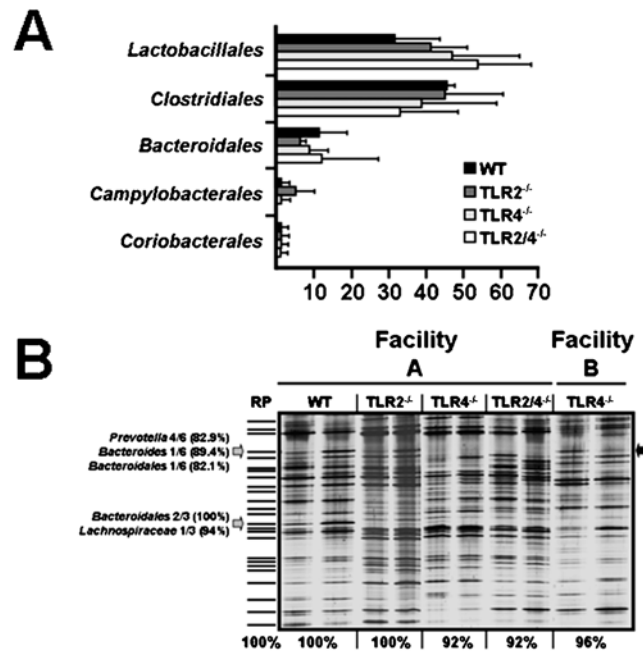


Figure 3. Molecular gut flora analysis in mice lacking TLR2 and/or TLR4. Detailed molecular investigations of the colon microbiota in three months old C57BL/10 mice lacking TLR2, TLR4, or both were performed by analysis of 16S rRNA gene libraries (A) or high-resolution DGGE (B) with primers HDA-1-GC and HDA-2 (see methods).

(A) Results from gene library analysis. Complete 16S rRNA genes were amplified from total luminal colon content DNA isolated from wt mice (WT, $n = 3$), and from mice ($n = 3$ each group) lacking TLR2 (TLR2^{-/-}), TLR4 (TLR4^{-/-}), or both (TLR2/4^{-/-}). The amplicons were cloned and sequenced as described in the Methods section. Bars represent percentage amounts of gut bacterial groups indicated on the Y-axis.

(B) Results from DGGE analysis of PCR-amplified total bacterial 16S rRNA gene fragments. Each lane shows DGGE profiles of the bacterial flora from the colon of healthy wt mice, and animals lacking TLR2 (TLR2^{-/-}), TLR4 (TLR4^{-/-}), or both (TLR2/4^{-/-}). Mice of identical age (three months) originated from two different animal facilities (as indicated above the lanes). DNA bands, which were absent or weak in DGGE profiles from TLR4^{-/-} and TLR2/4^{-/-} animals are marked by grey arrows. Bacterial species identified by sequence analysis of 16S rRNA gene fragments in the corresponding bands are indicated on the left. Total numbers of DGGE bands in the profile from wt animals were counted and set to 100% in the reference pattern (RP). Presence and absence of bands in profiles from the respective TLR-deficient animals was recorded and similarity values were calculated and expressed as % similarity to the wt RP. The DGGE profiles are representative for at least three mice per group and experiment. Results were reproduced in two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0000662.g003

Characterization of gut flora changes in acute colitis

In order to characterize potential gut flora shifts during DSS-induced barrier damage and to identify gut residents abundant in colitis, we performed a global survey of the gut flora in C57BL/10 mice with or without colitis (Figures 4A and 5). Molecular monitoring of the intestinal bacterial communities by DGGE (Figure 4A) demonstrated that the acute stage of colitis was characterized by a shift towards members of the *Enterobacteriaceae* (Figure 4A). In addition, bacterial communities in the colon from diseased mice were less complex, indicating a loss in bacterial diversity during acute inflammation (Figure 4A). Sequence analysis of bacterial 16S rRNA gene fragments from individual DGGE bands revealed that previously undescribed members of the

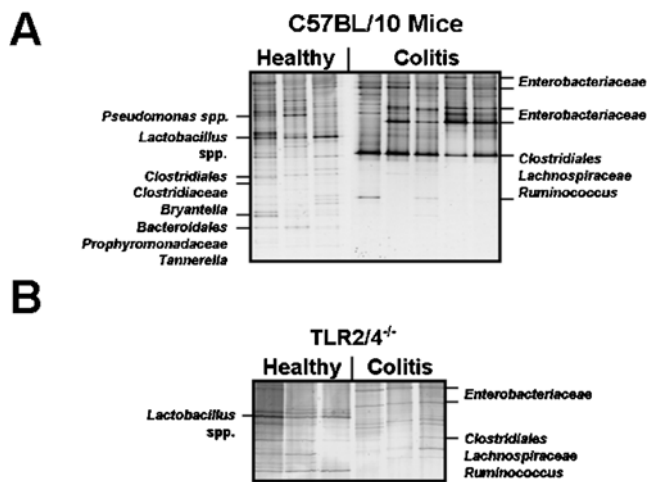


Figure 4. Molecular analysis of predominant bacterial communities in the colon of healthy and diseased mice.

(A) DGGE profiles of the colon flora in healthy and diseased wt mice. Results are shown for C57BL/10 wt mice without DSS-treatment or at day eight after DSS-treatment for seven days (as indicated above the lanes). Bacterial species were identified by comparative sequence analyses of 16S rRNA gene fragments amplified from DNA eluted from respective DNA bands. The DGGE profiles are representative for at least three mice per group and experiment.

(B) DGGE profiles of the colon flora in healthy and diseased TLR2/4^{-/-} mice. DGGE profiles of luminal intestinal bacteria from wt and TLR2/4^{-/-} mice were generated by PCR-based analysis of total DNA from colon contents of mice with or without colitis at day eight after DSS-treatment for seven days (as indicated). Bacterial species were identified by comparative sequence analysis of 16S rRNA gene fragments amplified from DNA eluted from respective DNA bands. The DGGE profiles are representative for at least three mice per group and experiment.

(A/B) Primers GC968F and R1378 (Heimesaat et al., 2006) were used for amplification. Results were reproduced in at least two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0000662.g004

Bacteroidales group, *Bryantella* spp., *Tannerella* spp., clostridia, and lactobacilli disappeared and were not detected in the inflamed colon (Figure 4A). In contrast, a DGGE band containing 16S rRNA genes from bacteria of the *Clostridiales* group was more prominent in samples from the inflamed colon, providing evidence that these bacteria might accumulate during colitis.

A global culture analysis of the gut flora in the inflamed colon of DSS-treated wt mice revealed that concentrations of commensal *E. coli* increased significantly ($P < 0.001$) by four orders of magnitude, respectively (Figure 5A). Populations of *Bacteroides/Prevotella* spp., enterococci, clostridia and lactobacilli were not significantly altered in the inflamed colon (Figures 5A and 5B). Thus, cultural analyses confirmed that the development of colitis is accompanied by shifts in the luminal *E. coli* population.

Identification of gut flora changes associated with the severity of acute intestinal inflammation

The fact that macroscopic signs and inflammatory parameters of acute intestinal inflammation were reduced in TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice prompted us to identify distinct gut bacterial populations associated with colitis severity (Figure 4B and Figure 5). A molecular analysis of the colon microflora composition in DSS-treated TLR2/4^{-/-} animals by DGGE revealed that the intensities of DNA-bands of *Enterobacteriaceae* were weaker when compared to wt animals (compare Figures 4A

and B). Furthermore, TLR2/4^{-/-} mice did not display an increased intensity of the DNA band containing a 16S rRNA gene fragment from so far undescribed clostridia (Figure 4B) observed in DSS-treated wt animals (Figure 4A). Most strikingly, a detailed culture-based comparative analysis of the intestinal flora demonstrated that *E. coli* concentrations increased to a lesser degree in DSS-treated TLR2- and TLR4-deficient animals as compared to wt mice ($P < 0.01$), indicating that increased colitis severity is associated with higher *E. coli* loads (Figure 5A). In TLR2/4^{-/-} mice, the increase in the *E. coli* numbers was also strongly alleviated, if compared to wt mice ($P < 0.001$), and these mice displayed only an approximately 10-fold rise in *E. coli* after colitis induction (Figure 5A). Moreover, DSS-treated TLR2/4^{-/-} mice contained significantly lower luminal loads of *Bacteroides/Prevotella* spp. and enterococci as compared to wt mice ($P < 0.01$), whereas all other flora changes in the respective TLR-deficient mice did not significantly differ from those observed in wt controls (Figure 5). Biochemical analyses revealed that the *Bacteroides* population consisted of *B. ovatus*, *B. merdae*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, and *B. thetaiotaomicron*. *Prevotella* spp. were represented by *P. oralis* and *P. buccae*. *Enterococcus* spp. included *E. faecalis*, *E. faecium*, and *E. gallinarum*.

DISCUSSION

The first global and comprehensive analysis of the colon microflora in the DSS-induced colitis model revealed that acute barrier-damage in the colon is accompanied by accumulation of commensal *E. coli*. Because intestinal overgrowth occurs in different intestinal injuries [25], these flora shifts are most possibly caused by a breakdown of the mucosal physiology. Together with the finding that the lack of TLRs 2 and/or 4 *per se* had no impact on the composition of the intestinal microflora in healthy mice (Figure 3), the lower abundance of *E. coli* in TLR-deficient mice with less macroscopic disease symptoms indicates that *E. coli* can serve as a sensitive biomarker for colitis severity. This is in line with the earlier finding that commensal *E. coli* accumulated drastically during ileitis in our C57BL/10 mice and displayed a strong pro-inflammatory potential to trigger small intestinal inflammation via TLR4 [8,14]. Similarly, abundant numbers of *E. coli* were associated with inflammation in the colon of IL2^{-/-} mice [26]. Contributions of *E. coli* and other gut bacteria to the aggravation of colitis were shown earlier in mono-associated germ-free IL10^{-/-} and IL2^{-/-} mice [27-29] and by the curative effects of antimicrobial therapy [15,30,31]. Nevertheless, mechanisms by which accumulating *E. coli* may modulate DSS-induced acute colitis are still not known in detail. The reduced macroscopic signs of colitis displayed by the DSS-treated TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice point towards important roles of LPS and TLR2 ligands (such as lipopeptides) in acute inflammatory processes in the colon. In the C57BL/10 mice analyzed here, both ligands seem to potentiate inflammation by TLR-mediated recruitment of neutrophils to inflamed tissue sites. The fact that FOXP3-positive cells were significantly decreased in DSS-treated TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice suggests that TLR ligands foster the recruitment and/or proliferation of regulatory T-cells, which can serve as markers for acute intestinal inflammation in this animal model. This is consistent with similar observations in IBD, where inflamed tissue areas contained higher numbers of FOXP3-positive T-cells [24]. Taken together and in line with recent findings [18-21], our results underline the important role of gut bacterial sensing by TLRs in maintaining the intricate balance between mucosal immunity and intestinal inflammation.

The results obtained here add important information in as much as bacterial TLR2 ligands may contribute to colitis

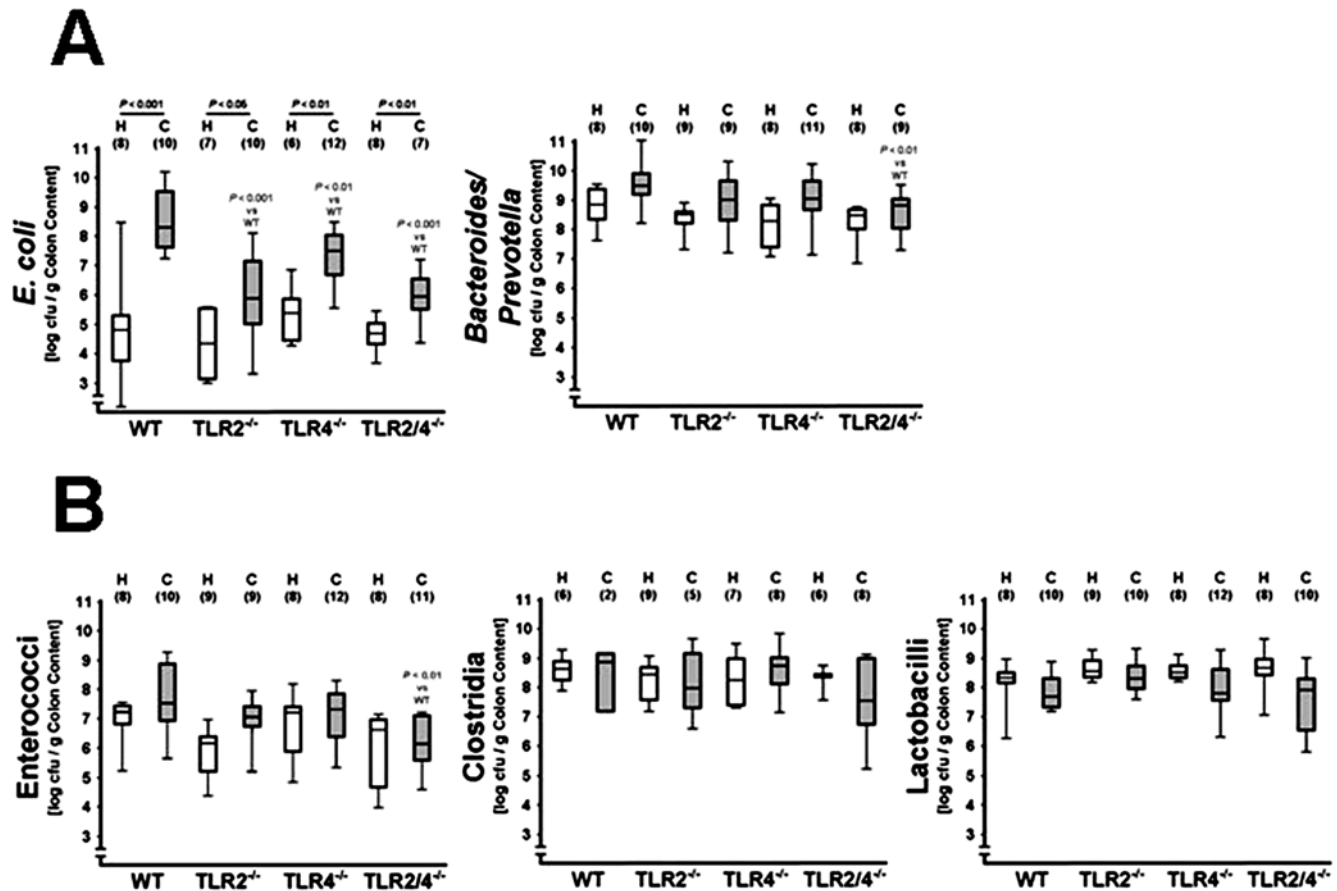


Figure 5. Cultural analysis of gut flora changes in healthy and diseased TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2/4^{-/-} mice, as compared to wt controls. Bacterial counts of (A) Gram-negative (*E. coli*, *Bacteroides/Prevotella* spp.) and (B) Gram-positive bacteria (*Enterococcus* spp., clostridia and lactobacilli) in luminal colon contents from healthy animals (H) and from mice with colitis at day eight after DSS-treatment for seven days (C) as determined by culture. Bacterial species were identified by biochemical analysis and reconfirmed by comparative sequence analyses of 16S rRNA genes. Results are shown for wt mice (WT, above) and for mice lacking TLR2 (TLR2^{-/-}), TLR4 (TLR4^{-/-}), or both (TLR2/4^{-/-}) as indicated on the x-axis. Animal numbers analyzed are given in parentheses. The data sets were pooled from two independent experiments. The boxes represent 75th % and 25th % percentiles of medians (indicated by black bars within the boxes). Maximum and minimum values are indicated by lines above and below boxes, respectively. Significance levels were determined by Mann-Whitney-U-Test. Underlined *P* values shown in black were calculated from comparisons of healthy versus diseased animals. *P* values shown in grey were calculated from the bacterial number in diseased animals (all versus WT). doi:10.1371/journal.pone.0000662.g005

pathology. In this context it is interesting to note that so far non-cultured Gram-positive bacteria of the *Clostridium* group increased during colitis (as shown by DGGE). Furthermore, the inflamed colon of DSS-treated TLR2/4^{-/-} animals displaying reduced disease symptoms contained significantly lower concentrations of *Bacteroides/Prevotella* spp. and enterococci, as compared to wt-controls. However, since DGGE is not a quantitative technique and because the enterococcus concentrations showed only a tendency to increase during colitis, the potential impact of these observations remains speculative.

In conclusion, DSS-induced colitis is accompanied by a population shift towards *E. coli*, which have the potential to trigger TLR-dependent accumulation of neutrophils and T-cells. This microflora shift towards pro-inflammatory bacteria may help to explain why blockage of TLR-signaling was successfully used to suppress acute intestinal inflammation [32]. Thus, DSS-induced barrier damage seems to be a valuable model to further identify bacterial factors involved in maintaining intestinal homeostasis and to test therapeutic interventions based upon anti-TLR strategies.

MATERIALS AND METHODS

Mice, colitis induction and determination of clinical scores

C57BL/10ScSn wt, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} mice were bred as described [8,14]. Experiments were conducted according to the German animal protection laws. For colitis induction, mice were treated with 3.5% (wt/vol) DSS (40.000 kDa, MP Biomedicals, Illkirch, France) in drinking water *ad libitum* for seven days. Prior to sacrifice, mice received water without DSS for 24 hours. The intake of the DSS-solution was controlled and mice were weighed daily. Total clinical scores with a maximum of 12 were assessed daily by combined data of weightloss, occurrence of blood in stool (HaemoccultTM, Beckman Coulter / PCD, Krefeld, Germany), and stool consistency, as described [33].

Sampling procedures and histologic scoring

Mice were sacrificed with HalothanTM (Eurim-Pharm, Mülheim, Germany) on day eight after induction of colitis. Colon samples

were removed under sterile conditions. Histopathology was investigated in paraffin-embedded HE-stained tissue sections. A published standardized histologic score [33] ranging from 0 to 6 was used for blinded evaluation of the inflammatory processes in the colon.

Immunohistochemistry

For immunostaining, 4 µm sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were cut, deparaffinized, and subjected to a heat-induced epitope retrieval step. Slides were rinsed in cool running water, washed in Tris-buffered saline (pH 7.4) before incubation with primary antibodies against CD3 (N1580, Dako, Glostrup, Denmark, dilution 1:10), myeloperoxidase (MPO7, A0398, Dako, 1:10000), and Foxp3 (EJK-16s, eBioscience, 1:100) for 30 min. For detection, biotinylated donkey anti-rat (Dianova, Hamburg, Germany) or rabbit anti-rat (Dako) secondary antibodies were used followed by application of the streptavidinAP kit (K5005, Dako) or the EnVision peroxidase kit (K 4010, Dako). Alkaline phosphatase was revealed by Fast Red as chromogen and Peroxidase was developed with a highly sensitive diaminobenzidine (DAB) chromogenic substrate for approximately 10 minutes. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. For each animal, the average number of positive stained cells within at least five independent high power fields (HPF, 400×magnification) were determined microscopically and subjected to statistical analysis as indicated.

Analysis of the colon microflora

Molecular detection, biochemical identification, and cultural analyses of intestinal bacterial communities were performed as described [8,14,34]. Briefly, luminal feces samples were removed for molecular analyses from the distal colon, resuspended in PBS, and centrifuged (16,000×g/10 min/4°C). Total DNA, isolated by phenol extraction as described [8], served as template for PCR amplification of bacterial 16S rRNA genes with consensus primers TPU1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC TCAG-3', nt 8-27 in the *E. coli* 16S rRNA gene) / RTU8 (5'-AAGGAGGTGATC-CANCCRCA-3', nt 1541-1522 in the *E. coli* 16S rRNA gene).

REFERENCES

- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417–429.
- Basset C, Holton J (2002) Inflammatory bowel disease: is the intestine a Trojan horse? *Sci Prog* 85: 33–56.
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, et al. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 113: 1296–1306.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, et al. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44–54.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale P, Lochs H (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43: 3380–3389.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412–421.
- Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW (1999) Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 93: 3267–3275.
- Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, et al. (2006) Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 177: 8785–8795.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Ann Rev Immunol* 20: 495–549.
- Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F (2003) Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 9: 218–222.
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, et al. (2003) Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 170: 3977–3985.
- Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, et al. (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129: 50–65.
- Cario E, Podolsky DK (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68: 7010–7017.
- Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, et al. (2007) Exacerbation of murine ileitis by toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56: 941–948.
- Tlaskalova-Hogenova HL, Tuckova R, Stepankova T, Hudcovic T, Palová-Jelínková L, et al. (2005) Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 1051: 787–798.
- Lange S, Delbro DS, Jennische E, Mattsby-Baltzer I (1996) The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. *APMIS* 104: 823–833.
- Steveeva L, Pavli P, Buffinton G, Wozniak A, Doe WF (1999) Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 54–60.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzanch F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229–241.
- Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, et al. (2005) MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 40: 16–23.
- Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, et al. (2005) Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting

- bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G1055–1065.
21. Fukata M, Chen A, Klepper S, Krishnareddy S, Vamadevan AS, et al. (2006) Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131: 862–877.
 22. Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R (2006) Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 25: 319–329.
 23. Vowinkel T, Anthoni C, Wood KC, Stokes KY, Russell J, et al. (2007) CD40-CD40 ligand mediates the recruitment of leukocytes and platelets in the inflamed murine colon. *Gastroenterology* 132: 955–965.
 24. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, et al. (2005) Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128: 1868–1878.
 25. Husebye E (2005) The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* 51 (Suppl.1): 1–22.
 26. Schuppler M, Lotzsch K, Waidmann M, Autenrieth IB (2004) An abundance of *Escherichia coli* is harbored by the mucosa-associated bacterial flora of interleukin-2-deficient mice. *Infect Immun* 72: 1983–1990.
 27. Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D (2005) IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J Immunol* 174: 2990–2999.
 28. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, et al. (2005) Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 128: 891–906.
 29. Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, Lehr HA, Schubert S, et al. (2003) *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 125: 162–177.
 30. Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W (2000) The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12: 267–273.
 31. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, et al. (2001) Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 69: 2277–2285.
 32. Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG, Correia Jda S, Johnson DA, et al. (2005) A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 174: 6416–6423.
 33. Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, et al. (2001) Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 99–105.
 34. Aebischer T, Fischer A, Walduck A, Schlötelburg C, Lindig M, et al. (2006) Vaccination prevents *Helicobacter pylori* induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 221–229.

2.4 Anstieg intestinaler Konzentrationen von biologisch aktiven TLR-2, -4 und -5 Liganden bei akuter Ileitis und Kolitis der Maus

(Erridge, C., Duncan, S.H., Bereswill, S., **Heimesaat, M.M.** The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5, PLoS One, 02/2010, e9125, 5)

Basierend auf den Ergebnissen der Mikrobiotaverschiebungen aus den vorangegangenen Arbeiten, quantifizierten wir in dieser Studie biologisch wirksame Liganden für TLR-2 (Lipopeptid-Äquivalente), TLR-4 (Lipopolysaccharid-Äquivalente) sowie TLR-5 (Flagellin-Äquivalente) in murinen und human Darmproben. Hierfür wurden Faecesproben gesunder Probanden sowie luminale Dünn- und Dickdarmproben von Mäusen mit und ohne akuter *T. gondii*-Ileitis bzw. DSS-Kolitis gewonnen und auf ihre Immunaktivität hin untersucht. TLR-transfizierte HEK (Human embryonic kidney) -293 Zellen wurden mit definierten PAMP-Standards kalibriert, um die biologischen Aktivitäten spezifischer TLR-Liganden während akuter definierten Darmentzündungen zu quantifizieren. Des Weiteren wurden repräsentative Bakterienspezies der kommensalen Darmmikrobiota, die zuvor durch Hitze abgetötet worden waren, mit TLR-2, TLR-4 oder TLR-5 transfizierten HEK293-Zellen koinkubiert und die Antworten mittels NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) -Reporter quantifiziert. Wir konnten in dieser Arbeit mittels dieses Bioassays zeigen, daß nach Induktion einer akuten Ileitis oder Kolitis luminale Konzentrationen von TLR-2-, TLR-4- und/oder TLR-5-Liganden in Abhängigkeit von der jeweiligen Immunpathologie anstiegen. So konnten im Ileum von Mäusen mit akuter Ileitis stark erhöhte Konzentrationen von Lipopeptid-, Lipopolysaccharid- und Flagellin-Äquivalenten bestimmt werden. Im Kolon von Mäusen, die unter akuter Kolitis litten, waren hingegen die Konzentrationen der Äquivalente von Lipopeptid vergleichsweise moderat, die für LPS stark erhöht, während die Flagellin-Konzentrationen unverändert blieben. Diese Veränderungen der TLR-Liganden spiegeln die Anstiege potentiell pro-inflammatorisch wirksamer bakterieller Spezies der jeweiligen Darmmikrobiota bei definierten Entzündungskonditionen wider. Wir konnten basierend auf dieser Arbeit im Kontext mit den beiden vorherigen Studien darauf schließen, daß Bestandteile

überwuchernder kommensaler *E. coli* bei akuter Kolitis nicht nur als TLR-4-, sondern auch als TLR-2-Liganden und bei akuten Ileitis zudem zusätzlich als TLR-5-Liganden wirksam waren. Weiterhin zeigten Ergebnisse mit den Hauptvertretern der kommensalen humanen Faecesmikrobiota, daß *Enterobacteriaceae*, obgleich in relativer Minderzahl, mehr zu den löslichen TLR-2- und TLR-4-Liganden beitragen als die *Bacteroides* spp. oder die Gram-positiven Firmicutes. Schlußfolgernd, ist die Induktion einer akuten murinen Ileitis oder Kolitis mit krankheitsspezifischen Veränderungen von TLR-Liganden der kommensalen Darmmikrobiota vergesellschaftet.

The Induction of Colitis and Ileitis in Mice Is Associated with Marked Increases in Intestinal Concentrations of Stimulants of TLRs 2, 4, and 5

Clett Erridge^{1*}, Sylvia H. Duncan², Stefan Bereswill³, Markus M. Heimesaat³

1 Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, Leicester, United Kingdom, **2** Microbial Ecology Group, Rowett Institute of Nutrition and Health, Aberdeen, United Kingdom, **3** Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

Abstract

Background: Inflammatory bowel diseases (IBDs) appear to be modulated by the interaction of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from intestinal bacteria with their respective innate immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs). We aimed to establish if intestinal concentrations of proinflammatory bacterial ligands of TLR2, TLR4, or TLR5 may be altered in murine IBD models, and to characterize which of the major bacterial groups may contribute to each signal.

Methodology/Principal Findings: PAMPs specific for TLR2 (lipopeptide equivalents), TLR4 (lipopolysaccharide equivalents), and TLR5 (flagellin equivalents) in human and murine fecal and intestinal samples were quantified using HEK-293 cells transfected with respective TLRs and calibrated with defined standard PAMPs. The induction of colitis in mice by dextran-sodium-sulphate treatment significantly increased colonic lipopeptide (fourfold) and LPS equivalent (550-fold) concentrations, while flagellin equivalent concentrations remained similar. The induction of ileitis by oral infection with *Toxoplasma gondii* dramatically increased ileal concentrations of lipopeptide (370-fold), LPS (3,300-fold), and flagellin equivalents (38-fold), all $P < 0.01$. Analysis of representative strains of the major bacterial groups of the human intestine revealed that enterobacterial species are likely to be more significant contributors of soluble TLR2 and TLR4 stimulants to the intestinal milieu than *Bacteroides* species or Gram-positive Firmicutes.

Conclusions/Significance: We conclude that the induction of colitis or ileitis in mice is associated with significant disease-specific alterations to the PAMP profile of the gut microbiota.

Citation: Erridge C, Duncan SH, Bereswill S, Heimesaat MM (2010) The Induction of Colitis and Ileitis in Mice Is Associated with Marked Increases in Intestinal Concentrations of Stimulants of TLRs 2, 4, and 5. PLoS ONE 5(2): e9125. doi:10.1371/journal.pone.0009125

Editor: Adam J. Ratner, Columbia University, United States of America

Received: December 3, 2009; **Accepted:** January 22, 2010; **Published:** February 9, 2010

Copyright: © 2010 Erridge et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a Leicester University College of Medicine Fellowship awarded to CE. The Rowett Institute receives financial support from the Scottish Government Rural and Environment Research and Analysis Directorate. S.B. and M.M.H. were supported by grants from the German Research Foundation (DFG; SFB633, TP A7 and DFG; SFB633, TP B6, respectively). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ce55@le.ac.uk

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs), including ulcerative colitis and Crohn's disease, are widely believed to be driven by inappropriate responses to the intestinal microbiota [1]. Among the mechanisms by which bacteria may promote inflammatory signalling, recent evidence suggests that pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from intestinal bacteria may modulate IBDs via stimulation of their respective innate immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs) [2]. TLRs, like other innate immune receptors, detect conserved PAMPs that are expressed not only by pathogenic bacteria, but also commensal bacteria, and thus serve as key sentinels for the detection of microbial products. For example, TLRs 2, 4 and 5 are the major cell-surface sensors of bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides (LPS) and flagellins, respectively, while TLRs 3, 7, 8 and 9 detect nucleic acid motifs [3].

