

Aus der Klinik für Innere Medizin m.S. Hepatologie und
Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Modulation der intestinalen Barriere - Signalwege und
Wirkmechanismen von Escherichia coli Nissle 1917 und
enteraler Ernährung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Guzy

aus Sinsheim

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Sturm
2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Ockenga
3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Sigmund

Datum der Promotion: 24. April 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung	2
3	Methodik und Ergebnisse	3
3.1	In-vivo-Untersuchungen zum Einfluss von E. coli Nissle 1917 auf die intestinale Entzündung im murinen DSS-Modell	3
3.2	In-vitro-Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von E. coli Nissle 1917 auf humane $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen	4
3.3	In-vitro-Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von EN und PN auf intestinale Epithelzellen und humane mononukleäre Zellen der Lamina propria und des peripheren Blutes	6
4	Diskussion	8
	Abkürzungsverzeichnis	12
	Literaturverzeichnis	13
	Referenzen der Originalpublikationen	17
	Publikationsliste	18
	Erklärung zum Anteil der Doktorandin an den Publikationen	19
	Lebenslauf	20
	Erklärung über Selbstständigkeit	22
	Danksagung	23

1 Abstract

Einleitung: Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer Störung der intestinalen Barrierefunktion. Ihre Rekonstitution ist essentiell zur Wiederherstellung der mukosalen und peripheren Immunhomöostase. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Modulation der intestinalen Barriere durch das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 und enterale Ernährung zu charakterisieren.

Methode: Im experimentellen DSS-Kolitis Modell der Maus wurden Wildtyp sowie TLR-2^{-/-} und TLR-4^{-/-} Mäuse mit *E. coli* Nissle 1917 rektal oder oral behandelt. Die makroskopische Krankheitsaktivität, die Schädigung der Mukosa und die Zytokinsekretion der Mäuse wurden analysiert. Um den Einfluss des Probiotikums auf humane T-Zellsubklassen zu untersuchen, wurden isolierte $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen stimuliert und mit *E. coli* Nissle 1917 konditioniertem Medium kultiviert. Die Aktivität, Zellzyklusprogression, Apoptose, Nekrose und Zytokinsekretion der Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Der Einfluss von enteraler und parenteraler Ernährung auf die Integrität intestinaler Epithelzellen wurde anhand des transepithelialen Widerstands und eines etablierten Wundheilungsmodells bestimmt. Durchflusszytometrisch wurde zudem die Modulation der Apoptose, Zellaktivierung, Zellzyklusprogression und Zytokinsekretion isolierter und stimulierter peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) und Lamina propria mononukleärer Zellen (LPMC) untersucht.

Ergebnisse: TLR-4^{-/-} Mäuse entwickelten eine signifikant schwächere Entzündung. In Wildtyp Mäusen milderte *E. coli* Nissle die Entzündung und erhöhte die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine. In $\gamma\delta$ T-Zellen, aber nicht in $\alpha\beta$ T-Zellen, erhöhte *E. coli* konditioniertes Medium die Aktivität und Zellzyklusprogression und induzierte die Apoptose via TLR-2 über Caspase und FasL abhängige Signalwege. Durch die Inkubation mit enteraler und parenteraler Ernährung wurde die Integrität und Migration intestinaler Epithelzellen gefördert. Bei den Epithelzellen wurde die Apoptose durch parenterale Ernährung, bei den LPMC und PBMC durch enterale Ernährung induziert. Die Zytokinsekretion wurde bei den untersuchten Zellen sehr distinkt moduliert.

Diskussion: *E. coli* Nissle 1917 mildert die DSS-Kolitis über TLR-2 und TLR-4 abhängige Signalwege. In vitro induziert das Probiotikum die Apoptose von $\gamma\delta$ T-Zellen, die eine wichtige Rolle in der bakteriellen Antigenerkennung und Perturbation inflammatorischer Prozesse spielen. Enterale und parenterale Ernährung fördert die Integrität intestinaler Epithelzellen und moduliert distinkt das periphere und intestinale Immunsystem.

2 Einleitung

Der Darm zeichnet sich durch die größte epitheliale Oberfläche aus, über die sich der menschliche Organismus mit der Außenwelt auseinandersetzt. Dazu gehört zum einen die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Lumen und zum anderen die Abwehr von Toxinen und potentiell schädlicher Mikroorganismen [1]. Für diese wichtige Schutzfunktion verfügt der Darm über die intestinale Barriere, zu der die Darmflora, das Epithel mit der apikal aufgelagerten Mukusschicht und die darunter liegende Lamina propria gehört, die Teile des darmassoziierten Immunsystems beherbergt [2,3].

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) kommt es durch Ulzerationen und Läsionen in der Mukosa zu Störungen der intestinalen Barrierefunktion mit erhöhter Antigenpassage in der Lamina propria. Dies führt zu einer erhöhten bakteriellen Translokation und konsekutiv zu einer permanenten Aktivierung des mukosalen und peripheren Immunsystems [4]. Zu den Zielen der CED Behandlung zählt deshalb die Entzündungsreaktionen durch die Wiederherstellung der intestinalen Barriere und der Homöostase des intestinalen und peripheren Immunsystems zu limitieren.

Der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 (DSM 6601, Mutaflor, Ardeypharm) wurde in klinischen Studien in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa (CU) der Standardtherapie mit 5-Aminosalizylate (5-ASA) gleichgestellt [5]. In vorherigen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass *E. coli* Nissle Entzündungsreaktionen mildert, indem es Zellzyklus und Expansion peripherer T-Zellen inhibiert [6]. Welche Signalwege für den therapeutischen Effekt relevant sind, ist bislang jedoch unzureichend geklärt.

Um eine katabole Stoffwechsellage und Gewichtsverluste zu vermeiden, erhalten eine Vielzahl an CED Patienten zudem Ernährungstherapie in Form von enteraler (EN) oder parenteraler (PN) Ernährung [7,8]. Durch den Kontakt mit der Epithelschicht und intestinalen und peripheren Immunzellen gilt es, die Modulation der intestinalen Barriere durch EN und PN zu durchleuchten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher:

- die Wirkmechanismen und Signalwege von *E. coli* Nissle 1917 im murinen Kolitis-Modell der Maus zu untersuchen,
- die distinkte Modulation der T-Zellsubklassen durch *E. coli* Nissle zu charakterisieren,
- den Einfluss enteraler und parenteraler Ernährung auf die Funktion der intestinalen Barriere zu beschreiben.

3 Methodik und Ergebnisse

3.1 In-vivo-Untersuchungen zum Einfluss von E. coli Nissle 1917 auf die intestinale Entzündung im murinen DSS-Modell

Um die Wirkmechanismen des Probiotikums E. coli Nissle auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu untersuchen wurde das etablierte Modell der experimentellen Dextran Sulfat Natrium (DSS)-Kolitis gewählt. Durch die chemisch induzierte Kolitis konnten in Wildtyp (wt) sowie in TLR-2^{-/-} und TLR-4^{-/-} Mäusen die Effekte auf die intestinale Entzündung und relevante Signalwege auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Hierfür wurden die wt und knockout (ko) Mäuse jeweils in zwei Behandlungsgruppen eingeteilt und zweimal täglich mit 100µl E. coli Nissle (10⁸ KBE/ml) behandelt, das in der einen Gruppe rektal und in der anderen Gruppe oral appliziert wurde. Als Kontrollen wurden wt und ko Mäuse entweder rektal oder oral mit 100µl 0,9%iger NaCl Lösung behandelt. Nach 8 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und die makroskopische Krankheitsaktivität mit dem Rachmilewitz Disease Activity Index (DAI) bewertet, bei dem Gewichtsverlust und Gehalt an okkultem Blut im Stuhl anhand einer Punkteskala eingestuft wurden [9]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die durch DSS induzierte Kolitis bei den TLR-4^{-/-} Mäusen die geringsten Symptome verursachte. Zudem zeigte die rektale und orale Behandlung mit E. coli Nissle bei den wt Mäusen im Vergleich zur Kontrolle eine Verbesserung der Krankheitsaktivität mit signifikant niedrigerem DAI.

Für die histologische Untersuchung wurden 5cm des distalen Kolons entnommen und Formalin-fixierte Paraffinschnitte angefertigt. Durch die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H/E) konnte das Ausmaß des Mukosaschadens aufgezeigt werden. Symptome einer akuten Kolitis, wie Verlust der Kryptenstruktur, Zellnekrose und Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria, wurden bei den wt und TLR-2^{-/-} Mäusen in ähnlichem Ausmaß nachgewiesen, während bei den TLR-4^{-/-} Mäusen signifikant weniger Symptome festgestellt wurden. Die orale und rektale Verabreichung von E. coli Nissle limitierte die Mukosaschädigung nur bei den wt Mäusen, während bei den ko Mäusen keine Behandlungseffekte zu verzeichnen waren. Diese Ergebnisse wurden durch den Dieleman Score verifiziert, der relevante Parameter der Entzündung und das histologische Ausmaß der Kolitis anhand einer Punkteskala bewertet [10].

Des Weiteren wurde die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bestimmt, die Auskunft über die Infiltration neutrophiler Granulozyten und damit über die Schädigung des Gewebes gibt. Zur Bestimmung der MPO-Aktivität wurden mediales und distales Kolon der Mäuse in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurde das Gewebe dann homogenisiert und nach der Zentrifugation im Überstand die MPO-Aktivität mit Wasserstoffperoxid als Substrat gemessen. Die Kolitis induzierte MPO-Aktivität war bei den TLR-4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den wt und TLR-2^{-/-} Mäusen signifikant reduziert. Außerdem konnte durch die rektale Verabreichung von E. coli Nissle bei den wt Mäusen eine signifikant geringere MPO-Aktivität gemessen werden.