In most cell types, the detection of PAMPs by their respective TLR evokes a potent pro-inflammatory response, involving rapid

induction of myeloid-differentiation factor 88 (MyD88) and NF- κ B-dependent signalling pathways, and the resultant expression of a broad array of pro-inflammatory adhesion molecules, chemokines and cytokines. By contrast, PAMP-recognition by intestinal epithelial cells has been shown to lead to the promotion of barrier enhancement, epithelial repair and the secretion of anti-microbial peptides, rather than overt inflammatory responses [4–6]. Mechanisms such as these therefore enable the healthy gut mucosa to remain largely uninfamed despite chronic luminal exposure to large quantities of potentially pro-inflammatory PAMPs derived from the host commensal microbiota.

Several lines of evidence suggest that dysregulation of this tolerance to intestinal TLR-stimulants, or disruption of the epithelial barrier separating PAMPs from responsive underlying tissues, may contribute to the development or perpetuation of IBDs. For example, although it is well established that the presence of luminal PAMPs is not sufficient to initiate IBDs in animal models [7–9], it has been shown that TLR-mediated detection of some luminal PAMPs can exacerbate existing disease. Administration of

LPS or CpG-ODN (a TLR9 agonist) to rabbits or mice was shown to enhance experimentally-induced colitis or ileitis [8,10]. Likewise, we recently reported that oral administration of the TLR4 agonist lipid-A aggravated immunopathology in a murine model of *Toxoplasma gondii*-induced ileitis [11], and that genetic deletion of TLR4, or treatment with the LPS scavenger polymyxin-B, ameliorated disease symptoms in this model [12]. In two models of spontaneous colitis, mice genetically deficient in IL-10 or intestinal epithelial cell expression of NEMO (IKK- γ), it was shown that additional deletion of the TLR-signalling adaptor protein MyD88 prevented disease progression [13,14]. Bacterial flagellin has also been implicated in IBDs, as a functional polymorphism in TLR5 was shown to negatively correlate with Crohn's disease [15] and commensal-derived flagellin has been identified as a dominant antigen in this disease [16].

Paradoxically, however, there is also evidence that TLRs play a protective role in gut defence. For example, PAMP-sensing by intestinal epithelial cells has been reported to induce the expression of bactericidal and barrier-enhancing mediators [4–6], and deficiency in TLR2, TLR4 or MyD88 was shown to result in increased mortality following DSS-induced colitis [17,18]. Deletion of TLR5 (but not other TLRs or MyD88) was also reported to lead to spontaneous colitis, but interestingly this was reversed by concurrent deletion of TLR4 in double knockout animals [19], suggesting that specific PAMPs can serve as either protective or damaging agents in different IBD models, depending on the context of their exposure.

Such findings lend useful insight to the observation that marked shifts in bacterial populations, which could alter the profile of intestinal PAMP concentrations, have been observed in human IBDs and in animal models of these diseases. In human subjects, for example, reductions in bacterial diversity are observed in active IBD [20], and Gram-negative bacteria, particularly *E. coli*, have been reported to accumulate at sites of inflammation [21–24]. Likewise, we showed recently using both culture-dependent and culture-independent techniques that marked enterobacterial overgrowth occurs in murine models of *T. gondii*-induced ileitis and DSS-induced colitis [11–13].

Taken together, these results suggest that TLR-mediated recognition of intestinal PAMPs plays a complex but key role in the modulation of IBD pathology. As very little information is currently available regarding which bacterial groups may contribute to the soluble and bacteria-associated PAMP pools in the intestine, or of how PAMP concentrations in the intestinal contents may be altered during the course of IBDs, we aimed to quantify the relative biological activities of PAMPs specific for TLR2 (lipopeptide-equivalents), TLR4 (lipopolysaccharide-equivalents) and TLR5 (flagellin-equivalents) in human and murine faecal and intestinal samples, and to establish whether the concentrations of these agents may be altered in two murine models of IBDs, *T. gondii*-induced ileitis and DSS-induced colitis.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal experiments were conducted according to German animal protection laws (LAGeso Berlin, G0170/04) with approval from the Charité-Universitätsmedizin ethical committee. Animal welfare was monitored by daily assessment of total clinical scores using combined data of weightloss, occurrence of blood in stool, and stool consistence. Faecal samples from healthy human volunteers were collected with written informed consent, although as no advertisement, reward, intervention or invasive procedures were involved, institutional review was not sought for collection of these samples, according to local ethical guidelines.

Cells and Reagents

Human embryonic kidney (HEK)-293 cells (ECACC Cat no: 85120602) and murine RAW 264.7 macrophages (ECACC Cat no: 91062702) were cultured in DMEM/10% FCS (Sigma). Flagellin of *Salmonella typhimurium* and the synthetic bacterial lipopeptide analogue Pam₃CSK₄ were from Invivogen. *Escherichia coli* R1 (NCTC-13114) derived LPS (a kind gift of Professor Ian Poxton, University of Edinburgh), was repurified by phenol re-extraction to remove TLR2-stimulating lipopeptide contaminants as described previously [25].

Murine Models of Colitis and Ileitis

For induction of colitis, C57BL/10ScSn mice bred under specific pathogen-free (SPF) conditions were treated with 3.5% (wt/vol) dextran-sodium sulphate (DSS, 40,000 kDa, MP Biomedicals, Illkirch, France) in drinking water ad libitum for seven days. Mice received water without DSS for 24 hours before sacrifice with halothan. Colon contents were then surgically removed under sterile conditions as described previously [13]. For induction of ileitis, C57/BL6 mice were infected perorally with 100 *Toxoplasma gondii* cysts in 0.3 ml PBS by gavage as described previously [12]. The contents of ~1 cm of the terminal ileum were removed under sterile conditions after 8 days and resuspended in PBS. Samples were then processed for measurement of soluble PAMP concentrations as described below.

Preparation of Murine and Human Faecal PAMP Extracts

Murine colon or ileal contents were mixed 1:4 (weight:volume) with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and vortexed briefly. This mixture was then centrifuged at 13,000 g for 20 minutes to pellet bacteria and other large particles before decanting the supernatant for filtration using a 0.45 μ m filter (Millipore) to yield sterile-filtered faecal extract (SFE), intended to be representative of the soluble PAMPs present in the gut lumen. Faecal samples from six healthy, human volunteers (age 22–33 years, 5 M, 1 F) were also processed in the same manner, although a separate aliquot of non-filtered, resuspended material was heat-treated at 100°C for 15 minutes to represent the intact, heat-killed normal flora (HKF), intended to reflect the insoluble PAMPs present in the intestine. Sterility of HKF and SFE was verified by streaking on LB-agar plates. Protein content of SFE samples was assessed by Bradford assay and adjusted to 2 mg/ml by addition of PBS. SFE concentration is presented as concentration of protein in SFE samples throughout.

Measurement of Relative Biological Activities of PAMPs in HKF and SFE

Transfection of TLR-deficient HEK-293 cells was used to measure relative biological activities of PAMP-equivalents. Cells were plated in 96-well plates at 2×10^4 cells per well and transfected after 24 h using Genejuice (Novagen). Amounts of construct (prepared as described in [26]) per well were 30 ng of human TLR2, TLR4 (co-expressing MD-2) or TLR5 (Invivogen), 30 ng of CD14, 20 ng of renilla luciferase-reporter construct and 10 ng of firefly luciferase-reporter construct driven by the NF- κ B dependent E-selectin promoter (pELAM). 3 days after transfection, cells were challenged in triplicate with indicated concentrations of defined TLR-ligands, whole heat-killed bacteria, HKF, SFE or sterile-filtered bacterial supernatants for 18 h. NF- κ B-dependent reporter expression was measured using Promega Dual-Glo reagent and normalised to co-transfected renilla expression. Fold induction was calculated relative to cells cultured in medium alone and a standard curve was prepared by plotting fold

NF- κ B induction vs concentration for each standard PAMP. For determination of relative PAMP abundance in HKF and SFE, samples were diluted until the induction of reporter occurred within the linear range of the standard curve. PAMP abundance was then calculated as ng per g faeces (wet-weight) for HKF, or per mg protein for soluble extracts. PAMP standards did not induce signalling in cells expressing heterologous TLRs, or in cells transfected with CD14 alone [27] and data not shown).

Notably, because it has been proposed that diverse ligands beyond lipopeptide- and LPS-based molecules may also contribute to signalling via TLRs [28], the TLR-stimulating capacity of each extract is expressed as a biological activity relative to that of a chosen standard lipopeptide, LPS or flagellin. For this reason, the concentration of TLR-stimulants in each sample is presented as “PAMP-equivalents” rather than *de facto* lipopeptides, LPSs or flagellins. For example, 2 μ g per g “LPS-equivalent” means that each gramme of the extract has a biological activity equivalent to that of 2 μ g *E. coli* R1 LPS in terms of its capacity to stimulate TLR4-signalling, and that this activity may derive from multiple potential TLR-ligands within the sample.

Characterisation of Molecular Species Responsible for TLR-Stimulation in SFE

To determine whether lipopeptides, LPS or flagellin may be responsible for the stimulation of TLR2, TLR4 or TLR5 respectively, SFE was treated with lipases, polymyxin-B or proteinase-K. For lipase treatment, 10 μ g/ml human SFE was treated with *Candida antarctica* lipase immobilised to inert acrylic beads (Sigma) for 18 h at 37°C. Beads were then pelleted by centrifugation and the supernatant was sterile filtered prior to assay using HEK-293-TLR2 cells. To examine LPS-signalling, 10 μ g/ml human SFE, or 100 ng/ml *E. coli* LPS, was treated with 10 μ g/ml polymyxin-B or 1 μ g/ml lipid-IVa for 10 minutes before measurement of capacity to induce TLR4-signalling using HEK-293-TLR4 cells. To determine if the TLR5 stimulants in SFE are of protein origin, human SFE (10 μ g/ml), or 500 ng/ml *S. typhimurium* flagellin was treated with proteinase-K (Sigma) for 4 h before enzyme denaturation at 80°C for 10 minutes.

Macrophage Stimulation

RAW 264.7 macrophages were plated at 5×10^4 cells per well of 96-well plates and challenged with indicated dilutions of SFE in triplicate. Supernatant TNF- α was measured at 4 h by L929 bioassay as described previously [29]. For measurement of I κ B α degradation and p38 MAPK phosphorylation, cells were plated at 8×10^5 cells per well in 6-well plates and treated with 20 μ g/mL SFE from each volunteer for 30 minutes. Cellular lysates were then separated on 12% polyacrylamide gels, blotted to nitrocellulose membranes and probed with rabbit-anti-human-I κ B α (SantaCruz, sc371), mouse-anti-phospho-p38 MAPK (Cell Signal, 9216S) or rabbit-anti-human-GAPDH (SantaCruz, sc25778).

Preparation of Heat-Killed Bacteria and Supernatants

Strains of bacteria examined were: *Eubacterium rectale* (A1-86), *Eubacterium hallii* (L2-7), *Eubacterium cylindroides* (T2-87), *Butyrivibrio fibrisolvens* (16/4), *Ruminococcus obeum*-like (Sr1/5), *Faecalibacterium prausnitzii* (S3L/3), *Megamonas hypermegale* (Art12/1), *Bacteroides distasonis* (20701), *Bacteroides eggertii* (20697) and *Bacteroides thetaiotaomicron* (B5482). *Bacteroides fragilis* (NCTC-9343) and *Bifidobacterium bifidum* cells and supernatant were kind gifts of Professor Ian Poxton (University of Edinburgh). University of Strathclyde teaching laboratory reference strains of *Escherichia coli* (NCTC-13114), *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus plantarum* (NCIMB-6376) were kind gifts of David McNeill (University of Strathclyde). Each strain was grown in respective standard broths and conditions to late log-phase and centrifuged to harvest bacterial cells (13,000 g for 5 minutes). The remaining supernatant (*ie* the growth medium from each culture) was sterile filtered and stored at -20°C prior to assay. Bacterial cell pellets were then washed and re-suspended in sterile PBS to an optical density of 1.0 at 600 nm (corresponding to approximately 10^9 bacteria per ml).

Statistical Analysis

Differences in reporter activity or cytokine levels in treated cells were compared with untreated cells using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Intestinal PAMP concentrations are reported in the results as medians of absolute values. For statistical analysis of differences between intestinal PAMP concentrations, mean \log_{10} -transformed values were compared using the Student's T-test. Differences were assumed to be significant at $P < 0.05$.

Results

Intestinal PAMP Profile Is Markedly Altered During *T. gondii*-Induced Ileitis

To determine whether intestinal PAMP concentrations may be altered in IBD, we first compared the relative abundances of TLR2, TLR4 and TLR5 stimulants in the ileal contents of healthy mice with those of mice in which inflammation of the small intestine was induced by oral administration of *T. gondii* [12]. This protocol, which results in severe Th1-type inflammation of the small intestine, has been described in detail previously [11,12]. PAMP concentrations in ileal extracts were quantified by measuring their capacity to induce NF- κ B signalling in HEK-293 cells transfected with TLR2, TLR4/MD2 or TLR5, using standard curves calibrated with Pam₃CSK₄, LPS and flagellin, respectively (examples of typical standard curves are shown in Figure 1A–C). This analysis revealed that all three classes of PAMP were of relatively low abundance in the ileum, presumably reflecting the low bacterial numbers in this part of the gut. However, the induction of ileitis was associated with dramatically increased concentrations of each of the PAMPs examined (Figure 1D–F). The median concentration of lipopeptide-equivalents increased from 26 to 9,694 ng/mg protein ($P < 0.001$), LPS-equivalents from 16 to 52,688 ng/mg protein ($P < 0.001$), and flagellin-equivalents from 49 to 1,839 ng/mg protein ($P < 0.01$), representing fold-increases of ~ 370 x, $\sim 3,300$ x and ~ 38 x, respectively.

Colonic PAMP Profile Is Significantly Altered During DSS-Induced Colitis

We next sought to determine whether intestinal PAMP concentrations may also be altered in DSS-induced colitis. In healthy mice, colonic soluble LPS concentrations were similar to those measured earlier in the terminal ileum. However, lipopeptide concentration increased ~ 40 -fold and flagellin increased ~ 25 -fold in the transition from ileum to colon in healthy mice (Figure 1, 2). The induction of colitis by DSS-treatment further increased median colonic lipopeptide-equivalent concentrations from 1,083 to 4,364 ng/mg protein ($P < 0.05$), and LPS-equivalents from 8 to 4,421 ng/mg protein ($P < 0.001$), although colonic flagellin-equivalents remained not-significantly altered (113 vs 32 ng/mg protein, $P = 0.19$). These represent fold-changes of ~ 4 x, ~ 550 x and ~ 0.28 x, respectively, following induction of colitis (Figure 2A–C).

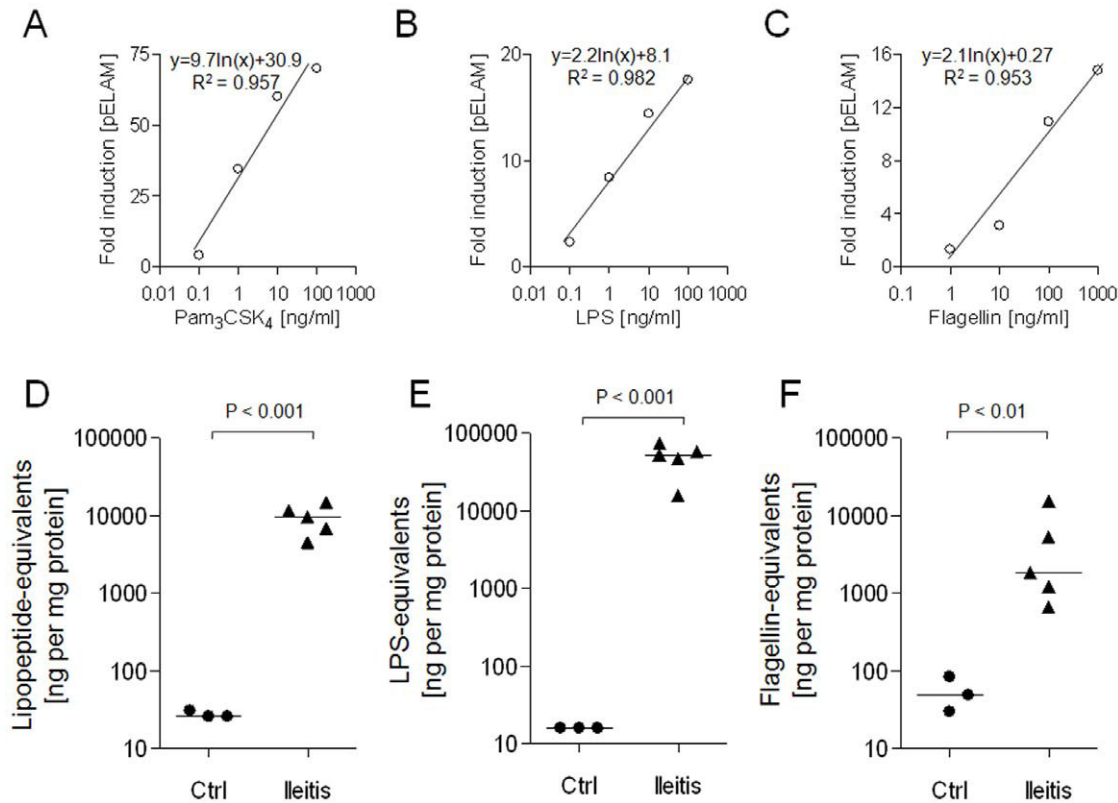


Figure 1. Effect of *T. gondii*-induced ileitis on PAMP profile of murine ileal contents. HEK-293 cells were transfected with CD14, NF- κ B sensitive reporter construct and TLR2, TLR4/MD2 or TLR5 and challenged with indicated concentrations of Pam₃CSK₄, *E. coli* LPS or *S. typhimurium* flagellin, respectively, for 18 h prior to measurement of reporter activation. Typical standard curves are shown with line-fit equations and coefficients of correlation (A–C). For measurement of PAMP-equivalent concentrations in test samples, appropriate dilutions of samples were performed until fold-induction of reporter was within the range of the standard curve. SFE was then prepared from ileal contents of uninfected control mice ($n = 3$) or from mice in which inflammation of the small intestine was induced by oral administration of *T. gondii* ($n = 5$). The relative abundances of Pam₃CSK₄- (D), LPS- (E) and flagellin-equivalents (F) present in each SFE sample were quantified and are presented as relative concentrations of Pam₃CSK₄, *E. coli* LPS or *S. typhimurium* flagellin equivalents. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g001

Determination of Relative PAMP Abundances in Healthy Human Faecal Microbiota

We next measured the relative biological activities of PAMPs present in the heat-killed microbiota derived from faeces of six healthy human subjects (Figure 3A–C). The median concentration of Pam₃CSK₄-

equivalent TLR2-stimulants was found to be approximately 10-fold higher than that of *E. coli* LPS-equivalent TLR4-stimulants (23 μ g per g faeces vs 1.9 μ g per g, $P < 0.001$). Interestingly, the insoluble flagellin content of the faecal microbiota was found to be highly variable between subjects, ranging from 0.019 to 41 μ g per g (Figure 3A–C).

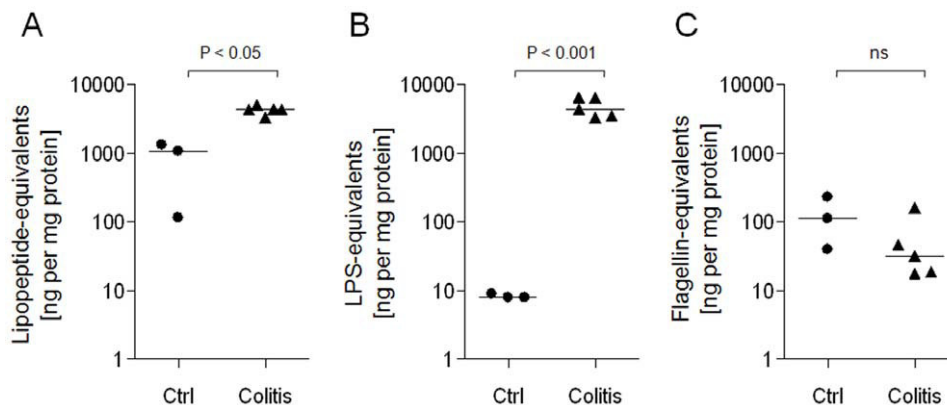


Figure 2. Effect of DSS-induced colitis on murine colonic PAMP profile. SFE was prepared from colon contents of untreated control mice ($n = 3$) or from mice in which colonic inflammation was induced by 7 days DSS-treatment ($n = 5$). The relative abundances of Pam₃CSK₄- (A), LPS- (B) and flagellin-equivalents (C) present in each SFE sample were quantified as described in the Materials and Methods. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g002

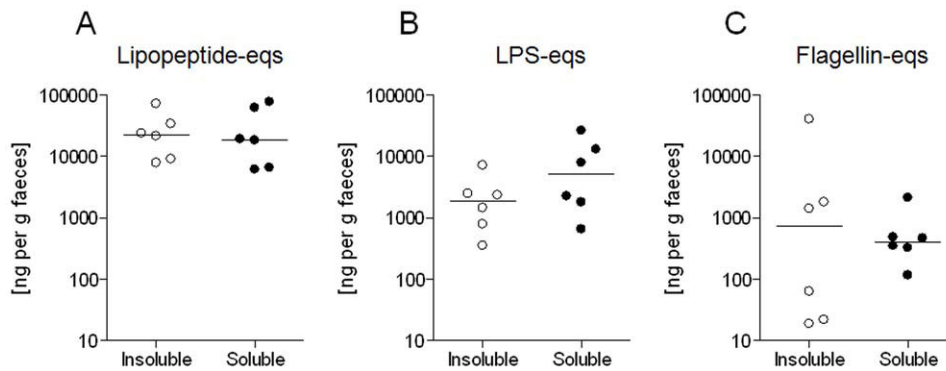


Figure 3. Relative abundance of PAMP-equivalents in normal human faecal flora. The relative abundances of PAMP-equivalents specific for TLR2 (A), TLR4 (B) and TLR5 (C) were measured in the heat-killed faecal flora from six healthy human subjects (insoluble fraction), or in SFE (soluble fraction) from the same subjects, using TLR-transfectants as described in the Materials and Methods. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g003

In order to determine whether PAMPs may also exist in appreciable quantities in the soluble, *ie* non-bacterial-cell-associated, form in the human intestine, sterile filtered extracts (SFE) prepared from faeces of the same subjects were examined. Soluble PAMP concentrations were found to be similar to the concentrations measured in the insoluble fraction in each case ($P = ns$). For example, median concentrations of soluble lipopeptide-, LPS- and flagellin-equivalents were 19, 5.1 and 0.4 μg per g faeces, respectively (Figure 3A–C). After adjustment for protein concentration, faeces of healthy human subjects therefore contained similar concentrations of lipopeptide, but approximately 10-fold higher LPS ($P < 0.05$) and 10-fold lower flagellin ($P < 0.05$) than the colon contents of healthy mice (Figure 2).

Characterisation of TLR-Stimulants Present in Human Soluble Faecal Extract

The biological activity of the soluble PAMPs present in human SFE was confirmed by the observation that RAW 264.7 macrophages demonstrated TNF- α secretion, I κ B α degradation and p38 MAPK phosphorylation in response to as little as 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SFE in a manner that was quite variable between subjects (Figure 4A–B). Separation of PAMPs in SFE by non-reducing SDS-PAGE showed that while TLR5-stimulants were of relatively high molecular weight (~ 50 – 70 kDa), lipopeptides were typically of lower molecular weight (mainly < 36 kDa), and TLR4-stimulants could not be detected in gel slice eluates (Figure 4C).

Next, as it has been suggested that other molecules of microbial, and even host, origin could also stimulate TLR2 or TLR4 signalling in addition to lipopeptides and LPS [28], we sought to further clarify which types of molecules may be responsible for stimulating TLR2, TLR4 and TLR5 signalling in human SFE. First, as covalent acylation of lipopeptides is required for their biological activity [30], we treated human SFE with immobilised lipase. This protocol significantly reduced the TLR2-stimulating capacity of SFE, suggesting that lipopeptides are a major contributor to the intestinal pool of soluble TLR2 stimulants (Figure 5A). We then took two approaches to determine if LPS may represent the TLR4-stimulating signal observed in SFE. Treatment of SFE with polymyxin-B, which sequesters LPS from TLR4/MD2, or lipid-IVa, which competitively binds to TLR4/MD2 and thereby blocks LPS signalling, both completely blocked SFE-induced TLR4-signalling (Figure 5B), suggesting that LPS is the sole TLR4 stimulant present in SFE. Finally, we found that proteinase-K treatment blocked completely TLR5-signalling

induced by flagellin or SFE, suggesting that the TLR5 stimulant in SFE is a protein, most likely flagellin (Figure 5C).

PAMP Expression by Cultured Representatives of Major Gut Bacterial Groups

As the expression of PAMPs specific for TLRs 2, 4 and 5 by many of the major gut-bacterial groups has not yet been established, we aimed to characterise which PAMPs may be expressed by representatives of the major gut-bacterial groups and related organisms. HEK-293 cells transfected with CD14 and reporter alone (*ie* without TLRs) were insensitive to all of the bacteria examined, indicating the specificity of each TLR-transfection assay (Figure 6A). As expected, every bacterial strain examined stimulated robust TLR2-dependent signalling, confirming the notion that the majority of bacteria express some form of lipopeptide (Figure 6B). TLR4-dependent signalling was observed in response to all of the enterobacterial species examined (*E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* and *P. vulgaris*) (Figure 6C). Notably, however, no TLR4-dependent signalling was observed in response to any of the *Bacteroides* strains examined, including *B. thetaiotaotomicron*, *B. fragilis* and *B. distasonis*. TLR5-dependent signalling was observed in response to the expected motile Gram-negative bacteria (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*), but also to *Eubacterium rectale* and *Butyrivibrio fibrisolvens*, suggesting that flagella of motile Gram-positive organisms present in the gut may also stimulate TLR5 signalling (Figure 6D).

Comparative Shedding of Soluble PAMPs by Gram-Negative and Gram-Positive Organisms

As it is possible that soluble PAMPs may be more likely to cross damaged epithelium to stimulate responsive underlying tissues than PAMPs that remain attached to whole bacteria, we next aimed to determine which major classes of bacteria may contribute to the soluble PAMP pools in the gut. We first confirmed that each bacterial strain examined stimulated macrophage TNF- α production in response to direct contact with intact organisms (Figure 7A). However, while filter-sterilised culture supernatants of enterobacterial species such as *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* stimulated macrophage TNF- α production at dilutions from 1:1,000 to 1:10,000, those of four Gram-positive organisms (*L. plantarum*, *B. bifidum*, *E. faecalis* and *S. aureus*), or the Gram-negative *B. fragilis*, stimulated macrophages only at a dilution of 1:10, or not at all (Figure 7B). Soluble stimulants of TLR4 and TLR5 were found to be shed by *E. coli*, *S.*

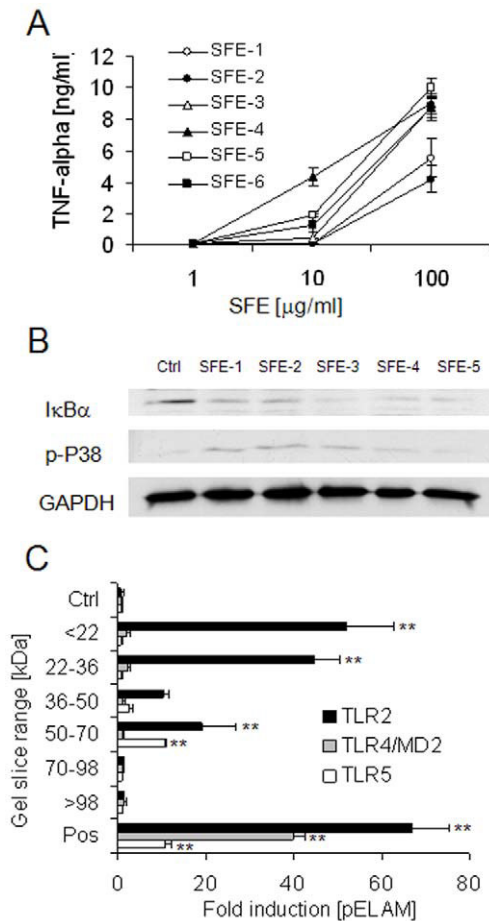


Figure 4. Biological activity of soluble PAMPs present in normal human faeces. (A) RAW macrophages were challenged with 1, 10 or 100 µg/ml SFE of six healthy subjects and TNF- α was measured at 4 h. Mean \pm SD shown. (B) RAW macrophages were challenged with 20 µg/ml sterile-filtered extract (SFE) of 5 healthy human volunteers. Degradation of I κ B α and phosphorylation p38 MAPK were examined at 30 minutes by western blot. (C) SFE (20 µg total protein) of three healthy subjects was separated by non-reducing SDS-PAGE and PAMPs were eluted from gel-slices corresponding to indicated molecular weight ranges in PBS. HEK-293 cells transfected with TLR2, TLR4/MD2 or TLR5 were challenged with each eluate diluted 1:25 in culture medium. Responses are displayed as mean fold induction of NF- κ B reporter (pELAM) \pm SD. ** $P < 0.01$ vs cells cultured in medium alone. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g004

typhimurium and *P. aeruginosa*, but not *B. fragilis* or the Gram-positive organisms examined (Figure 7C). Next, using TLR2-transfectants to examine bacterial shedding of lipopeptides, we found that while the enterobacterial species examined are prolific shedders of lipopeptide, Gram-positive organisms released little or no soluble TLR2-stimulants into their surroundings and *B. fragilis* displayed an intermediate phenotype (Figure 7D).