Aus dem peripheren Blut der Mäuse wurden durch negative magnetische Separation T-Lymphozyten isoliert und für 72h mit monoklonalen anti-CD3 Antikörpern (mAb) und CD28 stimuliert. Danach wurde der Überstand der Zellkultur abgenommen und die Zytokinsekretion der T-Zellen mittels Cytometric Bead Array (CBA) bestimmt. Im Vergleich zu wt Mäusen zeigte sich eine geringe Zytokinsekretion bei TLR-2^{-/-} Mäusen und nahezu keine Sekretion bei den TLR-4^{-/-} Mäusen. Die orale und rektale Behandlung mit E. coli Nissle führte bei den wt Mäusen zu einer signifikanten Inhibierung der proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), Interferon gamma (IFN- γ) und des Chemokins MCP-1. Bei den TLR-2^{-/-} Mäusen konnte eine selektive Reduktion der IFN- γ Sekretion festgestellt werden, während bei den TLR-4^{-/-} Mäusen keine Behandlungseffekte durch E. coli Nissle zu verzeichnen waren.

3.2 In-vitro-Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von E. coli Nissle 1917 auf humane $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

In der Pathophysiologie der CED kommt es durch gesteigerte Aktivierung der T-Zellen zur Initiierung und Perturbation der Entzündung [11]. Um weitere Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von E. coli Nissle auf die Funktion von T-Zellen auf zellulärer Ebene durchzuführen, wurde ein bakterienfreies und steril filtrierte konditioniertes Medium von E. coli Nissle (EcN-CM) hergestellt.

In vorherigen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass E. coli Nissle die Zellzyklusprogression und Expansion humaner T-Zellen inhibiert und auf diesem Wege Entzündungsreaktionen limitieren kann. Wir konnten auch zeigen, dass durch die Kultivierung mit EcN-CM der Anteil an T-Zellen mit einem $\gamma\delta$ Rezeptor im Blut zunimmt [6]. Um distinkte Effekte des Probiotikums auf die T-Zellsubklassen zu charakterisieren, wurden aus humanem Vollblut T-Zellen mit $\alpha\beta$ Rezeptor und $\gamma\delta$ Rezeptor negativ magnetisch isoliert. Zur Stimulierung wurden bei den $\alpha\beta$ T-Zellen anti-CD3 mAb und CD28 und bei den $\gamma\delta$ T-Zellen das Phosphoantigen Isopentylpyrophosphat (IPP) und IL-2 eingesetzt [12,13]. Nach 72stündiger

Inkubation mit 25% (vol/vol) EcN-CM wurde zum einen der Aktivierungsmarker CD25 und zum anderen der DNA-Gehalt durch die Färbung mit Propidium Iodide (PI) durchflusszytometrisch bestimmt. Bei den $\alpha\beta$ T-Zellen wurde so eine durch EcN-CM induzierte Inhibierung der Aktivität und der Zellzyklusprogression festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte bei den $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl ein signifikanter Anstieg der CD25 Expression als auch eine erhöhte Anzahl an Zellen in der S- und G2/M-Phase aufgezeigt werden.

Des Weiteren wurde zur Markierung proliferierender $\gamma\delta$ T-Zellen Bromdesoxyuridin (BrdU) in die Zellen eingebaut und durch die Formel von Begg und White [14,15] der Einfluss des Probiotikums auf die DNA Synthese Zeit und die relative Zeit, die die Zelle benötigt, um den Zellzyklus zu durchlaufen, berechnet. Beide Zeitparameter wurden durch die Anwesenheit von 25% (vol/vol) EcN-CM im Vergleich zur Kultur ohne EcN-CM signifikant verkürzt.

Da die Zytokinsekretion der $\gamma\delta$ T-Zellen durch den Aktivierungsstatus maßgeblich beeinflusst wird, wurde im nächsten Schritt der Zellkulturüberstand nach 72h Inkubation mit und ohne 25% (vol/vol) EcN-CM abgenommen. Die Analyse der Zytokinsekretion durch den CBA ergab einen signifikanten Anstieg des Chemokins CXCL8 und die Reduktion der TNF- α Sekretion.

Zur Untersuchung apoptotischer Signalwege wurden isolierte und stimulierte $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen mit oder ohne 25% (vol/vol) EcN-CM für 72h inkubiert. Durch die Färbung der Phosphatidylserine mit Annexin-V wurden die apoptotischen Zellen bestimmt. Nekrotische Zellen wurden durch PI markiert, das ausschließlich in Zellen mit durchlässiger Membran eindringen kann. Während bei den T-Zellen mit $\alpha\beta$ Rezeptor kein Einfluss von *E. coli* Nissle auf den Zelltod festgestellt werden konnte, zeigte sich bei den $\gamma\delta$ T-Zellen ein signifikanter Anstieg der Apoptose und Nekrose. Die Spezifität dieser Eigenschaft wurde mit einer vergleichenden Analyse eines probiotischen Kombinationspräparates und zweier pathogener *E. coli* Stämme, die keinen Zelltod induzierten, verifiziert. Um spezifische Phasen des Zelltodes aufzuzeigen, wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen nach 72h Inkubation mit Ethidium Bromide und Acridine Orange auf Objektträgern gefärbt. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab einen deutlichen Anstieg an rot gefärbten, spätapoptotischen Zellen mit kondensiertem Chromatin in der Kultur mit 25% (vol/vol) EcN-CM [16].

Um die Rolle der TLR im apoptotischen Signalweg zu bestimmen, wurden die $\gamma\delta$ T-Zell-Kulturen mit blockierenden anti-TLR-2 und anti-TLR-4 Antikörpern versetzt und die Anzahl der apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. So konnte festgestellt werden, dass durch die Blockierung des Rezeptors die durch *E. coli* Nissle ausgelöste Apoptose inhibiert wurde.

Da Caspasen wichtige Initiatoren und Regulatoren apoptotischer Signalwege sind [17], wurde in einer weiteren Untersuchung die Zellkultur mit Caspase Inhibitoren versetzt und nach 72h die Anzahl an apoptotischen Zellen mit Annexin-V bestimmt. Dabei ergab sich vor allem eine signifikante Inhibierung der Apoptose durch Caspase-8-Inhibitor und dem Breitband-Caspase-Inhibitor zVAD. Des Weiteren wurde die Rolle der Oberflächenrezeptoren für die Initiierung der zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht. Die durchflusszytometrische Quantifizierung der TNF-Rezeptoren 1 und 2 sowie Fas und des Liganden FasL ergab einen signifikanten Anstieg des TNF-R1 und FasL durch EcN-CM, während die Expression des TNF-R2 herunterreguliert wurde. Das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) wurde zudem durch die Färbung mit Rhodamine123 festgestellt und zeigte die Involvierung des mitochondrialen apoptotischen Signalweges.

3.3 In-vitro-Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von EN und PN auf intestinale Epithelzellen und humane mononukleäre Zellen der Lamina propria und des peripheren Blutes

Der Einfluss von EN, PN und einer parenteralen Aminosäurenmischung (AM) auf die Barrierefunktion des intestinalen Epithels wurde zum einen durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) ermittelt. Hierfür wurden Caco-2 Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, mit 1% EN, AM oder PN inkubiert und der TER täglich mit einem Voltohmmeter gemessen. So konnte festgestellt werden, dass alle drei nutritiven Substanzen durch einen Anstieg des TER die Integrität der Epithelzellen fördern. Zum anderen modulieren EN, AM und PN die Wundheilung intestinaler Epithelzellen, indem sie in einem etablierten Migrationsmodell [18] mit einem konfluenten IEC-6 Monolayer die Anzahl der migrierten Zellen über den Wundschnitt erhöhen.

Neben der Migration gehört auch die Zellteilung zum Prozess der Wundheilung. Deshalb wurde bei den intestinalen Epithelzelllinien Caco-2 und HT29 nach 48stündiger Inkubation mit 1 und 5% EN, AM und PN durch die Färbung mit PI der DNA-Gehalt der Zellen untersucht. Weder EN, AM noch PN konnten die Zellzyklusprogression der Zellen modulieren. Bei der Quantifizierung toter Epithelzellen wurde durch die Färbung mit Annexin-V und PI gezeigt, dass durch die Inkubation mit 1 und 5% EN, AM oder PN die Anzahl der nekrotischen HT29-Zellen durch PN signifikant zunimmt. Auch das Absinken des MMP von Caco-2 Zellen beweist die distinkte Induktion des Zelltodes durch PN.

Um den Einfluss der Ernährungsubstitution auf intestinale und systemische Entzündungsreaktionen zu untersuchen, wurden zum einen PBMC aus dem Blut gesunder Spender und zum anderen LPMC aus der Mukosa chirurgischer Darmresektate isoliert. Die Zellen wurden mit anti-CD3 mAb oder anti-CD2 mAb stimuliert und für 48h mit 1 und 5% EN, AM und PN inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus ergab bei den PBMC eine dosisabhängige Reduktion der CD25 Expression durch EN und AM und durch EN, AM und PN bei den LPMC. Anschließend wurde durch die Messung des DNA-Gehaltes mit PI festgestellt, dass die Anzahl der PBMC in der S- und G2/M Phase durch alle drei Substanzen dosisabhängig verringert wurde, während bei den LPMC lediglich EN die Zellzyklusprogression verringerte.

Bei der durchflusszytometrischen Zytokinanalyse mittels CBA stellte sich heraus, dass die nutritiven Substanzen die Zytokinsekretion der PBMC und LPMC unterschiedlich beeinflussen. Die Inkubation der PBMC mit EN führte zur einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und Interleukin (IL) 6 und zur Reduktion des antiinflammatorischen IL-10. PN dagegen reduzierte die Sekretion des IL-10. Im Gegensatz dazu wurde bei den LPMC die Sekretion des TNF- α durch EN, AM und PN herunterreguliert. Außerdem wurde die IL-10-Sekretion durch EN und PN reduziert.

Die Anzahl an apoptotischen Zellen wurde durch die Färbung mit Annexin-V durchflusszytometrisch bestimmt und es zeigte sich, dass EN die Apoptose sowohl bei PBMC als auch bei den LPMC induziert.

Durch ein Kokultursystem mit einem zusätzlichen Zellkultureinsatz konnte zudem gezeigt werden, dass der direkte Kontakt für die evaluierten Effekte unabdinglich ist. Denn durch die Inkubation eines konfluenten Epithels mit EN, AM oder PN und stimulierten PBMC im basalen Kompartiment konnte die Färbung mit CD25, Annexin-V und PI keine Modulation der PBMC aufzeigen.