Discussion

It is now widely accepted that the destructive cycles of inflammation observed in IBDs are potentiated by inappropriate responses towards the host intestinal microbiota [1]. However, it is not yet clear how the gut remains tolerant of the inflammatory molecules expressed by the commensal microbiota in health, nor why this tolerance should become broken during episodes of disease. Recent evidence suggests that the stimulation of Toll-like receptors

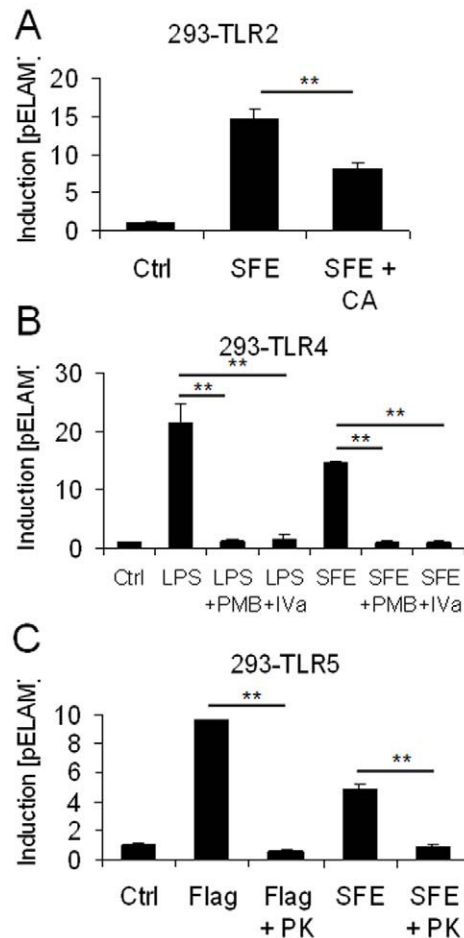


Figure 5. Characterisation of TLR-stimulants present in human soluble faecal extract. (A) Human SFE (10 µg/ml) was treated with immobilised lipase for 18 h at 37°C, and then assayed for potential to stimulate TLR2 signalling in HEK-293-TLR2 cells. (B) Human SFE (10 µg/ml), or 100 ng/ml *E. coli* LPS, was treated with 10 µg/ml polymyxin-B or 1 µg/ml lipid-IVa for 10 minutes before addition to HEK-293-TLR4 cells to measure capacity to induce TLR4-signalling. (C) Human SFE (10 µg/ml), or 500 ng/ml *S. typhimurium* flagellin was treated with proteinase-K for 4 h before enzyme denaturation at 80°C for 10 minutes, before application to HEK-293-TLR5 cells to measure capacity to induce TLR5-signalling. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g005

(TLRs) by PAMPs expressed and released by intestinal bacteria may contribute to the propagation of IBDs [2,7–12,31,32], leading to the suggestion that elevated intestinal PAMP concentrations could represent a risk factor for disease progression [10–12,32]. As very little information is currently available regarding PAMP concentrations in the luminal contents of the healthy and diseased gut, or of which major bacterial groups may contribute to the intestinal PAMP pools, we sought to employ a novel bioassay-based approach to address these outstanding questions.

Our results reveal for the first time that the induction of colitis or ileitis in mice is associated with marked increases in the luminal concentrations of PAMPs specific for TLR2, TLR4 and/or TLR5. Moreover, we found that these changes were disease-specific; ileitis being associated with marked increases in concentrations of lipopeptide-, LPS- and flagellin-equivalents while colitis was associated with a modest increase in lipopeptide concentrations, a large increase in LPS and no change to flagellin concentrations. Such marked differences in intestinal PAMP concentrations are

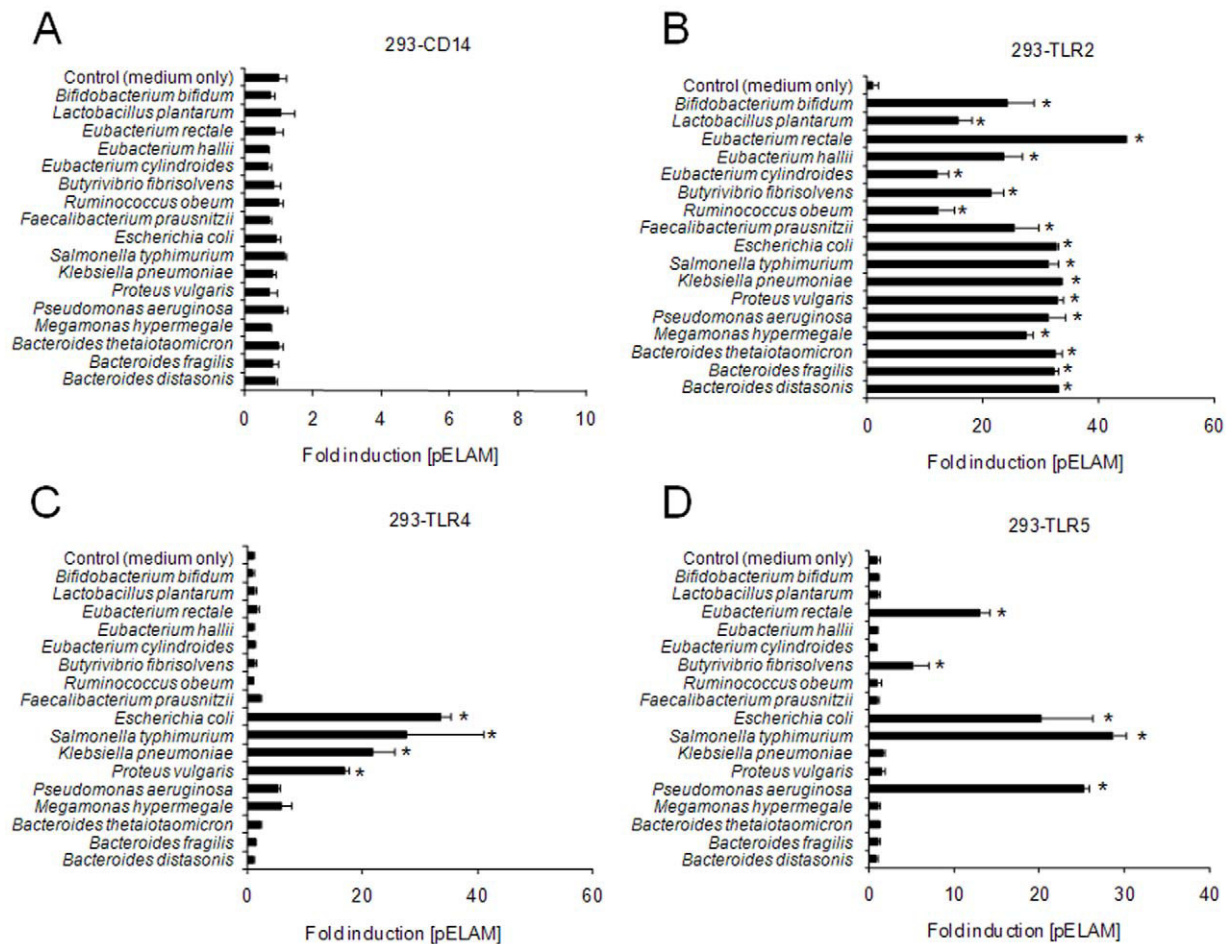


Figure 6. Profiles of TLR-stimulation induced by representative gut bacterial strains. Heat-killed bacteria of indicated species were applied to HEK-293 cells transfected with CD14, NF- κ B sensitive reporter construct and TLR2, TLR4/MD2 or TLR5 at a concentration of $\sim 10^7$ cells per ml. Responses are displayed as mean fold induction of NF- κ B reporter (pELAM) \pm SD relative to cells cultured in medium alone. * $P < 0.05$ vs medium alone.

doi:10.1371/journal.pone.0009125.g006

suggestive of major shifts in the relative abundances of the bacterial groups that make up the intestinal flora. Accordingly, many previous studies have reported that the microbiota can change markedly during IBDs in human subjects and in animal models [20–24]. In particular, with respect to the specific models examined here (*ie T. gondii*-induced ileitis and DSS-induced colitis), we have shown previously using both culture-dependent and culture-independent methods that a reduction in bacterial diversity and a dramatic increase in the numbers of enterobacterial species occurs in both conditions [11–13].

The relevance of the latter finding is highlighted by the present study, as we show that enterobacterial species are likely to represent not only dominant contributors to the pool of soluble TLR4 stimulants in the gut, but also major contributors to the pools of soluble pro-inflammatory and TLR2-stimulating agents in the gut. This conclusion is drawn from the observation that several members of the other numerically major Gram-negative group, *Bacteroides* species, did not stimulate TLR4-signalling (Figure 6C). Moreover, we found that the shedding of pro-inflammatory stimulants by enterobacterial species was several orders of magnitude higher than that observed from *Bacteroides* species and Gram-positive commensal organisms such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* (Figure 7B, D). Taken together, these findings suggest that despite their numerically minor presence in the gut, the

enterobacteria may nevertheless represent prominent contributors to the intestinal pools of potentially pro-inflammatory agents. The *in vitro* and *in vivo* findings of the present study therefore support previous observations of a large expansion of enterobacterial numbers in both DSS-induced colitis and *T. gondii*-induced ileitis [11–13]. In particular, our previous culture analysis of the microbiota of the inflamed colon suggested that numbers of *Bacteroides/Prevotella* spp., enterococci, clostridia and lactobacilli were not significantly altered by DSS-treatment, while enterobacterial species expanded by several orders of magnitude, further suggesting that the increase in TLR2 and TLR4 stimulants is driven by the overgrowth of enterobacterial species, rather than other groups [13]. In the *T. gondii*-induced ileitis model, 16S gene sequence analysis revealed that ileal lactobacilli, bifidobacteria and clostridia disappeared and were replaced with enterobacterial and bacteroides species, suggesting that enterobacterial overgrowth drives not only the increase in TLR2 and TLR4 stimulants in this model, but also the increase in TLR5-stimulants [12].

It should be noted that the PAMP-profiling assay we have described has specific advantages and limitations in comparison with alternative methods of examining alterations to the intestinal microbiota. For example, although the assay is culture-independent, requires no knowledge of target organism DNA-sequences and is not biased towards particular groups arising from primer

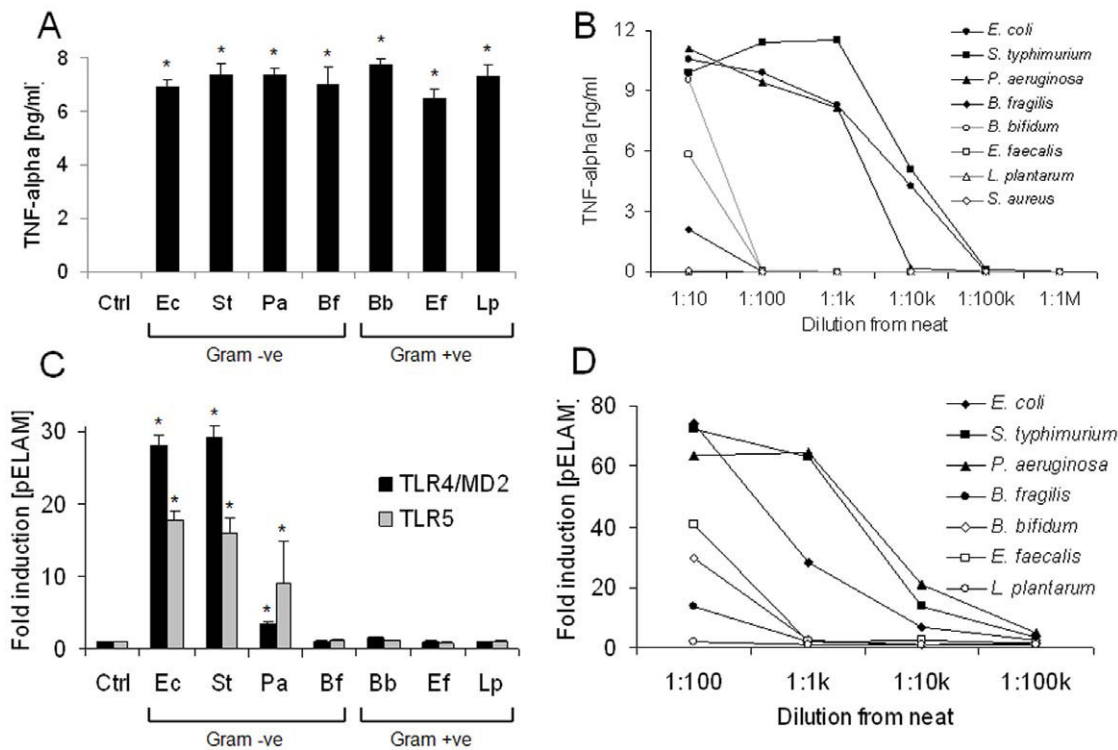


Figure 7. Soluble PAMP secretion by Gram-positive and Gram-negative organisms. (A) TNF- α release was measured from RAW macrophages exposed to whole heat-killed bacteria from a panel of representatives (Gram -ve: *E. coli* (Ec), *S. typhimurium* (St), *P. aeruginosa* (Pa), *B. fragilis* (Bf); Gram +ve: *B. bifidum* (Bb), *E. faecalis* (Ef), *L. plantarum* (Lp), *S. aureus* (Sa)), at a concentration of $\sim 10^7$ bacteria per ml. (B) Serial ten-fold dilutions of sterile-filtered supernatants from each bacterial culture were made in DMEM/10% FCS, added to RAW macrophages in triplicate and TNF- α release was measured at 4 h. (C) HEK-293 cells transfected with TLR4/MD2 or TLR5, were challenged with sterile filtered growth supernatants (1:100). (D) HEK-293 cells transfected with TLR2 were challenged with 10-fold serial dilutions of each sterile-filtered supernatant. Data shown are representative of at least three independent experiments. * $P < 0.01$ vs cells cultured in medium alone. doi:10.1371/journal.pone.0009125.g007

design, cloning efficiency or antibody-specificity, it cannot provide information regarding specific groups or species of bacteria or the exact molecular species contributing to each TLR-signal. For this reason, and as there is some debate as to the diversity of ligands that may be recognised by TLR2 and TLR4 [28], we aimed to clarify which types of molecules may be responsible for the stimulation of these TLRs in SFE. Since both lipid-IVa and polymyxin-B completely blocked TLR4 signalling induced by SFE, it seems likely that LPS is the only TLR4 stimulant present in SFE (Figure 5B). However, as we found that lipases blunted, but did not eliminate, the TLR2-signal induced by SFE (Figure 5A), we cannot exclude the possibility that other proposed TLR2 stimulants, such as lipoteichoic acid or *Bacteroides* LPS may also contribute to the TLR2-signal induced by SFE [33,34]. Thus, although we note that others have proposed that contaminating lipopeptides may account for the previously reported TLR2-stimulating properties of peptidoglycan and lipoteichoic acid [35,36], we refer to the TLR-stimulants measured in each assay as “PAMP-equivalents”, rather than *de facto* lipopeptides or lipopolysaccharides.

A key question that remains to be addressed in future studies is whether increased concentrations of luminal PAMPs serve merely as markers, or as mediators of IBDs. Evidence that they may serve as disease mediators is present in our earlier observations that oral administration of *E. coli* lipid-A markedly promotes *T. gondii*-induced ileitis in mice, while neutralisation of intestinal LPS by treatment with polymyxin-B reduced the severity of ileitis [11,12]. Likewise, rectal administration of LPS was shown to promote

colitis in rabbits [8], and administration of the TLR9 agonist CpG-ODN enhanced DSS-induced colitis in mice [10]. Furthermore, rectally applied *S. typhimurium* flagellin was found to aggravate colonic inflammation and increase mortality in DSS-induced colitis [37]. However, the data obtained from studies of mice deficient in TLRs suggest a more complex role for PAMP recognition in the gut, as both barrier protective [4–6,17–19] and pro-inflammatory roles [7,8,11–16,32] for TLR-mediated PAMP recognition in the gut have been reported.

One possible way of conciliating these views is to suggest that while PAMP sensing by epithelial cells serves to enhance barrier function, if the barrier eventually fails and PAMPs reach the more sensitive underlying cells and tissues, inflammation may be triggered to protect the host from translocating bacteria. This notion is supported by the fact that while the intact colon is largely unresponsive to exogenously applied flagellin, LPS or lipoteichoic acid [9,37–39], when the epithelial barrier is disrupted by agents such as DSS, diverse PAMPs can trigger overt inflammation and damage [10–12,37,38]. Furthermore, as we found that high concentrations of PAMPs are generated in the ileum of *T. gondii*-infected mice, yet colonic inflammation is not observed despite the fact that these PAMPs should pass to the colons of these mice, our data further support the notion that even very high concentrations of PAMPs are not alone sufficient to induce intestinal inflammation when the epithelial barrier is intact. Studies involving cell-type specific deletion of TLRs, rather than systemic knockouts as currently reported, will likely be required to shed further light on this complex issue.

In summary, we conclude that while the healthy gut contains appreciable quantities of soluble ligands of TLR2, TLR4 and TLR5, the relative abundances of stimulants of these receptors can increase dramatically during the course of murine IBDs. Future studies are warranted to establish whether such alterations to PAMP profiles are also observed in human IBDs, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, and whether such alterations serve as markers or as mediators of these diseases. If the latter turns out to be evident, studies are also warranted to investigate whether normalisation of intestinal PAMP concentrations may possess therapeutic potential for these diseases.

References

- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, et al. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44–54.
- Levin A, Shibolet O (2008) Toll-like receptors in inflammatory bowel disease—stepping into uncharted territory. *World J Gastroenterol* 14: 5149–5153.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782–786.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126–1130.
- Vaishnavya S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20858–20863.
- Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbin B, et al. (2006) Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol* 169: 1686–1700.
- Lange S, Delbro DS, Jennische E, Mattsby-Baltzer I (1996) The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. *APMIS* 104: 823–833.
- Hotta T, Yoshida N, Yoshikawa T, Sugino S, Kondo M (1986) Lipopolysaccharide-induced colitis in rabbits. *Res Exp Med (Berl)* 186: 61–96.
- Sanders CJ, Yu Y, Moore III DA, Williams IR, Gewirtz AT (2006) Humoral immune response to flagellin requires T-cells and activation of innate immunity. *J Immunol* 177: 2810–2818.
- Obermeier F, Dunger N, Deml L, Herfarth H, Schölmerich J, et al. (2002) CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. *Eur J Immunol* 32: 2084–2092.
- Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, et al. (2007) Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56: 941–948.
- Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, et al. (2006) Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 177: 8785–8795.
- Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, et al. (2007) Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS ONE* 2: e662.
- Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R (2006) Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 25: 319–329.
- Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr SR, Nicolae DL, et al. (2006) Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1157–1163.
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, et al. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 113: 1296–1306.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229–41.
- Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, et al. (2005) MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 40: 16–23.
- Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, et al. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 117: 3909–3921.
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, et al. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53: 685–693.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43: 3380–3389.
- Masseret E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, et al. (2001) Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* 48: 320–325.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, et al. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52: 237–242.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412–421.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ (2000) Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signalling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 165: 618–622.
- Erridge C, Webb DJ, Spickett CM (2007) Toll-like receptor 4 signalling is neither sufficient nor required for oxidised phospholipid mediated induction of interleukin-8 expression. *Atherosclerosis* 193: 77–85.
- Erridge C, Burdess A, Jackson AJ, Murray C, Riggio M, et al. (2008) Vascular cell responsiveness to Toll-like receptor ligands in carotid atheroma. *Eur J Clin Invest* 38: 713–720.
- Tsan MF, Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukocyte Biol* 76: 514–519.
- Delahooke D, Barclay G, Poxton IR (1996) TNF- α induction by an aqueous phenol-extracted lipopolysaccharide complex from *Bacteroides* species. *Infect Immun* 63: 840–846.
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, et al. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130: 1071–1082.
- Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, et al. (2005) CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 129: 913–927.
- Fort MM, Mozaffarian A, Stöver AG, Correia Jda S, Johnson DA, et al. (2005) A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 174: 6416–6423.
- Deininger S, Stadelmaier A, von Aulock S, Morath S, Schmidt RR, et al. (2003) Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J Immunol* 170: 4134–4138.
- Erridge C, Pridmore A, Eley A, Stewart J, Poxton IR (2004) Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J Med Microbiol* 53: 735–740.
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, et al. (2004) Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5: 1000–1006.
- Hashimoto M, Furuyashiki M, Kaseya R, Fukada Y, Akimaru M, et al. (2007) Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction. *Infect Immun* 75: 1926–1932.
- Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M, et al. (2005) Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13610–13615.
- Dionne S, Laberge S, Deslandres C, Seidman EG (2003) Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 133: 108–114.
- Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, et al. (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 170: 1406–1415.

Acknowledgments

We thank David McNeill (University of Strathclyde) and Professor Ian Poxton (University of Edinburgh) for kind gifts of bacterial strains, and Professor Harry Flint for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CE SHD SB MMH. Performed the experiments: CE SHD SB MMH. Analyzed the data: CE. Contributed reagents/materials/analysis tools: CE SHD SB MMH. Wrote the paper: CE.

2.5. Wechselwirkungen zwischen *Campylobacter jejuni*, der kommensalen Darmmikrobiota und dem Immunsystem der Maus

(Bereswill, S., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L.-M., Otto, B., Kühl, A.A., Dashti, J.I., Zautner, A.E., Munoz, M., Loddenkemper, C., Groß, U., Göbel, U.B., **Heimesaat, M.M.** Novel murine infection models provide deep insights into the “ménage à trois” of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity”, PLoS One, 06/2011, e20953, 6)

In dieser Arbeit untersuchten wir die Wechselwirkungen zwischen *Campylobacter jejuni*, der kommensalen Darmmikrobiota und dem Immunsystem der Maus. Da die physiologische Kolonisationsresistenz, die maßgeblich durch die Zusammensetzung der murinen Darmmikrobiota determiniert ist, konventionelle Mäuse vor einer stabilen *C. jejuni*-Infektion schützt, waren *in vivo*-Studien mit diesem Pathogen im Mausmodell bislang erschwert. Um diese Limitation zu umgehen, modifizierten wir die murine Darmmikrobiota auf verschiedene Weise. So wurden gnotobiotische Mäuse mittels Breitspektrum-Antibiotikabehandlung generiert und diese mit einer komplexen humanen versus murinen Mikrobiota mittels oraler fäkaler Transplantation rekonstituiert. Bemerkenswerterweise konnten sich sowohl die murine als auch die humane Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt gnotobiotischer Mäuse stabil etablieren. Während das Pathogen innerhalb weniger Tage nach peroraler Infektion bei mit einer murinen Mikrobiota rekonstituierten Tieren nicht mehr nachweisbar war, konnten im Gastrointestinaltrakt sowohl gnotobiotischer als auch mit einer humanen Mikrobiota ausgestatteter Mäuse hohe *C. jejuni*-Lasten nachgewiesen werden. Weiterhin kam es bei den stabil infizierten Tieren zu pro-inflammatorischen Immunantworten im Kolon, die durch einen vermehrten Einstrom von T- und B-Lymphozyten, regulatorischen T-Zellen sowie neutrophilen Granulozyten in die Lamina propria, einer erhöhten Apoptoserate des Kolonepithels und einer gesteigerten Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und MCP-1 gekennzeichnet war. Um die molekularen Mechanismen der Pathogen-Wirts-Interaktionen im Folgenden näher zu beleuchten, wurden Mäuse, die für MyD88, TRIF, TLR-4 oder TLR-9 gendefizient waren, in die Untersuchungen mit eingebunden. Wir konnten hierbei zeigen, daß die *C. jejuni*-induzierte Immunpathologie von TLR-4 und TLR-9 abhängig war. Schließlich wurden gnotobiotische sowie florentechnisch “humanisierte” Mäuse mit

zwei *C. jejuni*-Stämmen infiziert, die bestimmte Mutationen im Ameisensäure-Metabolismus aufwiesen. Nach peroraler Infektion mit den mutierten Pathogen-Isolaten waren die *C. jejuni*-induzierten Immunpathologien weniger stark ausgeprägt als nach Infektion mit dem Wildtypstamm. Zusammenfassend, spielen die durch TLR-4 und TLR-9 des Wirtes vermittelte Erkennung von *C. jejuni*-Lipooligosaccharid und -CpG-DNA eine maßgebliche Rolle bei der *C. jejuni*-induzierten Immunpathologie. Des Weiteren sind die Wirtsantworten auf eine *C. jejuni*-Infektion eng mit dem bakteriellen Ameisensäure-Stoffwechsel verknüpft. Aus den geschilderten Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß gnotobiotische Mäuse, bei denen die konventionelle Darmmikrobiota eradiziert wurde, sowie mit einer komplexen humanen Mikrobiota rekonstituierte Tiere wertvolle neue *C. jejuni*-Infektions- und Inflammationsmodelle darstellen, die tiefere Einblicke in die molekularen Grundlagen des Wechselspiels zwischen *C. jejuni*, der Mikrobiota und dem angeborenen Immunsystem bei der Campylobacteriose eröffnen.

Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the “Ménage à Trois” of *Campylobacter jejuni*, Microbiota and Host Innate Immunity

Stefan Bereswill¹, André Fischer¹, Rita Plickert¹, Lea-Maxie Haag¹, Bettina Otto¹, Anja A. Kühl², Javid I. Dashti³, Andreas E. Zautner³, Melba Muñoz¹, Christoph Loddenkemper², Uwe Groß³, Ulf B. Göbel¹, Markus M. Heimesaat^{1*}

1 Department of Microbiology and Hygiene, Charité - University Medicine Berlin, Berlin, Germany, **2** Department of Pathology/Research Center ImmunoSciences (RCIS), Charité - University Medicine Berlin, Berlin, Germany, **3** Department of Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

Abstract

Background: Although *Campylobacter jejuni*-infections have a high prevalence worldwide and represent a significant socioeconomic burden, it is still not well understood how *C. jejuni* causes intestinal inflammation. Detailed investigation of *C. jejuni*-mediated intestinal immunopathology is hampered by the lack of appropriate vertebrate models. In particular, mice display colonization resistance against this pathogen.

Methodology/Principal Findings: To overcome these limitations we developed a novel *C. jejuni*-infection model using gnotobiotic mice in which the intestinal flora was eradicated by antibiotic treatment. These animals could then be permanently associated with a complete human (hfa) or murine (mfa) microbiota. After peroral infection *C. jejuni* colonized the gastrointestinal tract of gnotobiotic and hfa mice for six weeks, whereas mfa mice cleared the pathogen within two days. Strikingly, stable *C. jejuni* colonization was accompanied by a pro-inflammatory immune response indicated by increased numbers of T- and B-lymphocytes, regulatory T-cells, neutrophils and apoptotic cells, as well as increased concentrations of TNF- α , IL-6, and MCP-1 in the colon mucosa of hfa mice. Analysis of MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR9^{-/-} mice revealed that TLR4- and TLR9-signaling was essential for immunopathology following *C. jejuni*-infection. Interestingly, *C. jejuni*-mutant strains deficient in formic acid metabolism and perception induced less intestinal immunopathology compared to the parental strain infection. In summary, the murine gut flora is essential for colonization resistance against *C. jejuni* and can be overcome by reconstitution of gnotobiotic mice with human flora. Detection of *C. jejuni*-LPS and -CpG-DNA by host TLR4 and TLR9, respectively, plays a key role in immunopathology. Finally, the host immune response is tightly coupled to bacterial formic acid metabolism and invasion fitness.

Conclusion/Significance: We conclude that gnotobiotic and “humanized” mice represent excellent novel *C. jejuni*-infection and -inflammation models and provide deep insights into the immunological and molecular interplays between *C. jejuni*, microbiota and innate immunity in human campylobacteriosis.

Citation: Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag L-M, Otto B, et al. (2011) Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the “Ménage à Trois” of *Campylobacter jejuni*, Microbiota and Host Innate Immunity. PLoS ONE 6(6): e20953. doi:10.1371/journal.pone.0020953

Editor: Dennis W. Metzger, Albany Medical College, United States of America

Received: February 25, 2011; **Accepted:** May 13, 2011; **Published:** June 15, 2011

Copyright: © 2011 Bereswill et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG) to UG (GR906/13-1, CampyGerm), UBG (GO363/12-1, CampyGerm; SFB633, TP A7), AK and CL (SFB633, TP Z1), MM and MMH (SFB633, TP B6), LMH and BO (SFB633, Immuco), and from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) to SB (TP1.1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: markus.heimesaat@charite.de

Introduction

In industrialized countries *Campylobacter jejuni* is among the most frequent causative agents of bacterial enteritis [1]. The Gram-negative pathogen is transmitted via the food chain from farm animals to humans by the ingestion of undercooked meat, non-pasteurized milk, and water [2,3]. After infection *C. jejuni* colonizes the human distal small intestine and colon. Clinical symptoms include abdominal pain, fever, myalgia, and watery or bloody diarrhea. After active invasion of colonic epithelial cells, *C. jejuni* induces mucosal inflammation characterized by neutrophil infiltration, crypt abscesses, focal ulcerations, and plasma cell

proliferation [4–6]. Although the vast majority of infections are self-limited, in some cases infection might result in chronic sequelae such as Reiter’s syndrome, reactive polyarthropathy, and Guillain-Barré syndrome [2,7].

Whereas colonization factors of *C. jejuni* are well known [8], the molecular mechanisms underlying immunopathology of *C. jejuni*-infection in the host are still poorly understood. Insights into *C. jejuni*-host interactions are limited due to the scarcity of suitable experimental *in vivo* models [9]. While chickens are well suited to investigate colonization, vertebrate models using newborn pigs, weanling ferrets, gnotobiotic canine pups, and primates have numerous limitations including high costs, handling issues, and

a lack of reproducibility [9,10]. Mice are highly convenient for the study of bacterial pathogenicity and can help to overcome several of these limitations. Murine models of *C. jejuni*-infection, however, have the disadvantage of sporadic colonization and/or absence of clinical disease manifestations [1]. This is in part due to the colonization resistance against *C. jejuni* displayed by conventional mice with a normal commensal microflora. The use of germfree animals or mice with a limited gut flora has alleviated these shortcomings with varying degrees of success [10,11]. It was demonstrated earlier that *C. jejuni* colonized the entire gastrointestinal (GI) tract of isolator-raised germfree mice and induced clinical signs of disease including granulocyte infiltrates, bloody diarrhea, and humoral immune responses, reproducibly occurring after infection [12–16]. However, germfree mice have an abnormal development of gut-associated lymphoid tissue [17,18]. Therefore, germfree mice might not represent a suitable experimental model of *C. jejuni*-infections in humans due to the lack of an intact innate immune system. Furthermore, mice deficient in the central innate immunity adaptor protein MyD88 essential in Toll-like receptor (TLR) signaling were stably colonized by *C. jejuni* but did not develop intestinal inflammation [19]. Interaction of *C. jejuni* with individual TLRs, namely TLR2, TLR4, and TLR9 recognizing bacterial lipoproteins (LP), lipopolysaccharide (LPS), or CpG-DNA, respectively, still await detailed investigation particularly *in vivo* and in the intestines *in situ*. In many *in vitro* studies, however, TLR signaling could be demonstrated to be involved in *C. jejuni*-induced immune responses. Whereas *C. jejuni* bacteria were not recognized by human TLR5 [20], live and lysed *C. jejuni* cells activated TLR2, TLR4 and TLR9 via MyD88 in different human, murine or avian cell lines [21–25]. The role of TLR9 signaling in human *C. jejuni* enteritis is not clear yet. *C. jejuni* activated avian, but not human TLR9 transiently expressed in a transfected cancer cell line *in vitro* [21]. However, the role of TLR9 in *C. jejuni* enteritis has not been investigated *in vivo* so far. For proper LPS-mediated TLR4 activation, the adapter proteins MyD88 or TRIF are essentially required [26]. In recent studies, IL-10 deficient mice harboring a conventional gut flora developed significant signs of intestinal immunopathology following *C. jejuni*-infection [27–29]. In addition, enteritis and bacterial translocation were also observed in TLR4^{-/-} IL-10^{-/-} double deficient mice [29]. Taken together, these results point towards pivotal functions of the host-specific gut microflora and the innate immune system in both, infection control and inflammation.

In order to optimize murine models for *C. jejuni* enteritis mimicking human immunopathology, we used our gnotobiotic murine model in which the intestinal flora was completely eradicated by quintuple antibiotic treatment [30–32]. Then, we reconstituted these germfree mice with a complete human gut flora to display the human intestinal environment in mice with a fully developed immune system. The results obtained with *C. jejuni*-infected gnotobiotic or “humanized” mice presented here prove for the first time that the host specific gut flora plays a crucial role in colonization resistance against *C. jejuni*. Furthermore, we demonstrate that TLR4- and, strikingly, TLR9-mediated signaling are essentially involved in *C. jejuni*-induced immunopathology. Lastly, we show that the host responses to *C. jejuni* infection are tightly coupled to the pathogen’s formic acid metabolism and perception essential for cell invasion fitness by analyzing the respective deletion mutants in our novel *in vivo* models. Thus, our results presented here indicate for the first time that gnotobiotic mice reconstituted with human gut flora provide deep insights into the “ménage à trois” of *C. jejuni*, human commensal gut flora and the host innate immune system.

Results

Gnotobiotic mice as a novel model for studying *C. jejuni* - host interactions

Given that the commensal murine gut microbiota is essential for the resistance against *C. jejuni* colonization and thus suitable mouse models of *C. jejuni*-infection are scarce, we established a novel murine experimental system to investigate the interplay (“ménage à trois”) of the gut microbiota and innate immune system on the host side with the pathogen after oral *C. jejuni*-infection and permanent intestinal colonization. For this purpose, we generated gnotobiotic mice by quintuple antibiotic treatment for six weeks (refer to [30]). It was essential to handle these animals under strictly sterile conditions throughout the entire antibiotic treatment and experimental procedures in order to prevent from secondary contaminations. Results from cultural and molecular analyses confirmed that these gnotobiotic mice were completely free of any culturable and non-culturable bacteria (**Fig. S1**). Similar to isolator-raised germfree animals, the antibiotics-treated mice developed a mega-cecum that is a characteristic morphologic indicator for a sterile gut.

We determined the colonization capacity of *C. jejuni* in gnotobiotic mice after antibiotic treatment as compared to mice harboring a conventional gut flora following peroral infection with the *C. jejuni* reference strains ATCC 43431 [33,34], 81–176 [35,36] and B2 [37]. These strains originate from humans with severe enteritis, are invasive *in vitro* and were extensively investigated in earlier studies. *C. jejuni* 81–176 carries a virulence plasmid that encodes components of a type IV protein secretion machinery [38].

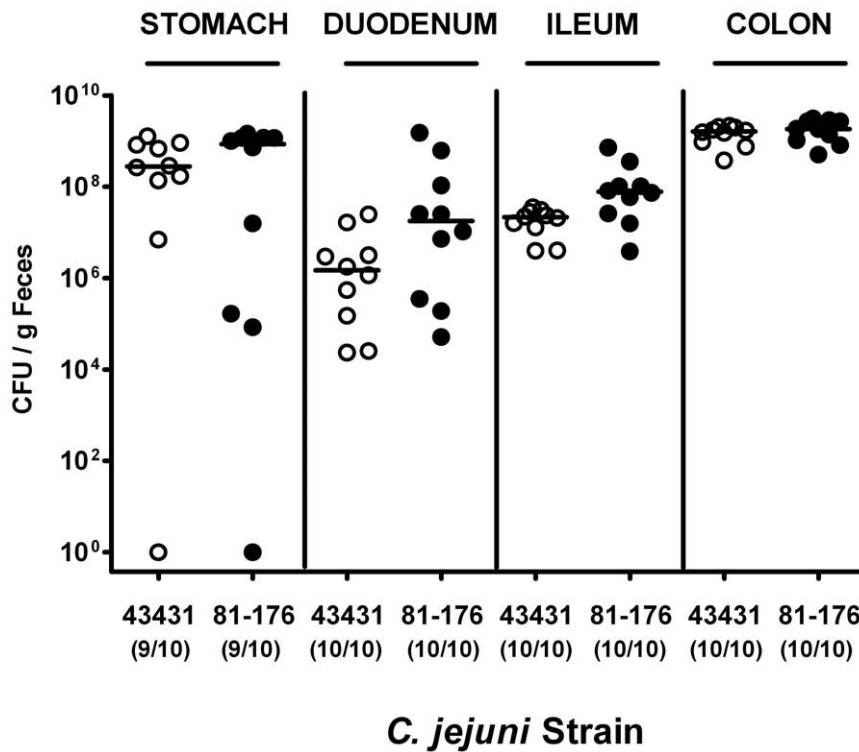
The results confirmed that conventional mice bred in our SPF facilities display a strong colonization resistance, as at the time of necropsy at day (d) 12 post infection (p.i.) *C. jejuni* irrespective of the strain used could not be detected in fecal samples in the majority of the animals (**Fig. S2**). Kinetic studies revealed that *C. jejuni* was expelled from the GI tract already within 48 hours after infection (data not shown). Strikingly, colonization resistance was completely abrogated in gnotobiotic mice generated by quintuple antibiotic treatment as all three *C. jejuni* strains colonized at high concentrations of 10⁹–10¹⁰ colony forming units (CFU) per gram fecal sample at day 12 p.i. (**Fig. S2**).

In addition, *C. jejuni* densities within the GI tract of gnotobiotic mice were analyzed in more detail (**Fig. 1**). Following peroral infection, *C. jejuni* ATCC 43431 and 81–176 readily colonized the stomach, duodenum, ileum and colon at comparable levels with the highest bacterial loads in the large intestine reaching >10⁹ CFU per gram luminal content at d12 p.i.. Kinetic experiments revealed that in gnotobiotic animals, *C. jejuni* colonization was stable throughout a time period of more than 100 days p.i. (data not shown), indicating that this model is well suited to examine long-term evolution and host-adaptation of the pathogen *in vivo*.

TLR4 and TLR9 play an important role in *C. jejuni* immunopathology

In order to investigate the role of TLR4 and TLR9 signaling in the development of immunopathology after stable *C. jejuni* colonization *in vivo*, we generated gnotobiotic mice deficient in TLR4, TLR9, MyD88 or TRIF by antibiotic treatment.

At day 12 following peroral infection with *C. jejuni* ATCC 43431, significant histopathological changes in colon sections of wildtype (WT) mice such as loss of goblet cells, crypt elongation, and immune cell infiltration could be observed which were less pronounced in infected TLR4-deficient mice (Figure S3). In order



C. jejuni Strain

Figure 1. *C. jejuni* colonization along the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. Gnotobiotic mice generated by antibiotic gut decontamination were orally infected with *C. jejuni* strains ATCC 43431 (open circles) or 81-176 (closed circles) as described in methods. The pathogen densities in distinct compartments of the gastrointestinal tract were determined by quantification of live *C. jejuni* in luminal samples taken from stomach, duodenum, ileum, and colon at day 12 p.i. by cultural analysis (CFU, colony forming units). Numbers of animals harboring *C. jejuni* out of the total number of analyzed animals are given in parentheses. Medians (black bars) are indicated. Data shown were pooled from three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0020953.g001

to more specifically and precisely analyze distinct immune cell responses in the inflamed colon *in situ* and to quantitate the degree of histopathology we performed immunohistochemical stainings of colon sections. Given that apoptosis is commonly used as a diagnostic marker in the histopathological evaluation and grading of intestinal diseases, we quantitatively determined apoptotic cells and, in addition, the influx of neutrophils acting as inflammatory effector cells within the colon mucosa following *C. jejuni*-infection. Twelve days p.i., *C. jejuni* ATCC 43431 colonization densities were comparable within the respective segments of the GI tract (stomach, duodenum, ileum, and colon) irrespective of the genotype of mice under investigation with highest bacterial counts in the colon (approximately 10⁹ CFU/g luminal colon content; data not shown). Gnotobiotic mice deficient in TLR4, TLR9, TRIF or MyD88, however, displayed significantly less inflammatory responses compared to respective wildtype controls as indicated by lower numbers of Caspase3⁺ apoptotic and MPO7⁺ neutrophilic granulocytes in the colon *in situ* (Fig. 2 A, B). Furthermore, we observed significantly lower numbers of CD3⁺ T-lymphocytes, FOXP3⁺ regulatory T-cells (Tregs), and B220⁺ B-lymphocytes within the colonic mucosa of TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-}, TRIF^{-/-}, and MyD88^{-/-} infected mice compared to WT mice at d12 p.i. (Fig. 2 C–E). Interestingly, Treg and B-lymphocyte counts of infected TRIF^{-/-} and MyD88^{-/-} animals did not differ when compared to non-infected controls (Fig. 2 D, E). In addition, B220⁺ cells within the colon mucosa of TLR4^{-/-} mice did not increase within 12 days following *C. jejuni*-infection (Fig. 2 E). These results highlight the gnotobiotic mouse model following antibiotic treatment as a well-suited vertebrate model for the study

of *C. jejuni* colonization and pathogen-host interaction mounting in immunopathological responses similar to those seen in humans with *Campylobacter* enteritis. Strikingly, we demonstrate for the first time *in vivo* that MyD88- and TRIF-dependent sensing of *Campylobacter*-LPS and -CpG-DNA via TLR4- and TLR9-signaling is essentially involved in *C. jejuni*-mediated immunopathology.

Generation of mice reconstituted with a complete human gut flora

Using our gnotobiotic mouse model we were able to study the dual interaction between *C. jejuni* and the murine host. In order to get deeper insights into the triangle relationship (“ménage à trois”) of the pathogen, the host innate immune system and the human versus the murine microbiota, we replenished gnotobiotic mice with a human or murine gut flora by gavage. Quantitative analyses of the main bacterial communities by culture (Fig. 3 A) and molecular techniques (Fig. 3 B–C, Fig. S4) revealed that the human or murine microbiota was effectively and permanently established within the gut for more than six weeks as independently confirmed by PCR-based genetic fingerprinting of fecal samples (Fig. 3 C). According to the typical differences in the microbiota composition of the two host species, lactobacilli were predominantly found in the murine flora associated (mfa) mice whereas human flora associated (hfa) animals harbored higher total bacterial and higher individual species loads of enterobacteria (*E. coli*), enterococci, *Bacteroides/Prevotella* spp., and clostridia as determined by cultural (Fig. 3 A) and molecular (Fig. 3 B)

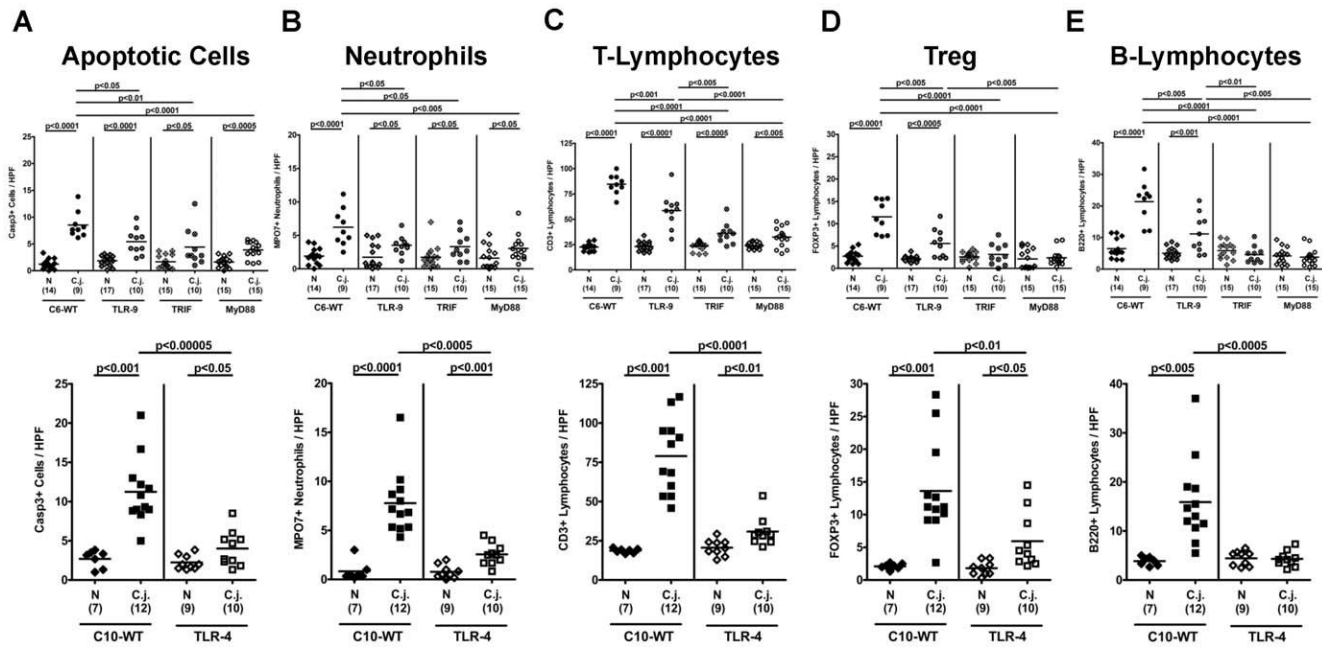


Figure 2. Impact of host bacterial sensing on immunopathology in the colon following *C. jejuni*-infection. Gnotobiotic wildtype (WT; C57BL/10 (C10) or C57BL/6 (C6) as indicated), TLR4^{-/-} (lower panel), TLR9^{-/-}, TRIF^{-/-}, and MyD88^{-/-} (upper panel) mice generated by antibiotic gut decontamination were orally infected with *C. jejuni* strain ATCC 43431. The average numbers of apoptotic cells (positive for caspase-3, panel **A**), neutrophilic granulocytes (neutrophils, positive for MPO-7, panel **B**), T-lymphocytes (positive for CD3, panel **C**), regulatory T-cells (Tregs, positive for FOXP3, panel **D**) and B-lymphocytes (positive for B220, panel **E**) from at least six high power fields (HPF, 400 \times magnification) per animal were determined microscopically in immunohistochemically stained colon sections. Numbers of animals of the respective genotype analyzed are given in parentheses. Means (black bars) and levels of significance (*P*-values) as compared to the respective infected WT control group (determined by the Student's *t*-test) are indicated. Data shown were pooled from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g002

analyses of feces at d0 (right before *C. jejuni*-infection). A quantitative molecular six-weeks follow-up revealed that *C. jejuni*-infected “humanized” mice displayed higher enterobacteria, *Bacteroides/Prevotella* spp. and *Clostridium coccooides* loads in their feces as compared to mfa animals (Fig. S4 A).

C. jejuni colonization in “humanized” mice

Two weeks following reconstitution of gnotobiotic mice with human or murine flora (to assure proper establishment of the microbiota along the GI tract), hfa and mfa mice were perorally infected with *C. jejuni* ATCC 43431 (d0). Kinetic analyses of the pathogen loads were performed in fecal samples and in distinct compartments of the entire GI tract after necropsy (d12 p.i.). Results revealed that mfa mice were protected from intestinal colonization as indicated by effective clearance of *C. jejuni* from the GI tract during the first two to three days p.i. (Fig. 4 A). In “humanized” mice, however, *C. jejuni* ATCC 43431 did stably colonize (Fig. 4 B) with bacterial loads of up to 10⁸ CFU per g feces. Long-term kinetic experiments in hfa mice revealed that *C. jejuni* ATCC 43431 colonization of stomach, ileum, and colon was stable for more than six weeks p.i. with the highest bacterial loads in the colon (Fig. 4 C).

C. jejuni-induced intestinal immunopathology in “humanized” mice

In humans, *C. jejuni* induces the recruitment of pro-inflammatory immune cell populations to sites of inflammation in the colon [4,5]. Therefore, we investigated apoptotic cell, neutrophil, T- and B-lymphocyte as well as Treg recruitment in the colonic mucosa during *C. jejuni*-infection in both, hfa and mfa mice by

immunohistochemical staining of Caspase-3, MPO7, CD3, B220, and FOXP3 in colon sections of infected mice, respectively (Fig. 5). Remarkably, after reconstitution of gnotobiotic mice with a human or murine gut microbiota no differences were observed in the numbers of apoptotic cells, neutrophilic granulocytes, T- and B-lymphocytes or Tregs in the colon mucosa *in situ*. However, quantitative analyses of the respective immune cell populations after *C. jejuni* ATCC 43431-infection revealed that *C. jejuni*-infection induced a pronounced inflammatory response in the colon of hfa mice (Fig. 5). Twelve days p.i., a five-fold increase in apoptotic cells within the colon mucosa was observed in hfa mice as compared to infected mfa and uninfected control animals (Fig. 5 A). This increase of apoptotic cells was accompanied by a three-fold increase in neutrophil numbers in the colon mucosa of *C. jejuni*-infected hfa mice (Fig. 5 B). Furthermore, higher T- and B-lymphocyte as well as Treg counts were found in the colon mucosa at d12 following *C. jejuni*-infection with significantly higher T-lymphocyte and Treg numbers in hfa as compared to mfa mice (Fig. 5 C–E).

Next, we determined secretion of pro-inflammatory cytokines in the colon of *C. jejuni*-infected mice. At d12 p.i., hfa mice displayed higher TNF- α , IL-6 and MCP-1 concentrations in their large intestine as compared to mfa and uninfected control animals (Fig. 6 A–C). It is noteworthy that following *C. jejuni*-infection the respective means of TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels increased by factors 2, 3, and 5, respectively, as compared to naïve hfa controls. The multi-fold increases of secreted pro-inflammatory cytokines, in the context of significant increases in immune cell numbers in colons sections of infected hfa mice (Fig. 5), point towards a biological relevant effect despite the high standard deviations within the infected hfa groups.

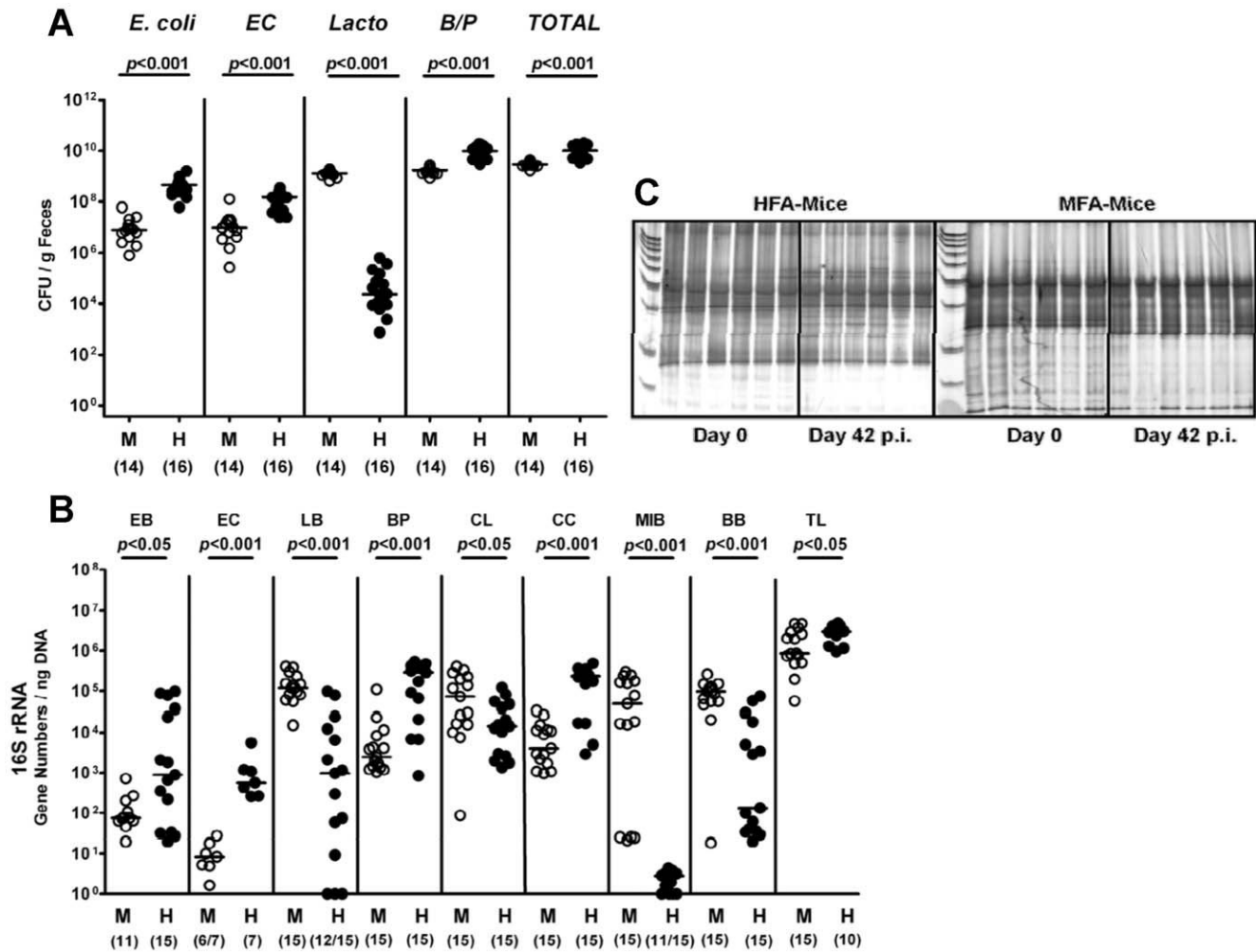


Figure 3. Microflora analysis of gnotobiotic mice with human or murine gut flora. Gnotobiotic mice generated by antibiotic gut decontamination were recolonized with a human (HFA, H) or murine (MFA, M) microflora as described (see methods). Main gut bacterial groups were quantified by culture and molecular analysis of fecal samples before and after *C. jejuni*-infection (d42 p.i.). **(A) Culture.** Total bacterial counts (*TOTAL*) and numbers of *E. coli*, enterococci (*EC*), Lactobacilli (*Lacto*) and *Bacteroides/Prevotella* spp. (*B/P*) were determined in feces samples of MFA (M) and HFA (H) mice right before *C. jejuni*-infection (day 0) by detection of colony forming units (CFU) per gram feces on appropriate culture media (see methods). Bacterial species were identified by biochemical analysis and reconfirmed by comparative sequence analyses of 16S rRNA genes. Numbers of animals harboring the respective bacterial species are given in parentheses. Medians and significance levels (*P*-values) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Data shown were pooled from three independent experiments. **(B) RT-PCR analysis of the murine and human flora.** Quantitative Real-Time-PCR amplifying bacterial 16S rRNA variable regions. 16S rRNA gene numbers/ ng DNA from luminal colon content from hfa (H) or mfa (M) mice after stable re-colonization before *C. jejuni*-infection (day 0) of the following bacterial groups were determined: *Enterobacteriaceae* (EB), Enterococci (EC), Lactic acid bacteria (LB), *Bacteroides/Prevotella* spp. (BP), *Clostridium leptum* group (CL), *Clostridium coccooides* group (CC), Mouse intestinal bacteroidetes (MIB), *Bifidobacteria* (BB), and total eubacterial load (TL). Numbers of animals harboring the respective bacterial rRNA are given in parentheses. Medians and significance levels (*P*-values) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Data shown were pooled from three independent experiments. **(C) Genetic fingerprinting of the murine and human flora.** Molecular fingerprints were generated by PCR-based DGGE analysis of total DNA isolated from luminal colon contents as described (see methods) of six individual hfa (left panel) and mfa mice (right panel). Samples were taken after stable recolonization, but before *C. jejuni*-infection (day 0) and 42 days after infection (day 42 p.i.).

doi:10.1371/journal.pone.0020953.g003

Taken together, following *C. jejuni*-infection the “humanized” mice are not only susceptible to colonization but also display typical pro-inflammatory features of human campylobacteriosis.