4 Diskussion

Die intestinalen Epithelzellen mit der apikal aufgelagerten Mukusschicht sind nicht nur verantwortlich für die Nährstoffaufnahme aus dem Lumen, sondern bilden auch eine wichtige strukturelle und funktionelle Barriere gegenüber luminalen Antigenen und Noxen. Zudem enthält der Gastrointestinaltrakt eine der größten Lymphozytenpopulationen des Körpers, die vor allem in der Lamina propria angesiedelt sind [1]. Diese intestinale Barriere ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch rezidivierende Ulzerationen und Läsionen des Mukosaepithels gestört. Durch die unkontrollierte Aufnahme von luminalen Antigenen werden entzündliche Prozesse durch die permanente Aktivierung des intestinalen Immunsystems verstärkt [3,19]. Für die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist deshalb die Wiederherstellung der intestinalen Barrierefunktion von großer Bedeutung. Dazu gehört neben der Integrität des Mukosaepithels auch die Kontrolle der Immunhomöostase. Da diese Krankheit die Patienten ihr Leben lang begleitet und spezifische Therapien oft nicht ansprechen oder Unverträglichkeiten hervorrufen, rücken auch natürliche Medikationen in den Vordergrund [20]. Probiotika sind definierte, lebende Mikroorganismen, die positive Effekte auf die Gesundheit des Wirtes ausüben, indem sie die intestinale Mikroflora beeinflussen [21]. Das probiotische Bakterium *E. coli* Nissle 1917 (DSM 6601, Mutaflor, Ardeypharm) wird seit einigen Jahren vor allem in der Behandlung der CU und der Pouchitits erfolgreich eingesetzt [5,22,23]. Dieser apathogene *E. coli* Stamm ist einer der am besten beschriebenen Keime und wurde sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene genau analysiert und besitzt ein exzellentes Sicherheitsprofil [24,25]. Seine Wirkmechanismen und relevanten Signalwege sind bislang jedoch unzureichend geklärt.

Die Modulation der intestinalen Barriere durch *E. coli* Nissle wurde zunächst im DSS-Kolitis-Modell der Maus untersucht. Die histologische Bewertung und die Bestimmung des Dieleman Score zeigte, dass die TLR-4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den wt Mäusen weniger Symptome einer akuten Kolitis aufwiesen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des TLR-4, der für die Entwicklung der Mukosaschädigung notwendig ist [26]. TLRs werden auf Epithelzellen und PBMC exprimiert und spielen als Mitglieder der pathogen-associated molecular pattern (Pamp)-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Erkennung bakterieller Antigene [27]. Im Fall der DSS-Kolitis werden TLRs in erhöhtem Ausmaß exprimiert, und es konnten bei CED Patienten Polymorphismen des TLR-4 festgestellt werden [28,29].

Durch die orale und rektale Applikation des Probiotikums zeigte sich eine Verbesserung der Krankheitsaktivität (DAI) und der Mukosaschädigung bei den wt Mäusen. Im Gegensatz dazu

wurde bei den ko-Mäusen nicht die entsprechende Besserung der Krankheitsaktivität und der histologischen Schädigungen beobachtet. Die Wirkmechanismen von *E. coli* Nissle werden also über TLR-2 und TLR-4 abhängige Signalwege vermittelt.

T-Lymphozyten spielen in der mukosalen und peripheren Entzündungsreaktion der CED durch eine gesteigerte Expansion und Aktivität eine zentrale Rolle [11]. Im murinen DSS-Modell führte die Behandlung mit *E. coli* Nissle zu einer Modulation der Zytokinsekretion der untersuchten T-Zellen und verknüpft damit die angeborene mit der erworbenen Immunität. Neben der verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wurde vor allem die Inhibierung von IFN- γ und TNF- α festgestellt, die für die Induktion der T-Helferzell-Antwort Th1 [30] verantwortlich sind. Da *E. coli* Nissle die Zytokinsekretion der ko Mäuse nicht modulierte, zeigt sich die Notwendigkeit der TLRs für die Induktion der TH1 Antwort.

Der Einfluss auf humane T-Zellen wurde in vorherigen Studien unsere Arbeitsgruppe bereits untersucht. Es zeigte sich, dass *E. coli* Nissle das erworbene Immunsystem moduliert, indem es den Zellzyklus und die Expansion der T-Zellen über TLR-2 abhängige Mechanismen inhibiert. [6]. Während die Mehrzahl der T-Zellen einen $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor exprimiert, tragen 2-10% einen $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor. Diese $\gamma\delta$ T-Zellen spielen in der Erkennung bakterieller Antigenen eine zentrale Rolle, da sie nicht nur Toll-like-Rezeptoren exprimieren, sondern auch bakterielle Nicht-Peptid-Antigene mit ihrem $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor ohne vorherige Antigenprozessierung erkennen [12]. Durch ihre charakteristischen Eigenschaften verknüpfen sie die angeborene mit der erworbenen Immunität und initiieren als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) die Aktivierung von $\alpha\beta$ T-Zellen [31,32].