The role of *C. jejuni* formic acid metabolism and perception in inducing immunopathology

We further investigated gnotobiotic and hfa mice as suitable experimental models for the study of *C. jejuni* virulence factors in colonization and immunopathology. For this purpose we performed infection experiments with two different *C. jejuni* mutant

strains deficient in factors essential for cellular invasion. Both mutant strains were recently generated by transposon mutagenesis and displayed a reduced invasion capacity into epithelial cell lines *in vitro* [37]. The mutant strains carrying transposon (TnKan) insertions in the genes for formate dehydrogenase subunit D *fdhD* (strain B2 Δ *fdhD*) or the formic acid receptor Tlp7 (strain B2 Δ *cj0952c*) were generated in the *C. jejuni* B2 background as described earlier [37]. The formic acid receptor was shown to be associated with the cell invasion capacity of *C. jejuni* [37]. Briefly, if compared to the parental strain, the B2 Δ *cj0952c* mutant displayed

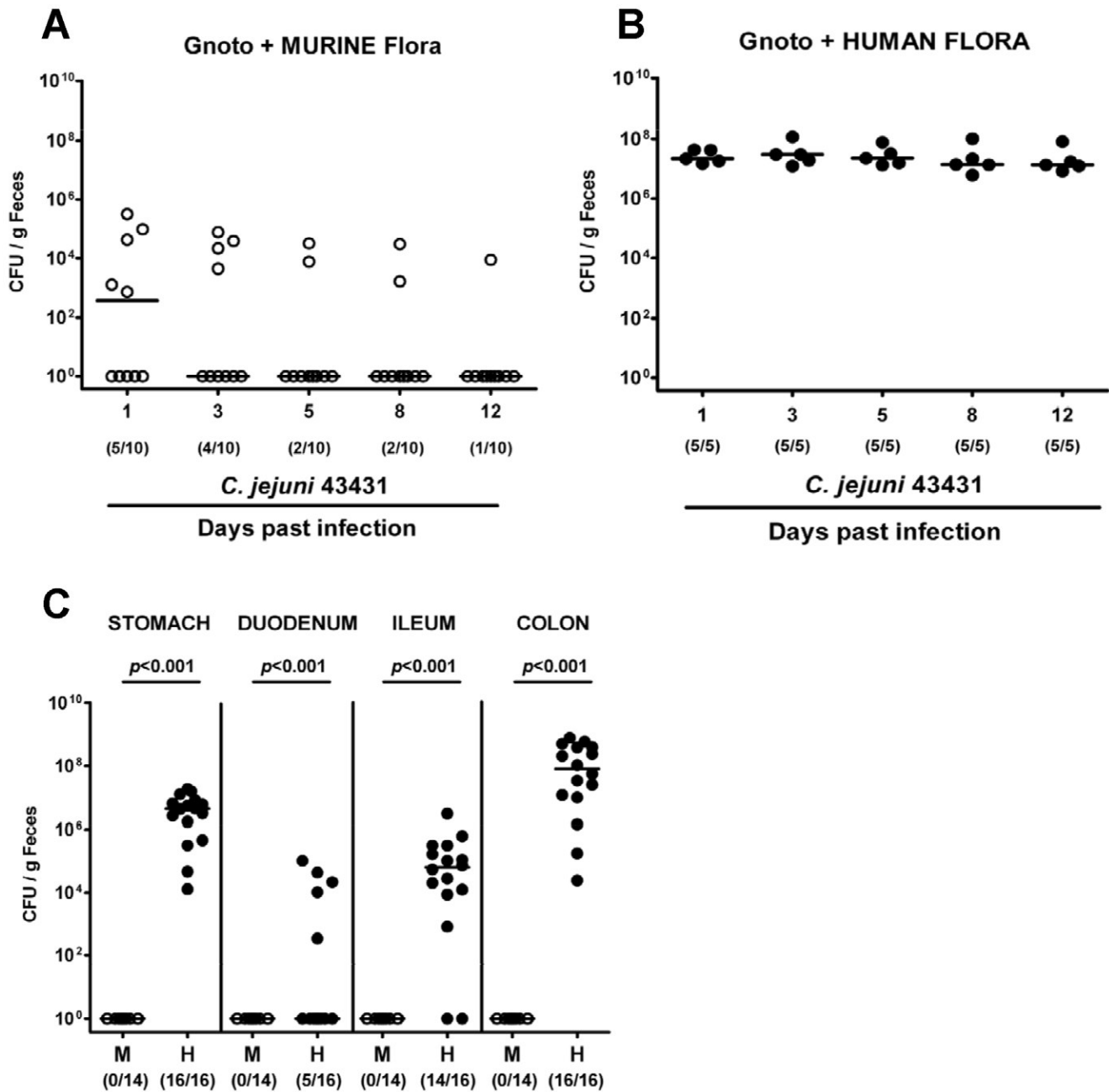


Figure 4. *C. jejuni* colonization in mice with a murine or human gut microbiota. Following oral infection with *C. jejuni* ATCC 43431, kinetic analyses of the pathogen loads in feces samples of gnotobiotic mice reconstituted with a murine (A) or human (B) gut flora until d12 p.i. were performed by culture (as described in methods; CFU, colony forming units). In addition, *C. jejuni* burdens in distinct compartments of the gastrointestinal tract (stomach, duodenum, ileum, colon; C) of mfa (M, open circles) and hfa (H, filled circles) mice at d12 p.i. were determined by quantification of live *C. jejuni* by culture. Numbers of animals harboring *C. jejuni* out of the total number of analyzed animals are given in parentheses. Medians (black bars) and significance levels (*P*-values, hfa as compared to mfa animals) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Data shown are representative for three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0020953.g004

a five times reduced invasion capacity (as determined in gentamicin protection assays with Caco-2 cells). To investigate the role of formate dehydrogenase and the formic acid receptor in immunopathology we infected hfa mice with the B2Δ*fdhD* or B2Δ*cj0952c* mutant strain (Fig. S5). Control mice were infected with the parental *C. jejuni* strain B2. Results indicate that the invasion capacity and the formic acid metabolism are not required for intestinal colonization, but play essential roles in *C. jejuni*-mediated immunopathology. Both mutant strains colonized hfa

mice similarly at high loads (up to 10⁷–10⁸ CFU/ g feces) as compared to the parental B2 strain (Fig. S5 A–C). Immunopathology, however, was exclusively induced by the parental strain, but not by either mutant (Fig. 7). Numbers of apoptotic cells, T-lymphocytes and Tregs within the colon mucosa 12 days after infection with either mutant remained comparable to non-infected mice, but highly significantly increased multi-fold after oral infection with the parental strain (Fig. 7 A, C, D). In addition, the numbers of neutrophils and B-lymphocytes increased in the

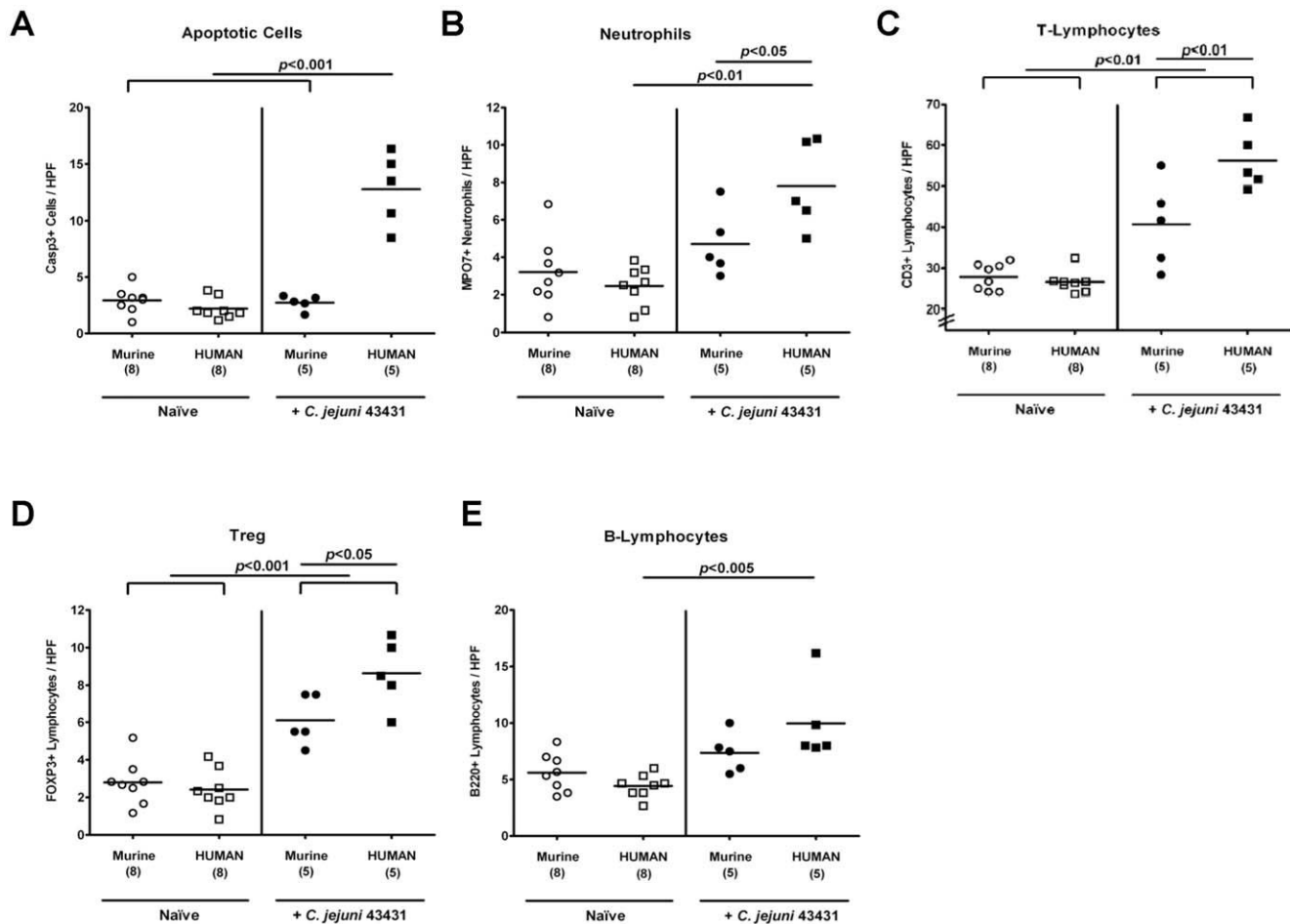


Figure 5. Immunopathological responses in the colon of “humanized” mice *in situ* following *C. jejuni*-infection. *Mfa* and *hfa* mice were generated and orally infected with *C. jejuni* strain ATCC 43431 by gavage as described in methods section. The average numbers of apoptotic cells (positive for caspase-3, panel **A**), neutrophilic granulocytes (neutrophils, positive for MPO-7, panel **B**), T-lymphocytes (positive for CD3, panel **C**), Tregs (positive for FOXP3, panel **D**), and B-lymphocytes (positive for B220, panel **E**) from at least six high power fields (HPF, 400× magnification) per animal were determined microscopically in immunohistochemically stained colon sections of naïve (Naïve, open symbols) and infected (+*C. jejuni* ATCC 43431, filled symbols) *mfa* (circles) and *hfa* (squares) mice at day 12 p.i.. Numbers of analyzed animals are given in parentheses. Medians (black bars) and levels of significance (*P*-values) as compared to the indicated groups (determined by Student’s *t*-test) are indicated. Data shown are representative for three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g005

colon of *hfa* mice infected with either mutant strain compared to non-infected controls (Fig. 7 **B, E**). However, the MPO7⁺ or B220⁺ cell counts were higher in animals infected with the parental strain as compared to mice infected with either mutant.

Furthermore, lower numbers of *in situ* immune cell counts were accompanied by significantly lower IL-6 and IFN- γ protein concentrations in *ex vivo* colon cultures obtained from mice infected with the respective mutant as compared to the parental strain infected controls (at d12 p.i.). In addition, mice infected with the *C. jejuni* mutant B2 Δ *fdhD* displayed lower nitric oxide secretion in the colon as compared to mice infected with the parental strain (Fig. 8 **A–C**).

C. jejuni translocation in gnotobiotic and *hfa*, but not *mfa* mice

Studies have shown that live *C. jejuni* is able to translocate to the mesenteric lymph nodes (MLNs) in infected isolator-raised germfree animals [12–14]. Therefore, we determined the translocation capacity of the parental strain and both mutants, B2 Δ *fdhD* and B2 Δ *ej0952c* *in vivo*. Quantitative cultural analysis of live bacteria in MLNs, spleen,

liver, kidney, and cardiac blood of infected gnotobiotic and *hfa* mice revealed that at d12 p.i. *C. jejuni* translocates to MLNs (Fig. 9) but not to other organs or blood (data not shown) in gnotobiotic or *hfa* mice. *Mfa* mice displaying a strong colonization resistance against *C. jejuni* served as negative controls. Interestingly, the translocation frequencies (100% vs. 68%) as well as the bacterial loads (medians of approximately 10³ vs. 10² CFU/ g organ homogenate) of the *C. jejuni* B2 parental strain in MLNs were higher in infected gnotobiotic versus “humanized” animals at day 12 p.i., with no differences as compared to other *C. jejuni* strains such as ATCC 43431 and 81–176 (not shown). In gnotobiotic and *hfa* mice, both, the *C. jejuni* B2 Δ *fdhD* and B2 Δ *ej0952c* mutant strain, translocated less frequently into MLNs as compared to the parental strain with lower counts of approximately two orders of magnitude following infection with the B2 Δ *fdhD* mutant versus the parental strain (Fig. 9).

Discussion

The commensal intestinal flora constitutes a barrier to effectively prevent the host from colonization and infection by

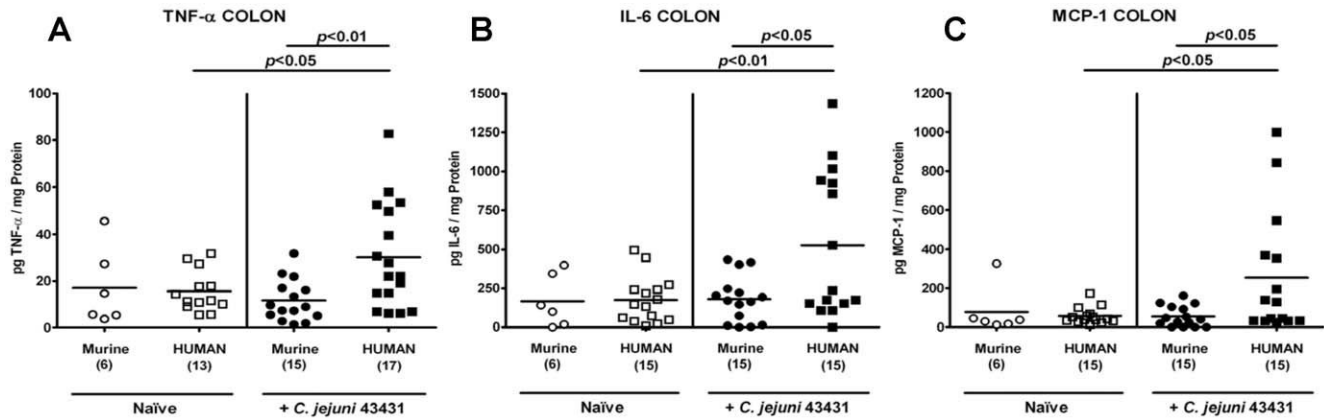


Figure 6. Pro-inflammatory cytokine responses in the colon of *C. jejuni*-infected "humanized" mice. Mfa and hfa mice were generated and orally infected with *C. jejuni* strain ATCC 43431 as described (see methods). Secretion of (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) MCP-1 was determined in supernatants of *ex vivo* colon cultures from naïve animals (Naïve, open symbols) or infected (+*C. jejuni* ATCC 43431, filled symbols) mfa (circles) or hfa (squares) mice at day 12 p.i.. Numbers of analyzed animals are given in parentheses. Means (black bars) and levels of significance (*P*-values) as compared to the indicated groups (determined by Student's *t*-test) are indicated. Data shown were pooled from two (for naïve mice) or three (for infected animals) independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g006

gut pathogens. The earlier observation that *C. jejuni* readily colonized isolator-raised germfree mice [13–15] pointed towards an essential role of the conventional gut microbiota in the colonization resistance against *C. jejuni*. The results presented here do further underline the impact of the murine microbiota in colonization resistance as was independently confirmed by effective *C. jejuni*-infection of gnotobiotic, but not mfa mice. In comparison with isolator-raised germfree mice, we favor our animal model for the following reasons: First, gnotobiotic mice generated by antibiotic treatment exhibit a physiologically developed immune system. Second, these mice can be generated under standardized breeding conditions in a sterile environment within a common animal facility and without the need for special equipment (such as isolators for instance) and, thus, costs for generating and housing are significantly lower.

An experimental model of a human pathogen in mice previously depleted of their intestinal gut microbiota and subsequently replenished with human gut flora allows the study of host-pathogen interactions in the natural host environment. Given that these "humanized" mice, but not mice with a murine flora, are susceptible to *C. jejuni*-infection indicates for the first time, that the host-specific microflora composition is essential for susceptibility or resistance to *Campylobacter*-infections resembling the natural host conditions. However, individual bacterial species or the complex microflora composition responsible for colonization resistance have not been identified so far and await further detailed investigation.

The susceptibility of gnotobiotic and hfa mice to *C. jejuni*-infection renders the novel models presented here excellently suited for standardized and reproducible analyses of *C. jejuni* colonization and immunopathology in a higher vertebrate experimental system. Most importantly, the inflammatory responses in the colon of *C. jejuni*-infected "humanized" mice *in situ* mimicked key features of immunopathological responses in human campylobacteriosis [4,5]: First, tissue damage was most pronounced in the lower intestinal tract as indicated by increased numbers of apoptotic cells in the colon mucosa. Second, *C. jejuni*-induced mucosal injury was accompanied by an increased recruitment of innate immune and effector cells (e.g. T- and B-lymphocytes, Tregs and neutrophils) in the colon mucosa of infected mice. Lastly, an increased secretion of pro-inflammatory

cytokines such as TNF- α , IL-6, and MCP-1 were found in *ex vivo* colon cultures taken from infected hfa mice. Interestingly, Treg numbers increased in the colons of hfa mice during the course of *C. jejuni*-infection suggesting that production of IL-10 and other anti-inflammatory mediators might be involved in limiting *C. jejuni*-induced immunopathology. This was further supported by Bell and coworkers (2009) who showed that *C. jejuni* is able to induce a strong inflammatory response in IL-10 deficient mice [27].

Using our gnotobiotic infection model we could further dissect the interplay between *C. jejuni* and the host innate responses. Infection of gnotobiotic mice deficient in MyD88, TRIF or TLR4 revealed for the first time *in vivo* that MyD88- and TRIF-dependent TLR4-recognition of bacterial LPS is essentially involved in the development of immunopathology during *C. jejuni* enteritis as indicated by lower numbers of apoptotic cells, neutrophils, T- and B-lymphocytes as well as Tregs found in the colon mucosa of the respective gene-deficient mice at day 12 p.i.. Similarly, other *in vitro* studies have shown the important role of TLR4-signaling in *C. jejuni* LPS infected cells [22] and activation of human TLR4 by *C. jejuni* [21].

Strikingly, our results obtained from infected TLR9-deficient mice for the first time point towards a pivotal role of bacterial CpG-DNA in mediating *C. jejuni*-induced immunopathology. The activation of innate immune cells via TLR9, however, depends on the cell type, and on both, the methylation status and sequence of the DNA ligand under study [39]. Furthermore, a selected set of *Campylobacter* strains did not activate human TLR9 expressed in a transfected human cancer cell line [21]. However, this does not rule out a role for TLR9 in human campylobacteriosis. The *C. jejuni* population is genetically highly variable and could present DNA of diverging sequence or methylation status to host immune cells in a strain dependent manner. The *C. jejuni* strains used for analysis of campylobacteriosis in mice presented here were neither studied for TLR9 activation in human nor murine cell lines before. Thus, the fact that *C. jejuni*-infected gnotobiotic mice lacking TLR9 displayed less severe immunopathology points towards an important role of TLR9 in the murine model. The role of TLR9 in human *C. jejuni*-infection awaits further confirmation by additional studies with cells of the adaptive and innate immune system.

Also noteworthy is the contribution of bacterial DNA and TLR9 signaling in augmenting murine intestinal inflammation

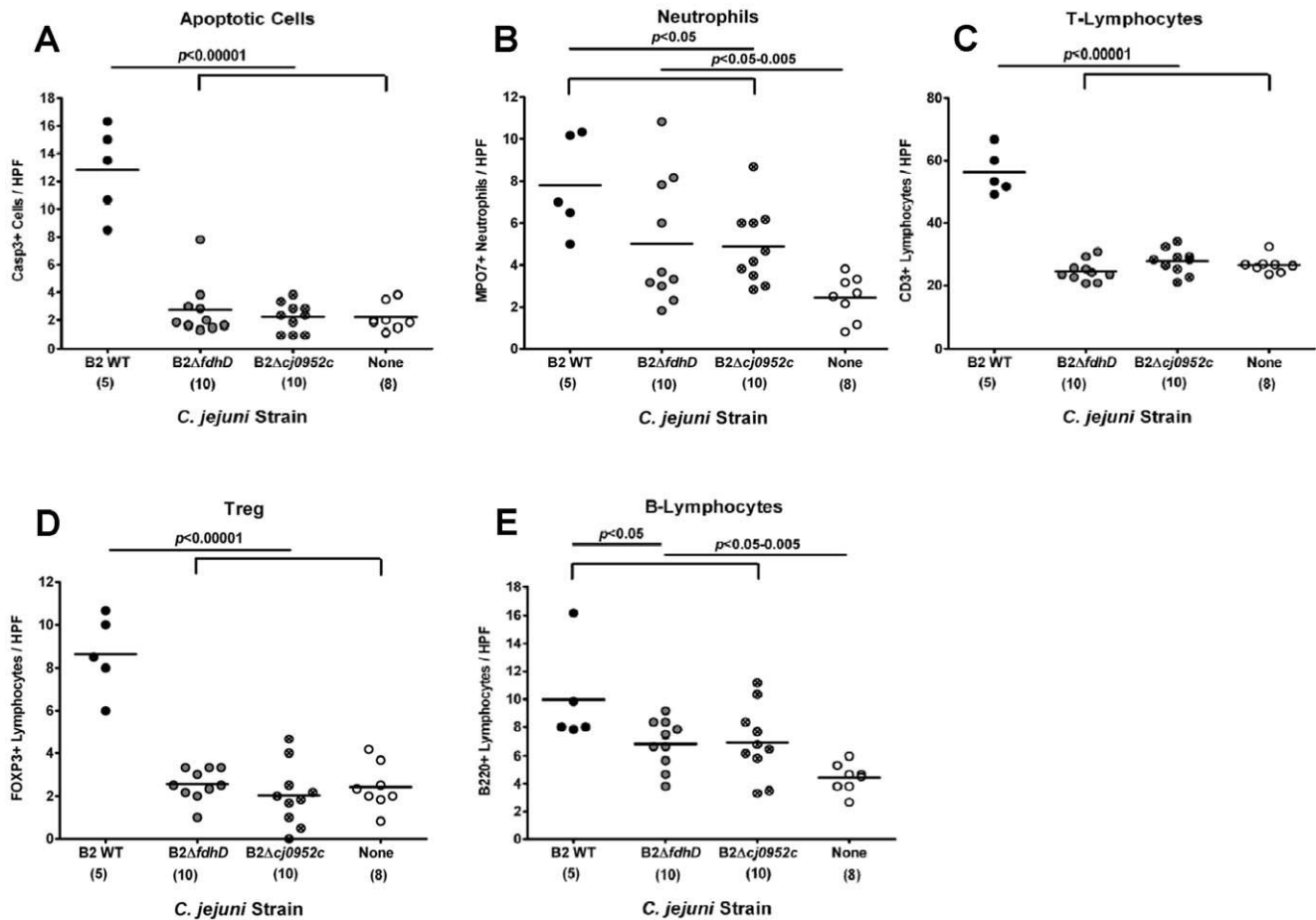


Figure 7. Impact of *C. jejuni* formic acid metabolism and perception on immunopathology in “humanized” mice. Hfa mice were generated as described (see methods) and orally infected with the *C. jejuni* wildtype strain (B2 WT), or with isogenic mutants deficient in the formate dehydrogenase subunit D (B2Δ*fdhD*) or the formic acid receptor (B2Δ*cj0952c*). The average numbers of apoptotic cells (positive for Caspase-3, panel **A**), neutrophilic granulocytes (neutrophils, positive for MPO-7, panel **B**), T-lymphocytes (positive for CD3, panel **C**), regulatory T-cells (Treg, positive for FOXP3, panel **D**) and B-lymphocytes (positive for B220, panel **E**) from at least six high power fields (HPF, 400× magnification) per animal were determined microscopically in immunohistochemically stained colon sections of naïve, non-infected (None, open circles) and infected (B2 WT: filled circles; B2Δ*fdhD*: grey circles; B2Δ*cj0952c*: crossed circles) mice at d12 post infection. Numbers of analyzed animals are given in parentheses. Means (black bars) and levels of significance (*P*-values) as compared to the respective groups (determined by Student’s *t*-test) are indicated. Data shown are representative for three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g007

supported by our previous studies: In murine intestinal graft-versus-host disease we observed recently that TLR9 is essentially involved in aggravation of colitis [40].

Finally, the murine *C. jejuni*-infection models presented here are valuable tools to investigate *C. jejuni* virulence factors *in vivo*. Hfa mice infected with *C. jejuni* mutant strains deficient in formic acid metabolism or perception involved in cell invasion fitness harbored comparable bacterial loads throughout the GI tract. However, both mutant strains significantly displayed less immunopathological responses as indicated by lower numbers of apoptotic cells, neutrophils, T-lymphocytes, and Tregs in the colon mucosa as compared to mice infected with the parental strain. This diminished cellular response was paralleled by lower expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, nitric oxide, and IFN- γ) and less translocation of living *C. jejuni* into MLNs in animals infected with the B2Δ*fdhD* or B2Δ*cj0952c* strain as compared to mice infected with the wildtype strain. Given that these results underline the suitability of the animal model presented here for *in vivo* analyses of *C. jejuni* gene mutant strains, there is a possibility of polar effects on downstream genes which cannot be ruled out.

Thus, the relevance of the *fdhD* or the *cj0952c* gene mutation for amelioration of immunopathology and translocation following oral infection cannot unequivocally be attributed to the gene products encoded by the deleted genes. Nevertheless, since formic acid is a metabolite produced by many commensal gut bacteria and thus part of the intestinal intraluminal milieu, these findings point towards an essential role of formic acid metabolism and perception in the intestinal “lifestyle” of *C. jejuni* and its cell invasiveness *in vivo*.

Taken together, we conclude that our novel murine models for colonization and inflammation following *C. jejuni*-infection shown in the present study, mimic many important aspects of human *C. jejuni*-infection and thus offer promising novel tools to better understand the arousing “ménage à trois” between the pathogen, commensal gut bacteria, and host innate immune responses.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal experiments were conducted according to the European Guidelines for animal welfare (2010/63/EU) with

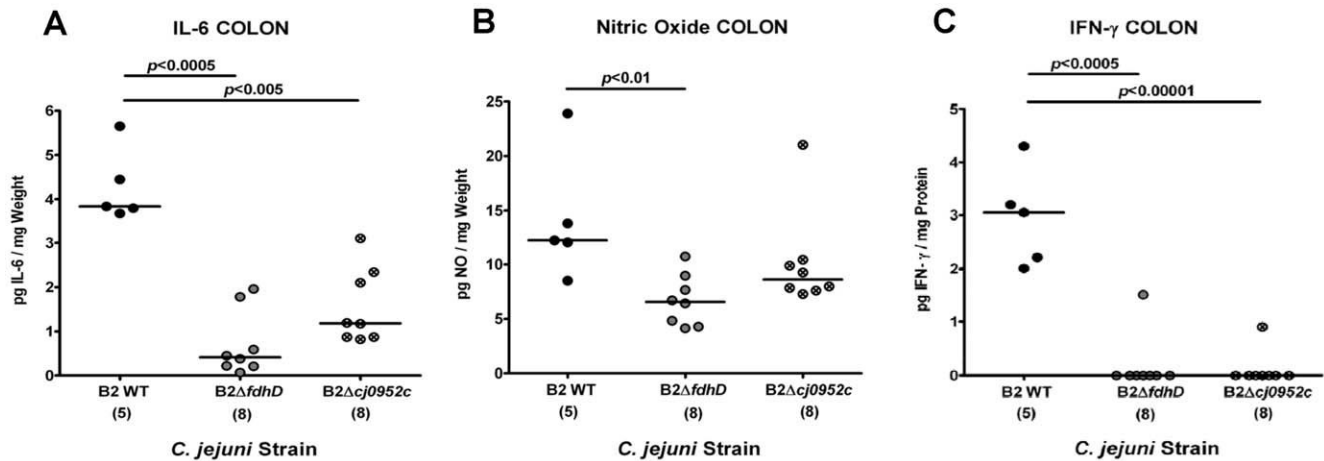


Figure 8. Impact of *C. jejuni* formic acid metabolism and perception on cytokine responses in “humanized” mice. Hfa mice were generated as described (see methods) and orally infected with the *C. jejuni* wildtype strain (B2 WT), or with isogenic mutants deficient in the formate dehydrogenase subunit D (B2 Δ fdhD) or the formic acid receptor (B2 Δ cj0952c). Secretion of (A) IL-6, (B) NO and (C) IFN- γ was determined in supernatants of *ex vivo* colon cultures obtained from infected (B2 WT: filled circles; B2 Δ fdhD: grey circles; B2 Δ cj0952c: crossed circles) mice at d12 p.i.. Numbers of analyzed animals are given in parentheses. Means (black bars) and levels of significance (*P*-values) as compared to the respective groups (determined by Student’s *t*-test) are indicated. Data shown are representative for three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g008

approval of the commission for animal experiments headed by the “Landesamt für Gesundheit und Soziales” (LaGeSo, Berlin, Germany; registration number TVV G0173/07). Animal welfare was monitored twice daily by assessment of clinical conditions. Fresh human fecal samples for recolonizing gnotobiotic mice (hfa) were collected from healthy volunteers. Before sample collection written informed consent was obtained from all volunteers. Since fecal samples were obtained from co-workers of our laboratory and thus outside a clinical environment and used for recolonization of mice only, experiments were exempted from approval by the Charité - Universitätsmedizin ethical committee according to German legacy (§15, Legal Basis for Clinical Trials).

Mice

All animals were maintained in the facilities of the “Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin” (FEM, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, Germany), under specific pathogen-free (SPF) conditions. Mice deficient in TLR4 (C57BL/10ScSn (C10) background), TLR9, TRIF or MyD88 (C57BL/6 (C6) background), used in the experiments are described in detail elsewhere [40]. Age and sex matched mice between 10 and 12 weeks of age were used.

Generation of gnotobiotic mice

To eradicate the commensal gut flora, mice were transferred to sterile cages and treated by adding ampicillin (1 g/L; Ratiopharm), vancomycin (500 mg/L; Cell Pharm), ciprofloxacin (200 mg/L; Bayer Vital), imipenem (250 mg/L; MSD), and metronidazole (1 g/L; Fresenius) to the drinking water *ad libitum* for 6–8 weeks as described earlier [30].

Generation of gnotobiotic mice with a human or murine gut flora

Fresh human and murine fecal samples free of enteropathogenic bacteria, parasites, and viruses were collected from five individual healthy volunteers and animals, respectively, pooled and dissolved in an equal volume of sterile PBS, aliquoted and stored at -80°C until use. For reconstitution experiments, aliquots were thawed and bacterial communities quantified by cultural and molecular

methods (refer to [30]) before gavage of mice with 0.3 mL of the respective suspension. Between independent experiments bacterial counts of groups varied of less than 0.5 log orders of magnitude.

C. jejuni-infection of mice

Conventional, gnotobiotic or mice reconstituted with human or murine gut flora were infected with 10^9 viable CFU of *C. jejuni* strains ATCC 43431, 81–176, B2 or mutant strains B2 Δ fdhD and B2 Δ cj0952c deficient in the formate dehydrogenase subunit D or the formic acid receptor gene, respectively [37], by gavage in a total volume of 0.3 mL PBS on three consecutive days.

Sampling procedures and histopathology

Mice were sacrificed by isofluran treatment (Abbott, Germany). Cardiac blood and tissue samples from liver, spleen, kidneys, MLNs, and gastrointestinal (GI) tract (stomach, duodenum, ileum, colon) were removed under sterile conditions. GI samples from each mouse were collected in parallel for histological, microbiological, immunological, and molecular analyses. Histopathological changes were determined in colon samples immediately fixed in 5% formalin and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined by light microscopy (magnification $\times 200$).

Immunohistochemistry

In situ immunohistochemical analysis of colon paraffin sections was performed as described previously [40]. Primary antibodies against CD3 (#N1580, Dako, Denmark, dilution 1:10), myeloperoxidase-7 (MPO-7, # A0398, Dako, 1:10000), FOXP-3 (FJK-16s, eBioscience, 1:100), B220 (eBioscience, San Diego, CA, USA, 1:200), and cleaved caspase-3 (Asp175, Cell Signaling, USA, 1:200) were used. For each animal, the average number of positively stained cells within at least six high power fields (HPF, $400\times$ magnification) were determined microscopically by three independent investigators (MMH, RP, AAK).

Quantitative analysis of *C. jejuni* translocation

Live *C. jejuni* were detected in MLNs, spleen, liver, kidneys, and cardiac blood by culture. Tissues were homogenized in sterile PBS

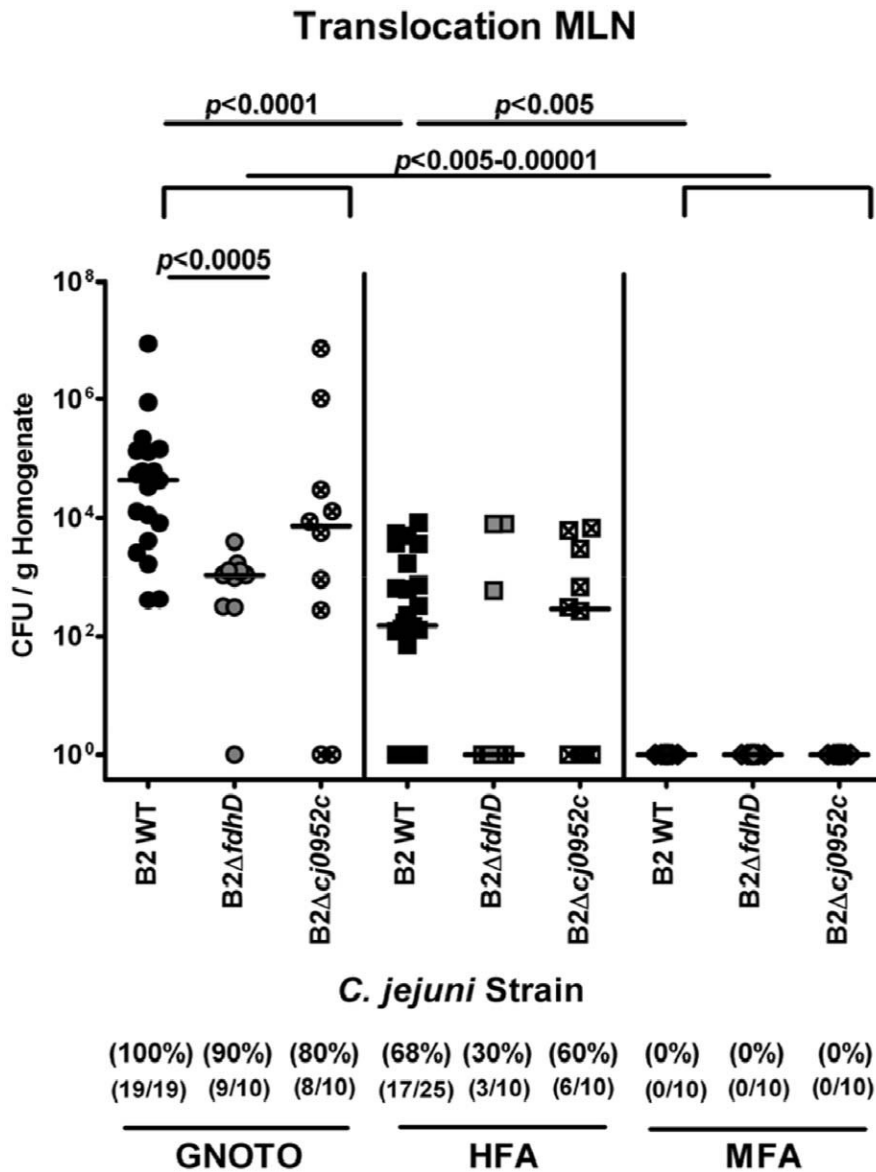


Figure 9. Impact of *C. jejuni* formic acid metabolism and perception on bacterial translocation to mesenteric lymphnodes. Gnotobiotic (GNOTO; circles) and with human flora associated (HFA; squares) mice were generated as described (see methods). Conventionally colonized (MFA; diamonds) animals served as negative controls. Mice were orally infected with the *C. jejuni* wildtype strain (B2 WT; solid symbols), or with isogenic mutants deficient in the formate dehydrogenase subunit D (B2 Δ fdhD; grey symbols) or the formic acid receptor (B2 Δ cj0952c; crossed symbols). At d12 post infection, live *C. jejuni* were quantified in homogenized MLNs by culture (as described in methods; CFU, colony forming units). Medians (black bars) and significance levels (*P*-values) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Absolute and relative numbers of animals harboring *C. jejuni* are given in parentheses. Data shown are pooled from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0020953.g009

and analyzed in dilution series on karmali agar (Oxoid, Wesel, Germany) in a microaerophilic atmosphere at 37°C for at least 48 hours. Cardiac blood (0.2 mL) was immediately streaked out on karmali agar plates.

Analysis of the intestinal microflora

Cultural analyses, biochemical identification, and molecular detection of luminal bacterial communities from stomach, duodenum, ileum, and colon were performed as previously described [30,31,41]. Genetic fingerprints of the intestinal microflora were generated by PCR-based denaturing-gradient-gel-electrophoresis (PCR-DGGE) amplifying the 16S rRNA variable region V6–8 [30]. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a

StepOnePlus RealTime-PCR System (Applied Biosystems) using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas). The reaction volume was 20 μ l using 2 μ l template DNA at following cycling conditions (40 cycles): Initial denaturation / enzyme activation at 95°C for 10 min, initial denaturation at 95°C for 15 s followed by annealing / elongation at 60°C for 1 min. Fluorescence detection was performed at 80°C (75°C for BP/MIB; 70°C for EC) after each cycle. A melting curve for each run was performed to check for the correct amplicon. Total bacteria (TL), gamma-Proteobacteria / Enterobacteriaceae (EB), *Lactobacillus* group (LB), *Clostridium leptum* group (CL), *Clostridium coccoides* group (CC), *Bacteroides* group including *Prevotella* and *Porphyromonas* (BP), Mouse Intestinal *Bacteroidetes* (MIB), Enterococci (EC) and *Bifidobacteria* (BB) were separately detected and

quantified using 16S primer sets described earlier [40]. The *C. jejuni* loads of feces samples and luminal GI contents were determined with a flagellin A based qRT-PCR (*flaA* AW 50 fw, 5'-ATGG-GATTTTCGTATTAACAC-3', *flaA* AW 5 re 5'-GATATAGCTT-GACCTAAAGTA-3') resulting in a 197bp product (primers taken from: Dr. K. Pietsch, Freiburg, personal communication). The *Campylobacter-flaA*-PCR cycling conditions were different to the above mentioned: Annealing was at 55°C for 20 s, elongation at 60°C for 30 s and fluorescence detection at 70°C. In general, the 16S rRNA or *flaA* gene numbers / ng DNA of each sample were determined, not the actual bacterial numbers.

Cytokine detection in colon culture supernatants

Colon biopsies were cut longitudinally, washed in PBS, and strips of 1 cm² were placed in 24-flat-bottom well culture plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) containing 500 µl serum-free RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ ml) and streptomycin (100 µg/ ml; PAA Laboratories). After 18 h at 37°C, culture supernatants were tested for TNF-α, IL-6, MCP-1, and IFN-γ by the Mouse Inflammation Cytometric Bead Assay (CBA; BD Biosciences) on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Nitric oxide (NO) was determined by Griess-reaction as described earlier [30].

Statistical analysis

Mean values, medians, standard deviations, and levels of significance were determined using appropriate tests as indicated (two-tailed Student's *t*-Test, Mann-Whitney-U Test). Two-sided probability (*P*) values ≤ 0.05 were considered significant. All experiments were repeated at least twice.

Supporting Information

Figure S1 PCR-based detection of gut bacteria in feces from conventionally colonized, but not gnotobiotic mice. PCR analysis with eubacterial primer amplifying 16S V6–8 region of DNA from fecal samples obtained from nine conventionally raised mice (conventional) and gnotobiotic mice (gnotobiotic) were performed and run on 1% agarose gels stained with ethidium-bromide. (TIF)

Figure S2 *C. jejuni* colonization in gnotobiotic and conventional mice. Conventional wildtype mice (SPF, open circles), and gnotobiotic mice (GNOTO, filled circles, generated by antibiotic gut decontamination) were orally infected with *C. jejuni* strains 81–176, ATCC 43431 or B2 (as indicated on the x-axis) as described (see methods). The colonization capacity was determined by quantification of live *C. jejuni* in feces samples at day 12 p.i. by cultural analysis (CFU, colony forming units). Numbers of animals harboring *C. jejuni* out of the total number of analyzed animals are given in parentheses. Medians (black bars) and significance levels (*P*-values, as compared to SPF animals) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Data shown were pooled from three independent experiments. (TIF)

Figure S3 Histopathology in colon sections following *C. jejuni* infection. Paraffin sections of colon samples were HE-stained as described (see methods). (A) In naïve, uninfected wildtype mice many goblet cells (dashed arrows), normal crypt

architecture, and no immune cell infiltration were observed. (B) TLR4-deficient mice displayed mild immune cell infiltration (solid arrow), whereas in wildtype animals (C) loss of goblet cells (dashed arrows), crypt elongation, and moderate immune cell infiltration into the lamina propria (solid arrow) could be detected at day 12 following *C. jejuni* ATCC 43431-infection. Representative photomicrographs (magnification ×200) from three independent experiments are shown.

(TIF)

Figure S4 Quantitative molecular analysis of fecal samples obtained from mfa and hfa mice. (A) Quantitative Real-Time-PCR amplifying bacterial 16S rRNA variable regions. 16S rRNA gene numbers / ng DNA from luminal colon content of mfa (M, open squares) or hfa (H, filled squares) recolonized mice after *C. jejuni*-infection (day 42 p.i.) of the following bacterial groups were determined: *Enterobacteriaceae* (EB), enterococci (EC), lactic acid Bacteria (LB), *Bacteroides/Prevotella* spp. (BP), *Clostridium leptum* group (CL), *Clostridium coccooides* group (CC), mouse intestinal bacteroidetes (MIB), *Bifidobacteria* (BB), and total eubacterial load (TL). Medians (black bars) and significance levels (*P*-values) determined by Mann-Whitney-U test are indicated. Quantitative loads of the respective bacterial groups at day 0 (after stable recolonization; circles) and at day 42 (d42, squares) after *C. jejuni*-infection obtained from MFA (B; open symbols) and HFA (C; filled symbols) mice were analyzed by qRT-PCR. Numbers of animals harboring the respective bacterial rRNA are given in parentheses. Medians are indicated as black bars. Data shown were pooled from three independent experiments. (TIF)

Figure S5 Impact of *C. jejuni* formic acid metabolism and perception on colonization in “humanized” mice. Human flora associated mice (hfa) were generated as described (see methods) and orally infected with the *C. jejuni* wildtype (WT; A) strain B2, or with isogenic mutants deficient in the formate dehydrogenase subunit D (B2Δ*fdhD*; B) or the formic acid receptor (B2Δ*gj0952c*; C). The kinetic analysis of colonization capacity was determined by quantification of live *C. jejuni* in luminal colon samples until day 12 post infection by culture (CFU, colony forming units). Medians (black bars) and days post infection (on x-axis) are indicated. Numbers of animals harboring *C. jejuni* out of the total number of analyzed animals are given in parentheses. Data shown were pooled from three independent experiments. (TIF)

Acknowledgments

We thank Michaela Wattocht, Ursula Rüschenndorf, Ines Puschenndorf, Gernot Reifenberger, Uwe Lohmann, Angelina Meier, and the staff of the animal research facility for excellent technical assistance, animal breeding, and genotyping of mice. We are grateful to Simone Spieckermann for immunohistochemistry staining of colon sections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SB AF UG UBG MMH. Performed the experiments: AF RP L-MH BO MM MMH. Analyzed the data: SB AF RP L-MH BO AAK MM CL MMH. Contributed reagents/materials/analysis tools: CL AAK AEZ JID UG. Wrote the paper: SB AF AAK MM UG MMH.

References

- Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV (2000) Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I, Blazer M, eds. *Campylobacter*, 2nd ed, Vol 1. Washington: ASM Press. pp 121–138.

2. Kist M, Bereswill S (2001) *Campylobacter jejuni*. *Contrib Microbiol* 8: 150–165.
3. Bereswill S, Kist M (2003) Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 16: 487–491.
4. van Spreuwel JP, Duursma GC, Meijer CJ, Bax R, Rosekrans PC, et al. (1985) *Campylobacter colitis*: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut* 26: 945–951.
5. Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, et al. (1986) Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol Rev* 50: 81–94.
6. Ketley JM (1997) Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143(Pt 1): 5–21.
7. Tsang RS (2002) The relationship of *Campylobacter jejuni* infection and the development of Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Infect Dis* 15: 221–228.
8. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U (2010) *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 300: 205–211.
9. Dorrell N, Wren BW (2007) The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. *Curr Opin Infect Dis* 20: 514–518.
10. Chang C, Miller JF (2006) *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect Immun* 74: 5261–5271.
11. Hodgson AE, McBride BW, Hudson MJ, Hall G, Leach SA (1998) Experimental *Campylobacter* infection and diarrhoea in immunodeficient mice. *J Med Microbiol* 47: 799–809.
12. Yrios JW, Balish E (1986) Immune response of athymic and euthymic germfree mice to *Campylobacter* spp. *Infect Immun* 54: 339–346.
13. Yrios JW, Balish E (1986) Colonization and infection of athymic and euthymic germfree mice by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Infect Immun* 53: 378–383.
14. Yrios JW, Balish E (1986) Pathogenesis of *Campylobacter* spp. in athymic and euthymic germfree mice. *Infect Immun* 53: 384–392.
15. Jesudason MV, Hentges DJ, Pongpech P (1989) Colonization of mice by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 57: 2279–2282.
16. Youssef M, Corthier G, Goossens H, Tancrede C, Henry-Amar M, et al. (1987) Comparative translocation of enteropathogenic *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic mice. *Infect Immun* 55: 1019–1021.
17. Savidge TC, Smith MW, James PS, Aldred P (1991) Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol* 139: 177–184.
18. Shroff KE, Cebra JJ (1995) Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice. *Adv Exp Med Biol* 371A: 441–446.
19. Watson RO, Novik V, Hofreuter D, Lara-Tejero M, Galan JE (2007) A MyD88-deficient mouse model reveals a role for Nrp1 in *Campylobacter jejuni* infection. *Infect Immun* 75: 1994–2003.
20. Andersen-Nissen E, Smith KD, Stroble KL, Barrett SL, Cookson BT, et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9247–9252.
21. de Zoete MR, Kestra AM, Roszczzenko P, van Putten JP (2010) Activation of human and chicken toll-like receptors by *Campylobacter* spp. *Infect Immun* 78: 1229–1238.
22. Rathinam VA, Appledorn DM, Hoag KA, Amalfitano A, Mansfield LS (2009) *Campylobacter jejuni*-induced activation of dendritic cells involves cooperative signaling through Toll-like receptor 4 (TLR4)-MyD88 and TLR4-TRIF axes. *Infect Immun* 77: 2499–2507.
23. Watson RO, Galan JE (2005) Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. *Cell Microbiol* 7: 655–665.
24. Friis LM, Keelan M, Taylor DE (2009) *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 77: 1553–1560.
25. van Mourik A, Steeghs L, van Laar J, Meiring HD, Hamstra HJ, et al. (2010) Altered linkage of hydroxyacyl chains in lipid A of *Campylobacter jejuni* reduces TLR4 activation and antimicrobial resistance. *J Biol Chem* 285: 15828–15836.
26. Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA (2007) Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 85: 411–419.
27. Bell JA, St Charles JL, Murphy AJ, Rathinam VA, Plovnich-Jones AE, et al. (2009) Multiple factors interact to produce responses resembling spectrum of human disease in *Campylobacter jejuni* infected C57BL/6 IL-10^{-/-} mice. *BMC Microbiol* 9: 57.
28. Mansfield LS, Bell JA, Wilson DL, Murphy AJ, Elsheikha HM, et al. (2007) C57BL/6 and congenic interleukin-10-deficient mice can serve as models of *Campylobacter jejuni* colonization and enteritis. *Infect Immun* 75: 1099–1115.
29. Mansfield LS, Patterson JS, Fierro BR, Murphy AJ, Rathinam VA, et al. (2008) Genetic background of IL-10^{-/-} mice alters host-pathogen interactions with *Campylobacter jejuni* and influences disease phenotype. *Microb Pathog* 45: 241–257.
30. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, et al. (2006) Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 177: 8785–8795.
31. Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, et al. (2007) Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56: 941–948.
32. Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, et al. (2009) Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 206: 3047–3059.
33. Penner JL, Hennessy JN, Congi RV (1983) Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur J Clin Microbiol* 2: 378–383.
34. Poly F, Threadgill D, Stintzi A (2004) Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *J Bacteriol* 186: 4781–4795.
35. Poly F, Threadgill D, Stintzi A (2005) Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81–176-specific genes. *J Clin Microbiol* 43: 2330–2338.
36. Korlath JA, Osterholm MT, Judy LA, Forfang JC, Robinson RA (1985) A point-source outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw milk. *J Infect Dis* 152: 592–596.
37. Tareen AM, Dasti JI, Zautner AE, Gross U, Lugert R (2010) *Campylobacter jejuni* proteins Cj0952c and Cj0951c affect chemotactic behaviour towards formic acid and are important for invasion of host cells. *Microbiology* 156: 3123–3135.
38. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, et al. (2000) Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81–176. *Infect Immun* 68: 4384–4390.
39. Singh M, O'Hagan DT (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 33: 469–478.
40. Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, Plickert R, Fischer A, et al. (2010) MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* 59: 1079–1087.
41. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, et al. (2007) Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One* 2: e662.

3. DISKUSSION

3.1 Dysbiosis - Die Rolle von Gram-negativen Spezies der kommensalen Darmmikrobiota in verschiedenen Darmentzündungs-Modellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen der kommensalen Darmmikrobiota und dem Immunsystem des murinen Wirtes in verschiedenen Immunpathologiemodellen des Darms untersucht. Hierfür untersuchten wir Mäuse mit akuter, durch *T. gondii* hervorgerufener Ileitis, mit akuter DSS-induzierter Kolitis sowie Mäuse, die nach oraler *C. jejuni*-Infektion eine Enteritis entwickelten.

Kulturelle und molekulare Analysen der Darmmikrobiota ergaben, dass es im akuten Ileitis- und Kolitismodell innerhalb von 7 bis 10 Tagen zu beträchtlichen qualitativen und quantitativen Veränderungen der kommensalen Darmmikrobiota kommt. Die Spezies-Diversität nahm im Rahmen der akuten Entzündung ab, während vorwiegend Gram-negative Spezies wie kommensale *E. coli* das Darmlumen überwucherten. Dieses Reaktionsmuster der Darmmikrobiota ist erstaunlich, da sich die Modelle sowohl in der Art der Induktion (Infektion versus Chemikalie) als auch in der anatomischen Lokalisation der Entzündung (Dünn- versus Dickdarm) maßgeblich unterscheiden.

Bei Mäusen mit akuter Ileitis betrug die Zunahme der *E. coli*- sowie der *Bacteroides/Prevotella*-Populationen 7 bzw. 10 log-Stufen, während *Lactobacillus* spp. in ihrer Zahl vermindert und *Clostridium/Eubacterium* spp. gar nicht mehr nachweisbar waren. Daß die dominierenden Gram-negativen Spezies maßgeblich an der Entzündungsentstehung beteiligt waren, konnten wir im Folgenden durch die Gabe von Antibiotika wie Ciprofloxacin und Metronidazol untermauern, die in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer maßgeblich den Schweregrad der Ileitis abmilderten und zu einem längeren Überleben der behandelten Mäuse führten. Unsere Ergebnisse gehen über Befunde früherer Studien hinaus, in denen durch antibiotische Behandlung eine Absenkung der Bakterienlast erreicht wurde und der Schweregrad der Ileitis vermindert werden konnte [107, 121]. Im Gegensatz zu unseren Studien wurden Darmmikrobiota-Veränderungen jedoch nicht näher analysiert. Da Zellwandbestandteile der kommensalen Darmbakterien Liganden für spezifische TLRs darstellen, untersuchten wir in einer weiterführenden Studie die

Veränderungen löslicher intraluminaler TLR-Äquivalente während der Entzündungsentstehung [122]. So konnten wir im Ileumlumen von Mäusen mit akuter Ileitis im Vergleich zu gesunden Tieren stark erhöhte Konzentrationen von Lipopeptid-, Lipopolysaccharid- und Flagellin-Äquivalenten nachweisen. In Ergänzung zu unseren deskriptiven kulturellen und molekularen Untersuchungen zeigten diese Studien, dass die das Ileumlumen überwuchernden *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. nicht nur maßgeblich zum löslichen TLR-4-, sondern auch zum TLR-2-Ligandenpool beitrugen. Interessanterweise kam es im Rahmen der Florenverschiebung in Richtung kommensaler Gram-negativer Spezies bei akuter Ileitis und Kolitis ebenfalls zu einer Vermehrung von löslichen TLR-5-stimulierenden Faktoren im Ileum-, aber nicht im Kolonlumen. Da aber sowohl *E. coli* als auch *Bacteroides/Prevotella* spp. das Ileum- sowie Kolonlumen überwucherten, war *bis dato* unklar, welcher Faktor für die TLR-5-Reaktivität im Dünndarm bei akuter Ileitis verantwortlich war. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TLR-11-Ligand *T. gondii*-Profilin in menschlichen Monozyten TLR-5-abhängige Antworten auslösen kann [123]. In funktionellen „Cluster“-Analysen stellte sich heraus, dass bei Mensch und Maus TLR-11 und TLR-5 entwicklungsgeschichtlich aus einer *tlr11* Gen-Duplikation entstanden sind. Weiterhin wurden TLR-5-abhängige Antworten auf TLR-11-Liganden (und umgekehrt) beschrieben [124-127]. Obgleich eine Überlappung zwischen muriner TLR-5- und TLR-11-Liganden-Spezifität beschrieben worden ist, steht eine ausführliche vergleichende Analyse von TLR-5- und TLR-11-Liganden in murinen Zellen bislang noch aus [123]. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass die bei Mäusen mit akuter Ileitis im Dünndarmlumen nachgewiesenen löslichen aktiven TLR-5-Liganden auf das *T. gondii*-Profilin zurückzuführen sind.

Um den Beitrag der jeweiligen Spezies an der Th1-Typ-Immunpathologie der akuten Ileitis näher zu untersuchen, führten wir selektive Rekolonisierungen von gnotobiotischen Mäusen durch, bei denen vorab die komplexe Darmmikrobiota durch eine 8- bis 10-wöchige Breitspektrum-Antibiotikabehandlung eradiziert worden war. Während nicht besiedelte sowie durch *Lactobacillus* spp. besiedelte Mäuse vor der *T. gondii*-Ileitis geschützt waren, entwickelten selektiv mit *E. coli*, *Bacteroides/Prevotella* spp. bzw. mit der kompletten Dünndarm-Mikrobiota oral transplantierte Mäuse die Immunpathologie und verstarben früher im Vergleich zu *T. gondii*-infizierten aber nicht-rekolonisierten Gnotobioten [128]. Durch diese Versuche

wurde die Kausalität der Mikrobiota an der Immunpathogenese der akuten *T. gondii*-induzierten Ileitis bewiesen und die Kochschen Postulate erfüllt, wonach eine Eradikation definierter Spezies die Pathologie verhindert und nach Wiedereinführung in den Wirt das Vollbild der Erkrankung induziert werden kann [129].

In einer weiteren Arbeit konnten wir zeigen, daß eine pharmakologische Modulierung der Entzündung im akuten *T. gondii*-Ileitismodell mit einer Veränderung der Darmmikrobiota einherging. So wiesen mit verschiedenen anti-inflammatorisch und anti-oxidant wirksamen Substanzen wie Resveratrol, Curcumin oder Simvastatin behandelte Mäuse nicht nur eine weniger stark ausgeprägte Th1-Typ-Immunpathologie nach oraler *T. gondii*-Infektion nebst verbesserter epithelialer Barrierefunktion des Ileum auf, sondern auch eine verminderte Besiedlung des Ileumlumens mit *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp., während *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Arten, die als potentiell anti-inflammatorisch wirksam angesehen werden, vermehrt nachgewiesen werden konnten [130]. Interessanterweise hatte keine der verwendeten Substanzen eine direkte antimikrobielle Wirksamkeit.

Weiterführend konnten wir mögliche molekulare Mechanismen für das Ausbleiben der Th1-Typ-Immunpathologie bei gnotobiotischen Mäusen im akuten Ileitismodell aufzeigen. So war bei konventionell besiedelten Mäusen die Induktion der Inflammationskaskade nach *T. gondii*-Infektion maßgeblich von einer IL-23-abhängigen IL-22-Aktivierung abhängig. In Abwesenheit der kommensalen Mikrobiota hingegen wiesen *T. gondii*-infizierte Mäuse keine IL-22 Expression im Ileum auf [112]. Interessanterweise konnten wir in dieser Arbeit zum ersten Mal pro-inflammatorische Effekte von IL-22 im Dünndarm nachweisen, während IL-22 im Kolon anti-inflammatorisch wirksam ist [51, 131-133]. Zusammenfassend, brachten diese Ergebnisse die neue Erkenntnis, dass zur Induktion und Aufrechterhaltung der Th1-Typ-Immunpathologie im akuten *T. gondii*-induzierten Ileitismodell maßgeblich bestimmte Komponenten der kommensalen Mikrobiota erforderlich sind.