CED Patienten haben eine erhöhte Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut [33,34]. Deshalb wurde in weiteren Untersuchungen durch die Isolation der beiden T-Zellsubklassen die distinkte Modulation durch *E. coli* Nissle in den Vordergrund gestellt. Dies zeigte sich zunächst durch die spezifischen Ergebnisse der CD25 Expression und der Untersuchung der Zellzyklusphasen: Während die Aktivität und die Zellzyklusprogression der $\alpha\beta$ T-Zellen durch *E. coli* Nissle inhibiert wurde, kam es bei den $\gamma\delta$ T-Zellen zu einem Anstieg aktivierter und proliferierender Zellen. Ein probiotisches Kombinationspräparat und zwei pathogene *E. coli* Stämme zeigten bei der durchflusszytometrischen Analyse keine Effekte, was die Spezifität des *E. coli* Nissle unterstreicht. Dieses Ergebnis entspricht Studien anderer Arbeitsgruppen, die die Unwirksamkeit von *Lactobacillus johnsonii* LA1 und *Lactobacillus* GG im Remissionserhalt von Morbus Crohn feststellten, während die Effizienz von *E. coli* Nissle aber mit der Standardtherapie Mesalazin gleichgesetzt werden konnte. [5,35,36].

Weitere positive Effekte von *E. coli* Nissle auf die intestinale Barriere zeigten sich durch die gesteigerte Sekretion des Chemokins CXCL8, das die Migration von intestinalen Epithelzellen *in vitro* fördert [37]. TNF- α dagegen, das in Serum und Mukosa der CED Patienten erhöht ist und eine wichtige Rolle in der Perturbation der Entzündung spielt, wurde in unserer Studie durch die Inkubation mit *E. coli* Nissle herunterreguliert [38].

Die Induktion der Apoptose entzündlicher Zellen stellt neben der Inhibierung der Aktivität und der Zellzyklusprogression einen zentralen Ansatz in der Therapie der CED dar. *E. coli* Nissle, aber nicht die untersuchten Kontrollbakterien, induzierten die Apoptose der $\gamma\delta$ T-Zellen, während die $\alpha\beta$ T-Zellen nicht beeinflusst wurden. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass *E. coli* Nissle den Zelltod über den extrinsischen Signalweg einleitet, bei dem die Apoptose durch die Bindung an membranständige Todesrezeptoren wie Fas oder TNF-Rezeptor 1 ausgelöst wird. Diese Tatsache wurde verifiziert, da die durch *E. coli* Nissle induzierte Apoptose im Inneren der Zelle durch die Caspase 8 weiter vorangetrieben wurde und schließlich entsprechend dem Typ 2 Signalweg über die gesteigerte Expression von BID zur Senkung des MMP führte.

Zur Vermeidung von Mangelerscheinungen und einer katabolen Stoffwechsellage stellen bei CED Patienten ernährungsmedizinische Maßnahmen einen Teil des Therapiekonzeptes dar. Neben dem Ausgleich von Mangelsituationen und der reduzierten Zufuhr an Nahrungsmittelantigenen kann die Verabreichung parenteraler oder enteraler Ernährung auch primärtherapeutische Bedeutung durch die Wiederherstellung der intestinalen Immunhomöostase haben [39,40,41]. Da die intestinale Barriere und das mukosale Immunsystem bei CED Patienten beeinträchtigt ist, sollte der Einfluss der Ernährungssubstitution auf involvierte Zellen wie den intestinalen Epithelzellen, den PBMC und LPMC geklärt werden. Bislang gibt es Hinweise, dass die Verabreichung von EN die Heilung mukosaler Schäden fördert und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine inhibiert, wohingegen PN den Zelltod intestinaler Epithelzellen fördert und die Kryptenstruktur schädigt [40,42]. Durch die Untersuchung des TER konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl durch EN als auch durch PN die Integrität der Epithelzellen und damit die Barrierefunktion gefördert wurde. Im Wundheilungsmodell steigerte sowohl EN als auch PN zudem die Migration der IEC-6 Zellen über den Wundschnitt. Obwohl PN bei der üblichen Anwendung nicht mit intestinalen Epithelzellen in Kontakt kommt, konnte so bei beiden Substanzen trotz unterschiedlicher Verabreichung eine Förderung der Integrität intestinaler Epithelzellen festgestellt werden. Obwohl die Proliferation der Zellen zum Prozess der Wundheilung gehört, konnte eine Förderung der Zellteilung weder durch PN noch durch EN beobachtet werden, was die Notwendigkeit der Untersuchung einzelner Schritte im

Wundheilungsprozess betont. Die Induktion der Apoptose durch PN konnte durch die Quantifizierung der apoptotischen Epithelzellen nach der Inkubation mit PN in der Zellkultur bestätigt werden. Dagegen konnte durch die Kultivierung mit EN die Integrität der Zellen in diesem Versuch erneut gezeigt werden. Hierfür könnte der Ballaststoffgehalt des Präparates verantwortlich sein, der bereits bei in vivo Studien der durch PN induzierten bakteriellen Translokation entgegenwirkte [40].

Da CED zudem durch eine gestörte Immunhomöostase gekennzeichnet sind, wurde der Einfluss von EN und PN auf LPMC und PBMC untersucht. Der Kontakt der PBMC zu EN (nur möglich bei gestörter Barrierefunktion in vivo) induzierte eine Abnahme der aktivierten PBMC und eine Induktion der Apoptose, was die Entzündungsreaktion bei CED positiv beeinflussen könnte. Die Zellproliferation wurde sowohl durch EN als auch durch PN inhibiert. Bei den LPMC zeigte sich eine verringerte Anzahl an aktivierten Zellen durch den Kontakt mit EN und PN. Alleinig EN löste bei den LPMC die Apoptose aus und inhibierte die Proliferation der Zellen. EN und PN modulieren distinkt die intestinale Barriere durch ihren Einfluss auf die Funktion intestinaler Epithelzellen, PBMC und LPMC. Es zeigte sich vor allem bei der Untersuchung der intestinalen und peripheren Immunzellen spezifische antiinflammatorische Eigenschaften, wodurch die protektiven Effekte auf die epitheliale Barrierefunktion gestützt und mögliche Wirkmechanismen aufgezeigt werden konnten.

Zusammengefasst konnten die durchgeführten Experimente weitere Einblicke in die Wirkmechanismen und Signalwege des für die Therapie der CED eingesetzten Probiotikums *E. coli* Nissle 1917 und der enteralen und parenteralen Ernährung geben.

Im murinen Kollitismodell konnte die Entzündungsreaktion durch *E. coli* Nissle 1917 über Toll-like-Rezeptoren gelindert werden. Da bei der Entstehung der CED eine unkontrollierte Immunreaktion gegenüber der eigenen Darmflora eine wichtige Rolle spielt [43], zeigte die durch *E. coli* Nissle induzierte Apoptose der $\gamma\delta$ T-Zellen einen bedeutenden Wirkmechanismus des Probiotikums auf. Zudem konnte durch die distinkte Modulation peripherer und intestinaler Immunzellen und die Förderung der Integrität intestinaler Epithelzellen durch EN und PN die Restriktion entzündlicher Prozesse und die Förderung der intestinalen Barriere untermauert werden. Der primärtherapeutische Einsatz von *E. coli* Nissle zusammen mit enteraler oder parenteraler Ernährung sollte in weiteren Experimenten in der entsprechenden Kombination untersucht werden und mit der Standardtherapie Mesalazine verglichen werden. Dargestellte in vitro und in vivo Untersuchungen konnten durch die spezifische Modulation einzelner Parameter einen umfassenden Ansatz zur Induktion und zum Erhalt der Remission bei CED aufzeigen.

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen presenting cell
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
BrdU	bromodeoxyuridine
CBA	cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
CXCL8	Interleukin 8
DAI	disease activity index
DNA	desoxyribonucleic acid
DSS	Dextran Sulfat Sodium
EcN-CM	E. coli Nissle conditioned medium
E. coli	Escherichia coli
FasL	FasLigand
h	hour
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IPP	isopentyl pyrophosphate
KBE	Koloniebildende Einheiten
ko	knock out
LPMC	lamina propria mononuclear cells
mAb	monoclonal antibody
MMP	mitochondriales Membranpotential
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
Pamp	pathogen associated molecular patterns
PI	Propidium iodide
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
TER	transepithelial electrical resistance
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TNF-R1	tumor necrosis factor-receptor 1
TNF-R2	tumor necrosis factor-receptor 2
wt	wildtyp

Literaturverzeichnis

1. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41
2. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 2007;87(2):545-64
3. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5(6):685-94
4. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(4):379-83
5. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53(11):1617-23
6. Sturm A, Rilling K, Baumgart DC et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun* 2005;73(3):1452-65
7. Goh J, O'Morain CA. Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(3):307-20
8. Dray X, Marteau P. The use of enteral nutrition in the management of Crohn's disease in adults. *JPEN* 2005;29(4):166-9
9. 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
10. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114(3):385-91.
11. Sturm A, Leite AZ, Danese S et al. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53(11):1624-31
12. Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T cells. *Science* 2005;309(5732):264-8
13. Holtmeier W, Kabelitz D. $\gamma\delta$ T cells link innate and adaptive immune response. *Chem Immunol Allergy* 2005;86:151-83

14. Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC et al. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 1985;6(6):620
15. White RA, Meistrich ML, Pollack A et al. Simultaneous estimation of T(G2+M), T(S), and T(pot) using single sample dynamic tumor data from bivariate DNA-thymidine analogue cytometry. *Cytometry* 2000;41(1):1-8
16. Baskic D, Popovic S, Ristic P et al. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int* 2006;30(11):924-32
17. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115(10):2665-72
18. Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 1993;105(5):1323-32
19. McCole DF, Barrett KE. Varied role of the gut epithelium in mucosal homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(6): 647-54
20. Bengmark S. Bioecological control of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 2007;26(2):169-81
21. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2):361-4
22. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119(2):305-9
23. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354(9179):635-9
24. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 2004;186(16):5432-41
25. Sun J, Gunzer F, Westendorf AM et al. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol* 2005;117(2):147-61
26. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(6):567-75

27. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptors control the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987-95
28. 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
29. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptor: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):103-10
30. Schnare M, Barton GM, Holt K et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2:947-50
31. Kabelitz D. Effector functions and control of human gammadelta T-cell activation. *Microbes Infect* 1999;1(3):255-61
32. Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006;18(1):31-8
33. Söderström K, Bucht A, Halapi E et al. Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J Immunol* 1996;156(6):2331-9
34. Giacomelli R, Parzanese I, Frieri G. Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1994;98(1):83-8
35. Marteau P, Lémann M, Seksik P et al. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006;55(6):842-7
36. Prantera C, Scribano ML, Falasco G et al: Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002;51(3):405-9
37. Sturm A, Baumgart DC, d'Hereuse JH et al: CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. *Cytokine* 2005;29(1):42-8
38. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999;353(9151):459-61
39. Sun X, Spencer AU, Yang H et al. Impact of caloric intake on parenteral nutrition-associated intestinal morphology and mucosal barrier function. *JPEN* 2006;30(6):474-9
40. Wildhaber BE, Yang H, Spencer AU et al. Lack of enteral nutrition-effects on the intestinal immune system. *J Surg Res* 2005;123(1):8-16

41. Bengmark S. Ecnutrition and health maintenance-a new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. *Clin Nutr* 1996;15(1):1-10
42. Minard G, Kudsk KA. Nutritional support and infection: does the route matter? *World J Surg* 1998;22(2):213-9
43. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. 1998;115(1):182-205

Referenzen der Originalpublikationen

1. Guzy C, Schirbel A, Paclik D, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A.

Enteral and parenteral nutrition distinctively modulate intestinal permeability and T cell function in-vitro

Eur J Nutr. 2009;48(1):12-21.

2. Guzy C, Paclik D, Schirbel A, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Sturm A.

The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 induces gammadelta T cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways.

Int Immunol. 2008;20(7):829-40.

3. Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A.

Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways.

Infect Immun. 2006;74(7):4075-82.

Publikationsliste

Eingereicht zur Publikationspromotion:

1.
Guzy C, Schirbel A, Paalik D, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A.
Enteral and parenteral nutrition distinctively modulate intestinal permeability and T cell function in-vitro
Eur J Nutr. 2009;48(1):12-21.

2.
Guzy C, Paalik D, Schirbel A, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Sturm A.
The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 induces gammadelta T cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways.
Int Immunol. 2008;20(7):829-40.

3.
Grabig A, Paalik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A.
Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways.
Infect Immun. 2006;74(7):4075-82.

Weitere Publikationen:

4.
Paalik D, Berndt U, Guzy C, Dankof A, Danese S, Holzloehner P, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wittig BM, Dignass AU, Sturm A.
Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice.
J Mol Med. 2007;86(12):1395-1406.

5.
Guzy C, Sturm A.
Probiotika bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Darstellung möglicher Wirkmechanismen.
Verdauungskrankheiten 2008;26(4):198-204.

Erklärung zum Anteil der Doktorandin an den Publikationen

Publikation 1:Guzy C, Schirbel A, Paclik D, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A.

Enteral and parenteral nutrition distinctively modulate intestinal permeability and T cell function in-vitro

Eur J Nutr. 2009;48(1):12-21

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Durchführung aller Experimente, teilweise mit technischer Unterstützung von A. Schirbel oder D. Paclik
- Statistische Auswertung der Versuche und grafische Darstellung
- Verfassen des Manuskripts mit Unterstützung/Korrektur von PD Dr. A. Sturm

Publikation 2:Guzy C, Paclik D, Schirbel A, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Sturm A.

The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 induces gammadelta T cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways.

Int Immunol. 2008;20(7):829-40. Epub 2008 Apr 30

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Durchführung aller Experimente, teilweise mit technischer Unterstützung von A. Schirbel oder D. Paclik
- Statistische Auswertung der Versuche und grafische Darstellung
- Verfassen des Manuskripts mit Unterstützung/Korrektur von PD Dr. A. Sturm

Publikation 3:Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A.

Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways.

Infect Immun. 2006;74(7):4075-82.

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der tierexperimentellen Versuche in Zusammenarbeit mit A. Schirbel und D. Paclik
- Betreuung der Tiere entsprechend des Behandlungsplans
- Bearbeitung der murinen Proben, Durchführung des cytometric bead array (CBA)

Datum, Unterschrift und Stempel
PD Dr. Andreas Sturm
Betreuer

Datum, Unterschrift
Claudia Guzy
Doktorandin

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen enthält diese elektronische Version der Dissertation keinen Lebenslauf.

Erklärung über Selbstständigkeit

„Ich, Claudia Guzy, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Modulation der intestinalen Barriere – Signalwege und Wirkmechanismen von Escherichia coli Nissle 1917 und enteraler Ernährung“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich bei PD Dr. Andreas Sturm für die Möglichkeit, dass die Untersuchungen in seiner Arbeitsgruppe „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Ernährung und Kurzdarm“ durchgeführt werden konnten. Mit großem Interesse und vielen wertvollen Anregungen hat er die Forschungsprojekte bei jeder Gelegenheit unterstützt.

Daniela Paclik, Dr. Uta Berndt und Dr. Anja Schirbel danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente. Sie haben mich bei auftretenden Schwierigkeiten immer unterstützt und wir haben zahlreiche Diskussionen geführt, die für diese Arbeit sehr hilfreich und motivierend waren.

Der wichtigste Dank geht an meine Eltern, ohne sie wäre die universitäre Ausbildung nicht möglich gewesen. Auch meinem Liebsten Christian möchte ich ganz herzlich für die Geduld und Unterstützung während dieser Zeit danken.