Unsere Befunde wurden in folgenden Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt. So beschrieben Craven und Kollegen ebenfalls markante Mikrobiotaverschiebungen im entzündeten Dünndarmlumen von *T. gondii*-infizierten Mäusen, die von einer geringeren Diversität und einem vermehrten Auftreten von *E. coli* mit invasiven Eigenschaften gekennzeichnet war [134]. Interessanterweise waren diese Befunde am ausgeprägtesten bei NOD2^{-/-} Tieren mit Ileitis, wobei bereits naive NOD2^{-/-} Tiere

eine veränderte Mikrobiota im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren aufwiesen. Angesichts der Tatsache, dass bei etwa 20 bis 30% von Patienten mit CED NOD2-Gen-Polymorphismen beschrieben wurden [135], schlussfolgerten die Autoren, dass die bei naiven NOD2^{-/-} Mäusen beobachteten Mikrobiotaveränderungen quasi die bei genetisch disponierten Personen berichtete Prädysbiose widerspiegeln und diese bei akuter Ileitis sich weiter verschärfte [134, 136]. In einer weiteren Arbeit zeigte sich ebenfalls ein Überwuchern des Dünndarms von *T. gondii*-infizierten Mäusen mit Enterobakterien [16]. Die Autoren beschrieben zudem bei Mäusen mit Ileitis einen massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in das entzündete Ileumlumen, die sich entlang des Ileumepithels zu einer quasi an einen Gipsverband erinnernden Struktur („intraluminal cast“) zusammenlagerten, um dadurch den Kontakt der überwuchernden *E. coli* mit dem Ileumepithel zu minimieren. Die Organisation dieser Struktur war von Fpr1, einem „high affinity N-formyl peptide receptor“, abhängig [16].

Interessanterweise konnten wir die massiven Florenveränderungen und die pro-inflammatorische Wirkungen kommensaler Bakterien im Dünndarm, insbesondere Gram-negativer Spezies, in weiteren unabhängigen Entzündungsmodellen des Dickdarms bestätigen. So zeigten sich im akuten DSS-Kolitis-Modell ebenfalls charakteristische Verschiebungen der Kolon-Mikrobiota, die durch einen Verlust der Diversität und bestimmter Populationen wie *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., *Bryantella* spp. sowie *Tannerella* spp. gekennzeichnet waren, während erneut die Gruppe der *Enterobacteriaceae* (i.e. *E. coli*) das Darmlumen überwucherten (Anstieg von ca. 4 log-Stufen) [137]. Wir konnten weiterhin erhöhte Konzentrationen an TLR-2- und TLR-4-Liganden im entzündeten Kolonlumen nachweisen [122]. Unsere Befunde stehen im Einklang mit einer weiteren Studie, in der C57B1 und C3H Mäuse mit akuter DSS-Kolitis ebenfalls höhere Enterobakterien-Lasten aufwiesen [115]. Während TLR-2^{-/-}, TLR-4^{-/-} sowie TLR-2/4^{-/-} Mäuse eine Woche nach Induktion der akuten Kolitis weniger *E. coli*-Lasten in ihrem Kolon und auch eine weniger stark ausgeprägte Pathologie aufwiesen, war interessanterweise die Zusammensetzung der Kolon-Mikrobiota gesunder Tiere von TLR-2 und TLR-4 unabhängig [149]. Es konnte nachfolgend hingegen bei MyD88^{-/-} und TLR-5^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass die TLR-Signaltransduktion wiederum Einfluß auf die Darmmikrobiota-Zusammensetzung *in vivo* nehmen kann [84, 138, 139].

In einem weiteren akuten Darmentzündungsmodell, nämlich der murinen Darm-“Graft-versus-Host“-Erkrankung (GvHD) nach allogener Stammzelltransplantation konnten wir ebenfalls eine verminderte Diversität Darmmikrobiota feststellen, während *E. coli* (Anstieg um ca. 4 log-Stufen), Enterokokken und *Bacteroides/Prevotella* spp. auf Kosten von *Lactobacillus*-Populationen das entzündete Darmlumen überwucherten [140]. Diese Veränderungen der Darm-Mikrobiota entwickelten sich etwa ab dem 7. Tag nach Transplantation und somit im Zuge der akuten Darm-GvHD und nicht durch die Konditionierung nach Treosulfan und Cyclophosphamid-Behandlung oder mögliche Mukositis bedingt. Darüberhinaus zeigte sich, daß die Höhe der *E. coli*-Lasten im Kolon direkt mit der Schwere der Darm-GvHD und der Mortalität vergesellschaftet war [140]. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen aus anderen Entzündungsmodellen, in denen die pro-inflammatorische Wirkung von *E. coli*, Enterokokken und *Bacteroides/Prevotella* spp. gezeigt werden konnte [4, 128, 137, 141].

In einer weiteren eigenen Studie wiesen IL-10^{-/-} Mäusen, die in Abhängigkeit von ihrer Mikrobiota innerhalb von etwa 3 bis 4 Monaten eine chronische Kolitis entwickeln, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ca. 3 log-Stufen höhere *E. coli*-Lasten im Darm auf [142]. Ein Grund dafür, dass v.a. die *E. coli*-Lasten im Zuge der Entzündungsentstehung unabhängig von deren Ätiologie anstiegen, mag zum einen mit den Wachstumsbedingungen der *Enterobacteriaceae* zusammenhängen und zum anderen mit den Veränderungen des intraluminalen Milieus (z.B. veränderter pH, Verfügbarkeit von Substraten, Sauerstoffspannung, etc.) im Zuge der durch die Entzündung bedingten veränderten Darmphysiologie [137, 140]. So verbleiben im Zuge der durch die Entzündung bedingten eingeschränkten Reabsorptionskapazitäten vermehrt Zuckbestandteile im Darmlumen. Entsprechend haben *E. coli* als schnell replizierende Bakterien in der komplexen Bakteriengemeinschaft einen Wachstumsvorteil gegenüber den langsam wachsenden v.a. obligat anaeroben Konkurrenten im Wettstreit um Nährstoffe und Nischen, wenn während der Entzündung zudem aus abgeschilferten Epithelzellen, Debris, Transsudat etc. vermehrt Substrate wie Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen zur Verfügung stehen [137, 140].

In einem weiteren intestinalen Pathogen-induzierten Darmentzündungsmodell, nämlich der durch *Campylobacter jejuni* induzierten Enteritis, konnten wir in jüngeren

Untersuchungen zeigen, daß kommensale *E. coli* eine maßgebliche Rolle spielen. So sind konventionell besiedelte adulte Mäuse ab einem Alter von ca. 8 Wochen vor einer *C. jejuni*-Infektion aufgrund der physiologischen Kolonisationsresistenz, die durch die wirtsspezifische Zusammensetzung der Darmmikrobiota determiniert wird, geschützt [119, 143]. Interessanterweise kann *C. jejuni* aber den Darm 3 Wochen junger Tiere (nach Absetzen von der Mutter) stabil infizieren und eine akute Enterokolitis auslösen [144, 145]. Die Mikrobiota von Jungtieren unterschied sich von der erwachsener Mäuse u.a. durch etwa 2 bis 3 log-Stufen höhere *E. coli*-Lasten im Darm [144]. In einer weiteren Studie konnten wir demonstrieren, daß die physiologische Kolonisationsresistenz artifiziell überkommen werden kann, und zwar durch eine Erhöhung der intraluminalen Last einer einzelnen kommensalen Spezies im Darm. Nach Fütterung mit einem einzigen lebenden *E. coli*-Stamm, der vorab aus der murinen kommensalen Mikrobiota isoliert worden war, stieg die intestinale *E. coli*-Dichte um ca. 4 log-Stufen an, woraufhin *C. jejuni* im Darm adulter Mäuse stabil ansiedeln konnte [146]. Weiterhin gelang die *C. jejuni*-Infektion auch bei gnotobiotischen Mäusen, die mit einer komplexen humanen Mikrobiota rekonstituiert worden waren [143], bei konventionell, mit einer westlichen „Cafeteria“-Diät ernährten Mäusen [147], übergewichtigen, an Leptin-Gendefizienz leidenden ob/ob-Mäusen [147], konventionell besiedelten Mäusen mit akuter *T. gondii*-induzierter Ileitis [146] sowie IL-10^{-/-} Mäusen mit chronischer Kolitis [146, 148]. All diesen Mäusen war zusammenfassend zwischen 2 bis 8 log-Stufen höhere *E. coli*-Lasten im Darmlumen gemein. Mit metabolomischen Analysen untersuchen wir derzeit die luminalen biochemischen Faktoren, die eine *C. jejuni*-Infektion fördern oder verhindern.

Wir konnten jüngst zeigen, daß es bei über 14 Monate mit *Helicobacter (H.) pylori* infizierten Gerbilen, die ausgeprägte Entzündungen sowie Adenokarzinome im Bereich des Magens aufwiesen, ebenfalls zu Florenverschiebungen im gesamten Gastrointestinaltrakt kam [149]. Interessanterweise waren diese v.a. in nicht entzündeten distalen Abschnitten am prägnantesten. Entsprechend fanden sich höhere *E. coli*- und *Bacteroides/Prevotella* spp.-Lasten im Kolon infizierter im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren [149]. Auch in einem murinen Wurminfektionsmodell konnten wir Mikrobiotaveränderung mit Dominanz Gram-negativer Spezies nachweisen [150]. Innerhalb von 14 Tagen nach Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* entwickelten Mäuse eine Th2-Typ-

Immunpathologie mit entzündlichen Veränderungen im Bereich des Dünndarms, die begleitet war von einem Anstieg der *E. coli*- und *Bacteroides/Prevotella* spp.-Dichten sowohl im entzündeten Ileum als auch in nicht-entzündeten distaleren Abschnitten von Caecum und Kolon [150].

Die o.g. Arbeiten zeigen die Bedeutung der Mikrobiota und hierbei insbesondere der Gram-negativen Kommensalen während verschiedenener Immunpathologien auf. In den von uns untersuchten Darminflammationsmodellen zeigten sich dabei vorwiegend pro-inflammatorische Effekte kommensaler *E. coli*. Frühere experimentelle Studien anderer Gruppen zeigten unterschiedlich stark ausgeprägte entzündungsfördernde Effekte verschiedener Gram-negativer Spezies. Während nach Rekolonisierung gnotobiotischer IL-2^{-/-} Mäuse mit *E. coli* mpk sich eine Kolitis auslösen ließ, war dies nach selektiver Besiedlung mit *E. coli* Nissle 1917 und *Bacteroides (B.) vulgatus* mpk nicht der Fall [151]. Die Autoren konnten im Folgenden mittels Genexpressionsanalysen zeigen, dass nach Besiedlung mit *E. coli* mpk bestimmte anti-inflammatorische Gene aus der RegIII-Genfamilie im Kolon herunterreguliert waren, während diese bei mit *E. coli* Nissle 1917 oder *B. vulgatus* mpk besiedelten gnotobiotischen IL-2^{-/-} Mäusen verstärkt exprimiert wurden [152]. Die pro- oder anti-inflammatorische Kompetenz der Gram-negativen Spezies hängen aber nicht nur mit dem jeweiligen Stamm, sondern möglicherweise auch mit dem (patho-) physiologischen Kontext, dem Zytokinmilieu, dem Inflammationsmodell und dem betroffenen Gewebetyp und dessen Immunzellrepertoire, genetischen Hintergrund und Besiedlungsstatus der Mäuse, der maßgeblich von Diät und Haltungsbedingungen in den jeweiligen Tiereinrichtungen beeinflusst wird, und weiteren Faktoren zusammen [153-158]. Interessanterweise induzierten als apathogen bzw. probiotisch wirksam bewertete *E. coli*-Stämme wie *E. coli* K12 oder *E. coli* Nissle 1917 im akuten *T. gondii*-Ileitismodell histopathologische Veränderungen der Dünndarmmukosa, die mit inflammatorischen Reaktionen wie etwa einem vermehrten Einstrom von T-Lymphozyten assoziiert waren [159]. Zusammenfassend, kann die intestinale *E. coli*-Dichte quasi als Aktivitätsmarker für entzündliche Prozesse gewertet werden. Dabei zeigten diese das Darmlumen überwuchernden Gram-negativen Kommensalen unabhängig von der Ätiologie der induzierten Inflammation und der Lokalisation bzw. dem Gewebetyp pro-inflammatorische Effekte.

3.2. Die Rolle von Rezeptoren der angeborenen Immunität bei der Vermittlung von Darmentzündungen

Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob und, wenn ja, welche spezifischen Virulenzfaktoren von *E. coli* die Entzündungsreaktionen triggerten. Wir konnten mittels RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction) aus Darminhalten gesunder und an akuter Ileitis erkrankter Mäuse zeigen, dass ein einziger *E. coli*-Stamm die Gruppe der *Enterobacteriaceae* im Darm der in unserer Tierhaltung gezüchteten Wildtyp-Mäuse dominierte, der während der Entwicklung der Immunpathologie klonal expandierte. Wie haben diesen Stamm im Labor von Prof. Florian Gunzer (Technische Universität Dresden) weiter molekular charakterisieren lassen und konnten keine *bis dato* bekannten „klassischen“ Pathogenitätsfaktoren wie beispielsweise Shiga-Toxin *stx1/2*, Intimin *eaeA*, alpha-Hämolysin *hlyA*, Serinprotease *espA*, Katalase/Peroxidase *katP*, hitzestabiles Enterotoxin *astA* nachweisen [146, 159]. Wir stellten daher nachfolgend die Hypothese auf, daß definierte *E. coli*-Antigene wie Lipoprotein und LPS, die von TLR-2 bzw. TLR-4 erkannt werden, die jeweiligen Entzündungsreaktionen triggerten. Im akuten Ileitismodell konnten wir interessanterweise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, daß das LPS im Gegensatz zum Lipoprotein der kommensalen *E. coli* TLR-4-vermittelt maßgeblich an der Entzündungsentstehung beteiligt war. So waren etwa TLR-4^{-/-} im Gegensatz zu TLR-2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen vor dem Vollbild der akuten Ileitis geschützt [141]. Außerdem führte die Behandlung von *T. gondii*-infizierten gnotobiotischen Wildtyp, nicht aber von TLR-4^{-/-} Mäusen mit hochgereinigtem synthetischem Lipid A (als Kernstruktur des LPS) zur akuten Ileitis. Interessanterweise waren die Translokationsraten von lebenden *E. coli* vom Darmlumen in MLNs, Milz und Leber im akuten Ileitismodell von TLR-2 und TLR-4 unabhängig. Niedrigere IFN- γ und NO-Konzentrationen im Dünndarm von TLR-4^{-/-} Mäusen legen den Schluß nahe, daß translozierte *E. coli* LPS-vermittelt und von TLR-4 abhängig die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren aus professionellen Phagozyten stimulieren, die wiederum für folgende T-Zell-Antworten während der Immunpathologie erforderlich sind [141].

Im akuten DSS-Kolitismodell wiesen Mäuse, die für TLR-2 und/oder TLR-4 gendefizient waren, weniger stark ausgeprägte Entzündungsreaktionen auf. Der

zusätzliche Beitrag von TLR-2-Liganden an der Immunpathogenese der DSS-Kolitis wird durch den Befund untermauert, daß im entzündeten Kolon im Gegensatz zu gesunden Mäusen bislang nicht-kultivierbare *Clostridium*-Arten mittels molekularer Methoden nachgewiesen werden konnten [137]. Im Gegensatz zu unserer Studie zeigte sich im akuten DSS-Kolitis-Modell, daß TLR-2, TLR-4 und MyD88 maßgebliche Bedeutung bei der Aufrechterhaltung die Epithelzell-Homöostase zukommen [160]. Entsprechend war nach einer systemischen Verabreichung von TLR-4-blockierenden Antikörpern die Wiederherstellung der Gewebsintegrität gestört, wobei die durch rekrutierte Zellen hervorgerufene akute Entzündungsantwort weniger stark ausgeprägt war [161]. Weiterhin kam es auch bei Mäusen, die gendefizient für TLR-3, -5 oder -9 waren, im DSS-Kolitismodell zu einer verzögerten oder verminderten Gewebsregeneration [162-164].

Die von Rakoff-Nahoum und Mitarbeitern beschriebenen und zu unserer Studie diskrepanten Ergebnisse, die zeigten, daß TLR-2^{-/-}, TLR-4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen im DSS-Kolitis-Modell eine höhere Sterblichkeit und stärker ausgeprägte Darmentzündungen aufwiesen [160], könnten verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die LPS-Sensitivität der untersuchten Tierstämme sich unterscheiden, wobei die Datenlage hierzu uneinheitlich ist. Während in einer Studie mit C57B1 und C3H Mäusen die akute DSS-Kolitis maßgeblich von der Empfindlichkeit des jeweiligen Mausstamms gegenüber LPS abhing [115], zeigte eine andere Arbeit hingegen, daß der Schweregrad der DSS-Kolitis zwischen bestimmten Mausstämmen variieren kann, diese Unterschiede aber nicht zwingend auf dem Grad der Empfindlichkeit gegenüber LPS beruhen [165]. Des Weiteren könnten die gegensätzlichen Ergebnisse unserer Studie und der von Rakoff-Nahoum und Mitarbeitern durch die jeweiligen Experimentalbedingungen bedingt sein. So erhielten Mäuse in der Arbeit von Rakoff-Nahoum et al. 2% DSS (gegenüber 3,5 % in unserer Studie), infolgedessen die Wildtyp-Kontrollmäuse nach 1 Wochen nur geringgradige klinische Symptome (knapp 5 % Gewichtsverlust) und allenfalls milde histopathologische Veränderungen der Kolonmukosa aufwiesen. Zudem wiesen die Mäuse bei Rakoff-Nahoum et al. einen F2-Mischhintergrund (129/SvJ x C57BL/6) auf, während die von uns verwendeten Tiere im reinen C57/BL10-Hintergrund gezüchtet worden waren. Zusätzlich könnten Unterschiede in der Zusammensetzung der kommensalen Mikrobiota, von Geschlecht und Alter der verwendeten Tiere die Empfindlichkeit des Kolonepithels auf DSS unterschiedlich beeinflussen [154-156,

166]. Bemerkenswerterweise konnten andere Arbeitsgruppen die von Rakoff-Nahoum et al. gezeigten Befunde nicht reproduzieren (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Matthais Hornef, Prof. Dr. Gratiela Pircalabioru).

Die Erkennung durch TLR-Liganden und anschließende Signaltransduktion scheint *in vivo* eher komplexer Natur zu sein und vom jeweiligen Entzündungsmodell, Gewebetyp und Ko-Faktoren (i.e. Zytokin-Milieu, Mausstamm) abzuhängen [84]. Somit können bestimmte TLR-Liganden entweder protektiv [65, 139, 160, 167-169] oder schädigend wirksam werden [115, 170-172]. Die Behandlung mit TLR-4- oder TLR-9-Agonisten (wie etwa LPS oder CpG-ODN) beispielsweise verstärkte die vorab induzierte Entzündungsreaktion im Dick- bzw. Dünndarm von Mäusen [173, 174]. Die Verabreichung des als LPS-Antagonist (LPS-“Fänger“) bekannten Engspektrum-Antibiotikums Polymyxin B oder des als TLR-9-Antagonist fungierenden inhibitorischen iODN verhinderten in unseren Arbeiten die akute Ileitis bzw. Darm-GvHD in der Maus [140, 141]. Im Einklang mit diesen Befunden stehen unsere Ergebnisse, die wir im murinen *C. jejuni*-Infektionsmodell erhoben haben. So spielen die von TLR-4 und TLR-9 des Wirtes abhängige Erkennung von *C. jejuni*-Lipooligosaccharid und -CpG-DNA eine maßgebliche Rolle bei der Pathogen-induzierten Immunpathologie [143]. In zwei spontanen Kolitismodellen, nämlich der IL-2^{-/-} und der IL-10^{-/-} Maus, führte die zusätzliche Deletion des TLR-Adaptermoleküls MyD88 zu einer Verhinderung der weiteren Entzündungsentwicklung [171], während TLR-5^{-/-} Mäuse eine spontane Kolitis entwickelten, die aber bei Mäusen, die zusätzlich für TLR-4 gendefizient waren, nicht auftrat [139].

Die pro-inflammatorische Rolle von TLR-2 und TLR-4 konnten wir in einem weiteren unabhängigen akuten Kolitis-Modell untermauern. So entwickelten gnotobiotische IL-10^{-/-} Mäuse, die zusätzlich für TLR-2 oder TLR-4 gendefizient waren, eine signifikant weniger stark ausgeprägte Enterokolitis nach Infektion mit *C. jejuni* [142], so dass bakterielles Lipoprotein und Lipooligosaccharid maßgeblich an der akuten *C. jejuni*-induzierten Immunpathogenese beteiligt sind. Zudem war die TLR-4-abhängige Signaltransduktionskaskade ebenfalls entscheidend an der Vermittlung von extra-intestinalen Immunantworten nach *C. jejuni*-Infektion beteiligt [148].

Zusammenfassend, hängt die Bedeutsamkeit des TLR-Signalweges für die Wechselwirkung zwischen kommensalen bzw. symbiontischen Bakterien und dem Wirt vom jeweiligen Kontext ab. Wirtsimmunität sowie Umwelt- und genetische

Faktoren modulieren die TLR-Expression in der Darmmukosa. Umgekehrt beeinflusst die TLR-Signalübertragung in der Darmmukosa „Umweltsignale“, genetische Funktionen und Immunantworten im Darm. Es besteht eine Dichotomie von TLR-Regulation und -Funktion in der gesunden und entzündeten Darmmukosa, so daß ein schmaler Grat zwischen Schutzfunktion und Schädigung des Wirtes besteht. Im gesunden Wirt ist die basale TLR-Signalübertragung maßgeblich an den Wirt schützenden sowie Gewebsreparatur-Mechanismen beteiligt, wodurch das Gleichgewicht von kommensalen Bakterien und Immunantworten aufrechterhalten wird [80]. Im Wirt, der für CED empfänglich ist, tragen fehlgesteuerte, inadäquate TLR-Signalwege zu einer Störung der Homöostase von Mukosa und Mikrobiota bei, in deren Folge es zu Gewebsdestruktion etwa bei CED kommt. Überschießende Aktivierungen des adaptiven Immunsystems infolge von TLR-Gendefizienz (Polymorphismen) können Gewebeschäden und progrediente Entzündungsprozesse bei CED fördern. Verschiedene Gendefekte, die mit CED assoziiert sind, zeigen ihrerseits die Variabilität von TLR-Regulierung und -Funktion, in Abhängigkeit von der jeweiligen Pathologie und dem Zelltyp der Darmmukosa, der in dem Erkrankungsprozeß dominiert [80].

3.3. Florenverschiebungen bei Patienten mit Darmentzündungen

Beim Menschen wurde das Phänomen der Überwucherung des Darms mit Gram-negativen Kommensalen bei Patienten mit CED [175-180], GvHD [181], akuter Pankreatitis [182], Leberzirrhose [183], nach längerer parenteraler Ernährung und eingeschränkter Darmmotilität [184] beobachtet.

Nach aktuellen Erkenntnissen ist die inadäquate, fehlgesteuerte Immunantwort des Menschen auf die eigene kommensale Darmmikrobiota eine maßgebliche Triebfeder bei der Immunpathogenese von CED [4, 92]. Definiert man die mikrobiellen Zellen in unserem Darm als „Selbst“, wären CED als Autoimmunerkrankungen zu bezeichnen [185]. Im Einklang mit unseren Daten aus Darmentzündungsmodellen der Maus konnten humane Studien zeigen, dass es auch während der Entstehung von CED zu quantitativen sowie qualitativen Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota kommt [4, 9]. So nahm die Diversität bei den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes bei CED dramatisch ab [4, 92,186] und hierbei insbesondere die Zahl

der Buttersäure-produzierenden und zu den Firmicutes zählenden Spezies *Faecalibacterium prausnitzii* [92, 187]. Buttersäure wiederum stellt ein wichtiges Substrat für den Kolonepithel-Stoffwechsel dar, fördert die Generierung von Tregs und hat einen wichtigen Einfluß auf die Epithelbarriere [188]. Andererseits nahmen Mitglieder der Phyla Proteobacteria und Actinobacteria bei Patienten mit aktivem M. Crohn zu [4, 92, 186, 189, 190]. Auch waren bei M. Crohn-Patienten v.a. intestinale *E. coli*, die einen adhätierenden und invasiven Phänotyp (AIEC) aufwiesen, vermehrt nachweisbar [191]. Interessanterweise wurde das zunehmende Wachstum von AIEC durch vermehrt vorkommende mukolytische Bakterien, wie etwa *Ruminococcus* spp., begünstigt [192]. Im Einklang mit unseren tierexperimentellen Ergebnissen verminderte die Behandlung von CED und Darm-GvHD-Patienten mit gegen Gram-negative Spezies gerichtete Antibiotika Ciprofloxacin und Metronidazol die intestinale Entzündungsaktivität [181, 193, 194].

Zudem zeigten sich erhöhte bakterielle Translokationsraten bei Patienten mit CED im aktiven Stadium [92, 186, 191, 195-197]. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs- (FISH-) Analyse konnten wir bei Mäusen mit akuter Ileitis analog zu den humanen Studien Translokationen Gram-negativer Spezies wie *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. durch die gestörte Epithelbarriere in subepitheliale Kompartimente nachweisen. Der damit ermöglichte direkte Kontakt mit Immunzellen dürfte für das sukzessive Entzündungsgeschehen mit verantwortlich sein [128]. Dieser Befund sowie die Tatsache, dass bei Patienten mit CED spezifische gegen mikrobielle Antigene von Vertretern der Darmmikrobiota gerichtete Antikörper nachgewiesen werden konnten, untermauern die Hypothese, dass translozierte Bakterien das Entzündungsgeschehen unterhalten [92].

Es ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings unklar, ob die bei CED beobachtete intestinale Dysbiose Ursache oder Folge der Immunpathologie ist. Interessanterweise konnte bei gesunden Verwandten ersten Grades von Patienten mit CED eine sogenannte Prädysbiose, eine Art Vorläufer-Zustand der Dysbiose, festgestellt werden [136], was vermuten läßt, daß der Entwicklung einer CED eine Störung der Darmmikrobiota vorangeht. Allerdings können wiederum Entzündungen *per se* ebenfalls zu einer (Prä-) Dysbiose führen [198]. Zusammenfassend, zeigen sich in Analogie zu den geschilderten Ergebnissen aus tierexperimentellen Modellen

auch bei Patienten mit intestinalen Immunpathologien dramatische Verschiebungen der Darmmikrobiota, die das Entzündungsgeschehen triggern und weiter unterhalten.

3.4 Ausblick: Bakterien der Mikrobiota als Zielstrukturen für innovative Therapie von Darmentzündungen

Zur Zeit werden die meisten CED-Patienten vornehmlich mit Kortikosteroiden, Thiopurinen, Methotrexat oder anti-TNF-Antikörpern behandelt [199-201]. Diese immunsupprimierenden Substanzen sind allerdings mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen, wie etwa einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen, verbunden. Zudem sprechen beispielsweise etwa 30% von CED-Patienten nicht oder nur unzureichend auf eine Behandlung mit TNF-Antikörpern an [202, 203]. Eine aktuelle Untersuchung zeigte, daß funktionelle Polymorphismen, die den NF- κ B-Signaltransduktionsweg betreffen, hierfür verantwortlich gemacht werden konnten; hierbei wurden auch Polymorphismen von TLR-2, -4 und -9 beschrieben [204].

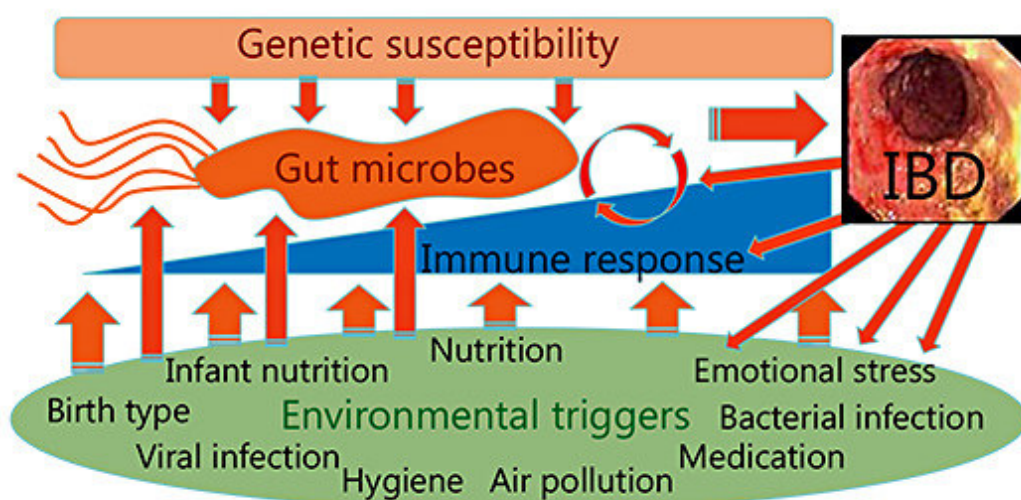


Abbildung 6. Longitudinaler Einfluß von Darmbakterien in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Bakterien und deren Zellwandbestandteile sind in vielerlei Hinsicht an der Immunpathogenese von CED beteiligt. Die meisten Suszeptibilitätsgene stehen in Bezug zu Wirtsantworten auf Bakterien und viele der Umweltfaktoren nehmen zudem direkten Einfluß auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota. Eine bereits entstandene Darmentzündung führt in der Folge zu weiteren Veränderungen der Darmmikrobiota, was den Teufelskreis in Richtung Immunpathogenese von CED sukzessive unterhält. In diesem Kontext könnten Behandlungskonzepte ansetzen, mit denen nicht nur das Immunsystem, sondern auch die Mikrobiota gezielt moduliert werden soll. IBD: inflammatory bowel diseases. Entnommen aus [201].

Die geschilderten Kenntnisse zu den Wechselwirkungen zwischen Mikrobiota und Wirtsantwort bei Maus und Mensch im Zuge von Darmentzündungen eröffnen ausblickend neue Therapiemöglichkeiten (Abbildung 6).

So könnten gegen die Darmmikrobiota gerichtete Maßnahmen neue Strategien für die ergänzende oder alternative Behandlung und Prophylaxe von CED-Patienten darstellen. Entsprechend kommen der Einsatz von Antibiotika, Probiotika, Präbiotika oder die Stuhltransplantation in Betracht. So hat sich die antimikrobielle Behandlung mit Ciprofloxacin und/oder Metronidazol bei der Kolitis/Ileokolitis des M. Crohn bewährt, während bestimmte Probiotika sich hingegen bei der Verhinderung von Rückfällen bei Colitis ulcerosa als wirksam erwiesen [4, 205-207]. Ein weiterer Ansatz besteht in der Verabreichung von Präbiotika [205, 206], so etwa von nicht verdaulichen Oligosacchariden wie Inulin oder Oligofruktose, die in pflanzlichen Produkten und in Ballaststoffen vorkommen. Präbiotika werden im proximalen Intestinaltrakt weder verstoffwechselt noch absorbiert und gelangen somit unverdaut in den Dickdarm. Dort metabolisieren bestimmte obligat anaerobe Darmbakterien diese Oligosaccharide, in deren Folge kurzkettige Fettsäuren wie beispielsweise Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure entstehen. Diese kurzkettigen Fettsäuren wiederum fördern das Wachstum protektiver Symbionten im Darm und verhindern das Wachstum von Pathobionten [205]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß kurzkettige Fettsäuren eine wichtige Energiequelle für Kolonepithelzellen darstellen [208], die mukosale Barrierefunktion stabilisieren, die Mukusproduktion fördern, die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-10 stimulieren, im Gegenzug die von pro-inflammatorischen Mediatoren drosseln und die Generierung anti-inflammatorischer Tregs fördern [188, 205]. Allerdings sind die Ergebnisse aus bisherigen relativ kleinen Studien eher ernüchternd [209]. Ermutigend hingegen sind die Möglichkeiten, die intestinale Mikrobiota durch eine Stuhltransplantation zu beeinflussen [210, 211]. So konnten Patienten, die unter rezidivierenden Therapie-refraktären *C. difficile*-Toxin-induzierten nekrotisierenden Enterokolitiden litten, von ihrem Leiden befreit werden [212]. Entsprechend wäre die fäkale Transplantation ebenfalls als Option zur Behandlung von Patienten mit CED in Erwägung zu ziehen. Einer aktuellen Metaanalyse zufolge führten fäkale Transplantationen zu klinischen Remissionsraten von über 60% bei Patienten mit M. Crohn bzw. über 20% mit Colitis ulcerosa [213]. Während diese Behandlung von den Patienten gemeinhin gut

toleriert wurde, stehen Untersuchungen zu immunologischen Langzeiteffekten bislang aus.

Bei direkt gegen TLRs gerichteten Therapieansätzen von intestinalen Immunpathologien ist allerdings aufgrund der Dichotomie der TLR-Funktionen Vorsicht geboten, da man Gefahr läuft, gleichzeitig regenerative Gewerbsprozesse und Immuntoleranz zu unterdrücken.

Tabelle 2: Mögliche zukünftige Behandlungsstrategien von Darmentzündungen, basierend auf der Modulation der Mikrobiota des Patienten. Entnommen aus [201].

Management objectives	Treatment approaches
Biological classification of disease	Antibiotics, probiotics, prebiotics
Prediction of response and risk	Postbiotics (microbial products)
Primary prevention	Fecal microbial transplantation
Secondary prevention	Microbe-altering diet
Cure	Engineered (designer) microbes

Zusammenfassend, sollten bei intestinalen Immunpathologien komplexer Ätiologie optimalerweise Therapiemaßnahmen mit verschiedenen Angriffspunkten eingesetzt werden, um Synergieeffekte zu erzielen. Hierbei werden Behandlungsoptionen, mit denen die Mikrobiota moduliert und somit das Wechselspiel zwischen Mikrobiota und Immunsystem positiv beeinflusst werden kann, zunehmend an Bedeutung gewinnen [201]. Wünschenswert wären in diesem Kontext auf den jeweiligen Patienten individuell zugeschnittene Therapiestrategien (Tabelle 2). Hierfür sind allerdings weitreichende technologische Fortschritte, beispielsweise für die Analyse von Bakterien-Wirts-Interaktionen und für die rechtzeitige Identifizierung von für CED prädisponierten Patienten, zukünftig erforderlich.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Das komplexe Zusammenspiel zwischen der Darm-Mikrobiota und dem Immunsystem des Wirtes ist von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase. Bei einer Dysbalance dieses Mutualismus hingegen können kommensale Bakterien zur Entstehung von Immunpathologien beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurden die intestinalen Florenverschiebungen sowie molekularen Mechanismen der wechselseitigen Interaktionen zwischen der Mikrobiota und dem Wirt während intestinaler Immunpathologien in akuten Inflammationsmodellen unterschiedlicher Ätiologie und Lokalisation (*Toxoplasma gondii*-Ileitis, DSS-Kolitis) aufgeklärt. So war die Immunpathogenese mit markanten Veränderungen der luminalen Mikrobiota in entzündeten Abschnitten vergesellschaftet, die von einem Verlust an Diversität und einem Überwuchern des Darmlumens mit Gram-negativen Spezies, wie z. B. kommensalen *E. coli*, gekennzeichnet war. Bei der akuten DSS-Kolitis korrelierte die intestinale *E. coli*-Dichte gar mit der Schwere des Krankheitsbildes. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß insbesondere das Lipopolysaccharid von *E. coli* über TLR-4-abhängige Signalwege ursächlich an der Entzündungsentstehung und Aufrechterhaltung der Immunpathologie beteiligt war. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß nach Induktion einer akuten Ileitis oder Kolitis luminal Konzentrationen von biologisch aktiven TLR-2- (Lipopeptid-), TLR-4- (Lipopolysaccharid-) und/oder TLR-5- (Flagellin-) Liganden in Abhängigkeit von der jeweiligen Immunpathologie anstiegen. So konnten im Ileum von Mäusen mit akuter Ileitis stark erhöhte Konzentrationen von Lipopeptid-, Lipopolysaccharid- und Flagellin-Äquivalenten bestimmt werden. Im Kolon von Mäusen, die unter akuter DSS-Kolitis litten, waren hingegen die Konzentrationen der Äquivalente von Lipopeptid vergleichsweise moderat, die für LPS stark erhöht, während die Flagellin-Konzentrationen unverändert blieben. Diese Veränderungen der TLR-Liganden spiegeln die Anstiege potentiell pro-inflammatorisch wirksamer bakterieller Spezies der jeweiligen Darmmikrobiota bei definierten Entzündungskonditionen und somit in ihrer Komplexität Modell-spezifische Muster wider. Schließlich konnten wir zeigen, daß die Suszeptibilität von Mäusen gegenüber einer oralen *Campylobacter jejuni*-Infektion maßgeblich von der Zusammensetzung der Darmmikrobiota des Wirtes abhängig ist. Während konventionell besiedelten Mäuse vor einer *C. jejuni*-Infektion geschützt waren, konnte das Pathogen bei Mäusen, deren Darmmikrobiota durch eine Breitspektrum-Antibiotikabehandlung

depletiert und mit einer komplexen humanen Darmflora rekonstituiert worden war, stabil ansiedeln und pro-inflammatorische Immunantworten wie bei der humanen Campylobakteriose auslösen. Zudem war die Immunpathologie maßgeblich von der TLR-4- und -9-abhängigen Erkennung des bakteriellen Lipooligosaccharids und CpG-DNA abhängig. Zusammenfassend, konnten durch die vorliegenden Arbeiten wichtige Aspekte der molekularen Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen Darmmikrobiota und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in verschiedenen murinen Darmentzündungsmodellen beigesteuert werden. In Zukunft könnten gegen die Darmmikrobiota gerichtete Maßnahmen neue Strategien für die ergänzende oder alternative Behandlung und Prophylaxe von Darmentzündungen beim Menschen eröffnen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012;489(7415):231-41.
2. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 1992;50(12):438-46.
3. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124(4):837-48.
4. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134(2):577-94.
5. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 2013;341(6141):1237439.
6. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011;17(5):557-66.
7. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308(5728):1635-8.
8. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489(7415):220-30.
9. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(4):279-90.
10. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006;21(9):517-23.
11. Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, *et al.* Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013;339(6123):1084-8.
12. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;13(4):260-70.
13. De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5588-92.
14. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457(7228):480-4.
15. Gill SR, Pop M, Deboy RT, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312(5778):1355-9.
16. Molloy MJ, Grainger JR, Bouladoux N, *et al.* Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2013;14(3):318-28.
17. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9(5):313-23.

18. Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Finlay BB. Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. *Annu Rev Microbiol* 2014;68:217-35.
19. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108 Suppl 1:4578-85.
20. Stecher B, Chaffron S, Kappeli R, *et al.* Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog* 2010;6(1):e1000711.
21. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31(4):677-89.
22. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Imaoka A, Itoh K. Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun* 1999;67(7):3504-11.
23. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139(3):485-98.
24. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014;157(1):121-41.
25. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000;289(5484):1560-3.
26. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004;5(1):104-12.
27. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336(6086):1268-73.
28. Koboziev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med* 2014;68:122-33.
29. Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10(6):352-61.
30. Ivanov, II, Littman DR. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(1):106-14.
31. Meyer-Hoffert U, Hornef MW, Henriques-Normark B, Axelsson LG, Midtvedt T, Putsep K, Andersson M. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 2008;57(6):764-71.
32. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)* 2012;90(1):15-24.
33. Pamer EG. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol* 2007;8(11):1173-8.

34. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432(7019):917-21.
35. Sina C, Lipinski S, Gavrilova O, *et al.* Extracellular cathepsin K exerts antimicrobial activity and is protective against chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 2013;62(4):520-30.
36. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000;288(5474):2222-6.
37. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41.
38. Farache J, Koren I, Milo I, *et al.* Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* 2013;38(3):581-95.
39. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303(5664):1662-5.
40. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2(4):361-7.
41. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010;10(3):159-69.
42. Niess JH, Brand S, Gu X, *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307(5707):254-8.
43. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 2011;4(1):31-42.
44. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005;115(1):66-75.
45. Smythies LE, Shen R, Bimczok D, *et al.* Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation. *J Biol Chem* 2010;285(25):19593-604.
46. Shale M, Schiering C, Powrie F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2013;252(1):164-82.
47. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 2013;498(7452):113-7.
48. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, *et al.* Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 2012;336(6086):1321-5.

49. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, Diefenbach A. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46⁺ cells. *Nat Immunol* 2009;10(1):83-91.
50. Sanos SL, Diefenbach A. Innate lymphoid cells: from border protection to the initiation of inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 2013;91(3):215-24.
51. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14(3):282-9.
52. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 2011;241(1):260-8.
53. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:313-38.
54. Janeway CA, Jr., Goodnow CC, Medzhitov R. Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr Biol* 1996;6(5):519-22.
55. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-7.
56. Poltorak A, Smirnova I, He X, *et al.* Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24(3):340-55.
57. Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, *et al.* Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B. *J Biol Chem* 1999;274(19):12955-8.
58. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276(4):2551-4.
59. Lundin A, Bok CM, Aronsson L, *et al.* Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol* 2008;10(5):1093-103.
60. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000;164(2):966-72.
61. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167(3):1609-16.
62. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126(4):1054-70.
63. Singh JC, Cruickshank SM, Newton DJ, *et al.* Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(3):G514-24.

64. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, Menard S, Balsari A. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 2004;165(2):373-81.
65. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(52):20858-63.
66. Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, Cario E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology* 2009;137(1):209-20.
67. Bogunovic M, Dave SH, Tilstra JS, Chang DT, Harpaz N, Xiong H, Mayer LF, Plevy SE. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(6):G1770-83.
68. Palazzo M, Balsari A, Rossini A, *et al.* Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J Immunol* 2007;178(7):4296-303.
69. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):131-44.
70. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 2003;124(7):1866-78.
71. Walton KL, Holt L, Sartor RB. Lipopolysaccharide activates innate immune responses in murine intestinal myofibroblasts through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296(3):G601-11.
72. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, *et al.* Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 2001;167(5):2651-6.
73. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;129(1):50-65.
74. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, *et al.* Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006;7(8):868-74.
75. Tomita T, Kanai T, Fujii T, *et al.* MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. *J Immunol* 2008;180(8):5291-9.
76. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;166(1):249-55.
77. Yanagawa Y, Onoe K. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* 2007;178(10):6173-80.
78. Cerovic V, McDonald V, Nassar MA, Paulin SM, Macpherson GG, Milling SW. New insights into the roles of dendritic cells in intestinal immunity and tolerance. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009;272:33-105.

79. Cerovic V, Jenkins CD, Barnes AG, Milling SW, MacPherson GG, Klavinskis LS. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* 2009;182(4):2405-15.
80. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(9):1583-97.
81. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(23):20431-7.
82. Lee J, Mo JH, Katakura K, *et al.* Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8(12):1327-36.
83. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68(12):7010-7.
84. Kubinak JL, Round JL. Toll-like receptors promote mutually beneficial commensal-host interactions. *PLoS Pathog* 2012;8(7):e1002785.
85. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, *et al.* Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003;170(8):3977-85.
86. Siddique I, Khan I. Mechanism of regulation of Na-H exchanger in inflammatory bowel disease: role of TLR-4 signaling mechanism. *Dig Dis Sci* 2011;56(6):1656-62.
87. Meijssen MA, Brandwein SL, Reinecker HC, Bhan AK, Podolsky DK. Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 1):G472-9.
88. Brown M, Hughes KR, Moossavi S, Robins A, Mahida YR. Toll-like receptor expression in crypt epithelial cells, putative stem cells and intestinal myofibroblasts isolated from controls and patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2014; 178(1):28-39.
89. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 2003;71(6):3503-11.
90. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474(7351):298-306.
91. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.
92. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1720-28.
93. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14(5):329-42.

94. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 2013;145(2):293-308.
95. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474(7351):307-17.
96. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 2008;57(9):1185-91.
97. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1785-94.
98. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142(1):46-54 e42.
99. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003;9(5):218-22.
100. Sartor RB. Review article: How relevant to human inflammatory bowel disease are current animal models of intestinal inflammation? *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11 Suppl 3:89-96; discussion -7.
101. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 1999;11(6):648-56.
102. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549.
103. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev* 2012;240(1):269-85.
104. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G, Garg RR, Reuter BK, *et al.* SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2566-2584.
105. Olson TS, Bamias G, Naganuma M, *et al.* Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;114(3):389-98.
106. Strober W, Nakamura K, Kitani A. The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;107(6):667-70.
107. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Kozaiwa K, Cominelli F. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest* 2001;107(6):695-702.
108. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 1996;184(2):597-607.

109. Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(25):13955-60.
110. Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. J Immunol 2002;168(6):2988-96.
111. Vossenkamper A, Struck D, Alvarado-Esquivel C, et al. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. Eur J Immunol 2004;34(11):3197-207.
112. Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, et al. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. J Exp Med 2009;206(13):3047-59.
113. Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? J Infect Dis 2002;185 Suppl 1:S96-101.
114. Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Stepankova R, et al. Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci 2005;1051:787-98.
115. Lange S, Delbro DS, Jennische E, Mattsby-Baltzer I. The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. APMIS 1996;104(11):823-33.
116. Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. Gastroenterology 2000;118(6):1094-105.
117. Alter T, Bereswill S, Glunder G, Haag LM, Hanel I, et al. [Campylobacteriosis of man: livestock as reservoir for *Campylobacter* species]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2011;54:728-34.
118. Masanta WO, Heimesaat MM, Bereswill S, Tareen AM, Lugert R, et al. Modification of Intestinal Microbiota and Its Consequences for Innate Immune Response in the Pathogenesis of Campylobacteriosis. Clin Dev Immunol 2013;526860.
119. Dorrell N, Wren BW. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. Curr Opin Infect Dis 2007;20(5):514-8.
120. Kist M, Bereswill S. *Campylobacter jejuni*. Contrib Microbiol 2001;8:150-65.
121. Bamias G, Marini M, Moskaluk CA, Odashima M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Cominelli F. Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. J Immunol 2002;169(9):5308-14.
122. Erridge C, Duncan SH, Bereswill S, Heimesaat MM. The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5. PLoS One 2010;5(2):e9125.

123. Salazar Gonzalez RM, Shehata H, O'Connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Chougnet CA, Aliberti J. *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers human toll-like receptor 5-dependent cytokine production. *J Innate Immun* 2014;6(5):685-94.
124. Chassin C, Tourneur E, Bens M, Vandewalle A. A role for collecting duct epithelial cells in renal antibacterial defences. *Cell Microbiol* 2011;13(8):1107-13.
125. Arikawa K, Nishikawa Y. Interleukin-8 induction due to diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa/Dr genes depends on flagella and epithelial Toll-like receptor 5. *Microbiol Immunol* 2010;54(9):491-501.
126. Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, Akira S, Aderem A. Cutting edge: Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Immunol* 2007;178(8):4717-20.
127. Mathur R, Oh H, Zhang D, Park SG, Seo J, Koblansky A, Hayden MS, Ghosh S. A mouse model of *Salmonella typhi* infection. *Cell* 2012;151(3):590-602.
128. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, *et al.* Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2006;177(12):8785-95.
129. King LS. Dr. Koch's postulates. *J Hist Med Allied Sci* 1952;7(4):350-61.
130. Bereswill S, Munoz M, Fischer A, *et al.* Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One* 2010;5(12):e15099.
131. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46⁺ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008;29(6):958-70.
132. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118(2):534-44.
133. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29(6):947-57.
134. Craven M, Egan CE, Dowd SE, *et al.* Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease. *PLoS One* 2012;7(7):e41594.
135. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2393-404.
136. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011;60(5):631-7.
137. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, *et al.* Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One* 2007;2(7):e662.

138. Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, *et al.* Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 2011;61(8):1124-31.
139. Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, *et al.* Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 2007;117(12):3909-21.
140. Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, *et al.* MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* 2010;59(8):1079-87.
141. Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, *et al.* Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 2007;56(7):941-8.
142. Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. *Campylobacter jejuni* induces acute enterocolitis in gnotobiotic IL-10^{-/-} mice via Toll-like-receptor-2 and -4 signaling. *PLoS One* 2012;7(7):e40761.
143. Bereswill S, Fischer A, Plickert R, *et al.* Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the "Menage a Trois" of *Campylobacter jejuni*, Microbiota and Host Innate Immunity. *PLoS One* 2011;6(6):e20953.
144. Haag LM, Fischer A, Otto B, Grundmann U, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. *Campylobacter jejuni* infection of infant mice: acute enterocolitis is followed by asymptomatic intestinal and extra-intestinal immune responses. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012;2(1):2-11.
145. Heimesaat MM, Haag LM, Fischer A, Otto B, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S. Survey of extra-intestinal immune responses in asymptomatic long-term *Campylobacter jejuni*-infected mice. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2013;3(3):174-82.
146. Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal *Escherichia coli* loads abrogate colonization resistance against *Campylobacter jejuni* in mice. *PLoS One* 2012;7(5):e35988.
147. Bereswill S, Plickert R, Fischer A, *et al.* What you eat is what you get: Novel *Campylobacter* models in the quadrangle relationship between nutrition, obesity, microbiota and susceptibility to infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2011;1(3):237-48.
148. Otto B, Haag LM, Fischer A, Plickert R, Kuhl AA, Gobel UB, Heimesaat MM, Bereswill S. *Campylobacter jejuni* induces extra-intestinal immune responses via Toll-like-receptor-4 signaling in conventional IL-10 deficient mice with chronic colitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012;2(3):210-9.
149. Heimesaat MM, Fischer A, Plickert R, Wiedemann T, Loddenkemper C, Gobel UB, Bereswill S, Rieder G. *Helicobacter pylori* induced gastric immunopathology is associated with distinct microbiota changes in the large intestines of long-term infected Mongolian gerbils. *PLoS One* 2014;9(6):e100362.
150. Rausch S, Held J, Fischer A, Heimesaat MM, Kuhl AA, Bereswill S, Hartmann S. Small intestinal nematode infection of mice is associated with increased enterobacterial loads alongside the intestinal tract. *PLoS One* 2013;8(9):e74026.

151. Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, *et al.* *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 2003;125(1):162-77.
152. Bohn E, Bechtold O, Zahir N, Frick JS, Reimann J, Jilge B, Autenrieth IB. Host gene expression in the colon of gnotobiotic interleukin-2-deficient mice colonized with commensal colitogenic or noncolitogenic bacterial strains: common patterns and bacteria strain specific signatures. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(9):853-62.
153. Heimesaat MM, Dunay IR, Fuchs D, *et al.* The distinct roles of MMP-2 and MMP-9 in acute DSS colitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2011;1(4):302-10.
154. Terres G, Morrison SL, Habicht GS. A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;127(3):664-7.
155. Morell V. Zeroing in on how hormones affect the immune system. *Science* 1995;269(5225):773-5.
156. Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H, Halperin E, Iraqi FA, Gophna U. Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microb Ecol* 2011;61(2):423-8.
157. Deloris Alexander A, Orcutt RP, Henry JC, Baker J, Jr., Bissahoyo AC, Threadgill DW. Quantitative PCR assays for mouse enteric flora reveal strain-dependent differences in composition that are influenced by the microenvironment. *Mamm Genome* 2006;17(11):1093-104.
158. Ge Z, Feng Y, Taylor NS, Ohtani M, Polz MF, Schauer DB, Fox JG. Colonization dynamics of altered Schaedler flora is influenced by gender, aging, and *Helicobacter hepaticus* infection in the intestines of Swiss Webster mice. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(7):5100-3.
159. Bereswill S, Fischer A, Dunay IR, Kuhl AA, Gobel UB, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Pro-inflammatory potential of *Escherichia coli* strains K12 and Nissle 1917 in a murine model of acute ileitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2013;3(2):126-34.
160. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118(2):229-41.
161. Ungaro R, Fukata M, Hsu D, *et al.* A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296(6):G1167-79.
162. Vijay-Kumar M, Wu H, Aitken J, Kolachala VL, Neish AS, Sitaraman SV, Gewirtz AT. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(7):856-64.
163. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, *et al.* Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* 2008;180(12):8280-5.
164. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, *et al.* Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126(2):520-8.

165. Stevceva L, Pavli P, Buffinton G, Wozniak A, Doe WF. Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(1):54-60.
166. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, *et al.* Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(4):R1264-73.
167. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313(5790):1126-30.
168. Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, *et al.* Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol* 2006;169(5):1686-700.
169. Araki A, Kanai T, Ishikura T, *et al.* MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 2005;40(1):16-23.
170. Hotta T, Yoshida N, Yoshikawa T, Sugino S, Kondo M. Lipopolysaccharide-induced colitis in rabbits. *Res Exp Med (Berl)* 1986;186(1):61-9.
171. Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006;25(2):319-29.
172. Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(6):G1157-63.
173. Sanders CJ, Yu Y, Moore DA, 3rd, Williams IR, Gewirtz AT. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J Immunol* 2006;177(5):2810-8.
174. Obermeier F, Dunger N, Deml L, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W. CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. *Eur J Immunol* 2002;32(7):2084-92.
175. Martin HM, Rhodes JM. Bacteria and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13(5):503-9.
176. Masseret E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, Joly B, Cortot A, Darfeuille-Michaud A. Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* 2001;48(3):320-5.
177. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52(2):237-42.
178. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003;48(3):781-94.
179. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127(2):412-21.

180. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3380-9.
181. Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 1999;93(10):3267-75.
182. Tarpila E, Nystrom PO, Franzen L, Ihse I. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 1993;159(2):109-13.
183. Morencos FC, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995;40(6):1252-6.
184. Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* 2005;51 Suppl 1:1-22.
185. Mathis D, Benoist C. Microbiota and autoimmune disease: the hosted self. *Cell Host Microbe* 2011;10(4):297-301.
186. Manichanh C, Reeder J, Gibert P, *et al.* Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res* 2012;20(10):1411-9.
187. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(43):16731-6.
188. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341(6145):569-73.
189. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, *et al.* A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;139(6):1844-54 e1.
190. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(4):219-30.
191. Chassaing B, Rolhion N, de Vallee A, *et al.* Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest* 2011;121(3):966-75.
192. Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, McGuckin MA, Florin TH. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;105(11):2420-8.
193. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1998;12(1):53-6.
194. Hoentjen F, Harmsen HJ, Braat H, Torrice CD, Mann BA, Sartor RB, Dieleman LA. Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic

- activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* 2003;52(12):1721-7.
195. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(10):599-608.
 196. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55(2):205-11.
 197. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, *et al.* Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(6):872-82.
 198. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007;2(2):119-29.
 199. Asthana AK, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. Optimizing Conventional Medical Therapies in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Drug Targets* 2014. (Epub ahead of print).
 200. Amin J, Huang B, Yoon J, Shih DQ. Update 2014: Advances to Optimize 6-Mercaptopurine and Azathioprine to Reduce Toxicity and Improve Efficacy in the Management of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2014. (Epub ahead of print).
 201. Wine E. Should we be treating the bugs instead of cytokines and T cells? *Dig Dis* 2014;32(4):403-9.
 202. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353(23):2462-76.
 203. Mascheretti S, Hampe J, Kuhbacher T, Herfarth H, Krawczak M, Folsch UR, Schreiber S. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharmacogenomics J* 2002;2(2):127-36.
 204. Bank S, Andersen PS, Burisch J, *et al.* Associations between functional polymorphisms in the NFkappaB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J* 2014. (Epub ahead of print)
 205. Looijer-van Langen MA, Dieleman LA. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(3):454-62.
 206. Preidis GA, Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology* 2009;136(6):2015-31.
 207. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res* 2013;69(1):75-86.
 208. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain JP. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(4):684-95.

209. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut* 2011;60(7):923-9.
210. Smits LP, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 2013;145(5):946-53.
211. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958;44(5):854-9.
212. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, *et al.* Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368(5):407-15.
213. Colman RJ, Rubin DT. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* 2014. (Epub ahead of print).

Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Ulf B. Göbel bedanken. Seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe sowie eine konstruktive Fortsetzung meines wissenschaftlichen Werdegangs. Ohne diese Unterstützung und Integration wäre die Fortsetzung der wissenschaftlichen Arbeiten in dieser Unabhängigkeit undenkbar gewesen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Helmut Hahn, der mich nach meiner Post-Doc-Zeit in seinem Institut aufgenommen, die Begeisterung für die klinische Mikrobiologie geweckt und mir eine fundierte mikrobiologische Ausbildung ermöglicht hat.

Herrn Prof. Oliver Liesenfeld bin ich überaus dankbar, daß er mich anfangs in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mich mit seinem Enthusiasmus für immunologische, parasitologische und bakteriologische Fragestellungen in Mausmodellen angesteckt hat. Die gemeinsamen Projekte stellen die Grundlage für die vorliegende Habilitationsschrift dar.

Ausgesprochen dankbar bin ich Herrn Prof. Stefan Bereswill, meinem Ko-Arbeitsgruppenleiter und sehr guten Freund, für die jahrelangen gemeinsamen Planungen und Umsetzungen unserer Konzepte und die tiefen Einblicke in die molekulare Mikrobiologie.

Frau Dr. Ildikò R. Dunay danke ich sehr für ihre leidenschaftliche Motivation bei und konstruktiven Diskussionen während unserer gemeinsamen Zusammenarbeit im Institut und den folgenden Kooperationen.

Diese Arbeit wäre undenkbar gewesen ohne den unermühtlichen Einsatz exzellenter Kollegen. Ich danke hierbei insbesondere den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe sowie zahlreichen Kooperationspartnern.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mir über viele Jahre durch Unterstützung und Verständnis meinen wissenschaftlichen Weg ermöglichte.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift