

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

DISSERTATION

Die Rolle der kommensalen Darmflora und der  
Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei  
der *Campylobacter jejuni*-Enteritis im Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lea-Maxie Haag  
aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. St. Bereswill

2. Prof. Dr. med. J. Buer

3. Prof. Dr. med. B. Siegmund

Datum der Promotion: 23.06.2013

Meinen Eltern

Gudrun und Karl Haag

**Inhalt**

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1. Einleitung .....	2
1.1 <i>Campylobacter jejuni</i> -Enteritis beim Menschen.....	2
1.1.1 Epidemiologie .....	2
1.1.2 Übertragungswege.....	2
1.1.3 Das klinische Bild der <i>Campylobacter</i> -Enteritis.....	4
1.1.4 <i>Campylobacter jejuni</i> - Charakterisierung des Erregers .....	5
1.2 Die kommensale Darmflora .....	6
1.2.1 Die Darmflora – Zusammensetzung und Funktionen .....	6
1.2.2 Die Darmflora – Interaktionen mit dem Immunsystem .....	8
1.3 Zielsetzung .....	10
2. Material und Methoden .....	11
2.1 Material .....	11
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	11
2.1.2 Kommerzielle „Kits“.....	12
2.1.3 Oligonukleotidprimer und -sonden .....	12
2.1.4 DNA-Längenmarker, Enzyme .....	13
2.1.5 Antikörper .....	13
2.1.6 Nährmedien und Seren .....	14
2.1.7 Geräte und Plastikwaren.....	14
2.1.8 Sonstiges.....	15
2.2 Versuchstiere und Haltung .....	15
2.2.1 Versuchstiere .....	15
2.2.2 Haltung unter SPF-Bedingungen .....	16
2.2.3 Haltung unter sterilen Bedingungen.....	16
2.3 Klinische Beurteilung der Tiere .....	17
2.4 Tierversuche .....	18
2.4.1 Infektion mit <i>C. jejuni</i> .....	18
2.4.2 Infektion mit <i>E. coli</i> .....	19
2.4.2.1 Gavage.....	19
2.4.2.2 <i>E. coli</i> im Trinkwasser .....	19
2.4.3 Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	20

2.4.4 Aufbereitung humaner Faecesproben zur Herstellung mit humaner Flora assoziierter Tiere .....	21
2.4.5 Aufbereitung muriner Faecesproben zur Herstellung mit muriner Flora assoziierter Tiere .....	21
2.4.6 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse .....	22
2.4.6.1 Rekolonisierung und Infektion gnotobiotischer Mäuse .....	22
2.4.7 Probenentnahme .....	22
2.5 Kulturelle Analysen der Gastrointestinalflora.....	23
2.5.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes.....	23
2.5.2 Analyse der Darmflora .....	24
2.5.3 Analyse aerob wachsender Bakterienspezies .....	25
2.5.4 Analyse obligat anaerob wachsender Bakterienspezies .....	26
2.5.5 Gramfärbung .....	27
2.5.6 Katalase- und Oxidasetest zur mikrobiologischen Differenzierung .....	27
2.5.7 Bakterielle Speziesdiagnostik .....	28
2.5.8 Biochemische Leistungsprüfung zur Speziesdiagnostik .....	28
2.5.9 Kultureller Nachweis von <i>C. jejuni</i> .....	28
2.5.10 Kultureller Nachweis von <i>E. coli</i> .....	29
2.5.11 Bestimmung bakterieller Translokationsraten .....	29
2.6 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes.....	30
2.6.1 Herstellung histologischer Präparate.....	30
2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	30
2.6.3 Auswertung der histologischen Präparate .....	30
2.6.4 Herstellung und Beurteilung immunhistochemischer Schnitte.....	31
2.7 Zytokin- und Proteinmessungen.....	32
2.7.1 Zytokinbestimmung aus Organkulturüberständen des Colons.....	32
2.7.2 Cytometric Bead Array (CBA) .....	32
2.7.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	32
2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.7.5 Bestimmung der Konzentration von Stickstoffmonooxid.....	33
2.8 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.8.1 RNA-Extraktion aus Colongewebe .....	33
2.8.2 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA-Bestimmung .....	34
2.8.3 DNA-Extraktion aus Mausgewebe.....	35

2.8.4 Genotypisierung der Mäuse .....	35
2.9 Statistische Analysen, Software .....	36
3. Ergebnisse .....	37
3.1 Die Rolle der bakteriellen Darmflora bei der <i>C. jejuni</i> -Enteritis im Mausmodell.....	37
3.1.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei Wildtypmäusen mit konventioneller Flora .....	37
3.1.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren	38
3.1.2.1 Langzeit-Kinetik der <i>C. jejuni</i> -Last bei gnotobiotischen C57BL/10- und C57BL/6-Wildtyptieren .....	40
3.1.2.2 Analyse immunhistochemischer Parameter bei Gnotobioten .....	41
3.1.2.3 mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon gnotobiotischer Mäuse .....	43
3.1.2.4 MUC2 mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer Mäuse.....	44
3.1.3 Rekolonisierung gnotobiotischer C57BL/6-Wildtypiere .....	45
3.1.3.1 <i>C. jejuni</i> B2-Kinetik bei mit humaner vs. muriner Flora assoziierten Gnotobioten .....	45
3.1.3.2 <i>C. jejuni</i> B2 Translokation bei mit humaner und muriner Flora assoziierten ...	47
Gnotobioten .....	47
3.1.3.3 Veränderung der Darmlängen bei „humanisierten“ und „murinisierten“ Gnotobioten .....	48
3.1.3.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei rekolonisierten Gnotobioten ..	49
3.1.4 Analysen der humanen und murinen Darmflora .....	52
3.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> in Inflammationsmodellen.....	53
3.2.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei akuter <i>T. gondii</i> -Ileitis .....	54
3.2.1.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> ATCC 43431 bei akuter <i>T. gondii</i> -Ileitis	54
3.2.1.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> B2 bei akuter <i>T. gondii</i> -Ileitis.....	55
3.2.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei chronischer Inflammation.....	56
3.2.2.1 <i>E. coli</i> -Lasten bei Tieren mit chronischer IL10 <sup>-/-</sup> -Colitis.....	57
3.3 Auswirkungen der intraluminalen Erhöhung der <i>E. coli</i> -Dichte auf das Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> .....	58
3.3.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> ATCC 43431 nach Erhöhung der intraluminalen <i>E. coli</i> -Dichte .....	58
3.3.1.1 Kinetik der <i>E. coli</i> -Lasten nach intraluminaler Erhöhung mittels Gavage .....	60

3.3.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> nach dauerhafter Erhöhung der intraluminalen <i>E. coli</i> -Dichte .....	62
3.3.2.1 Dauerhafte Erhöhung der <i>E. coli</i> -Dichte mittels Gavage.....	62
3.3.2.2 Gabe von <i>E. coli</i> in das Trinkwasser.....	62
3.3.2.3 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> nach dauerhafter Erhöhung der intraluminalen <i>E. coli</i> -Last.....	63
3.3.2.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei dauerhaft erhöhter <i>E. coli</i> -Dichte .....	63
3.4 Altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz.....	65
3.4.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei jungen C57BL/6-Wildtyptieren.....	65
3.4.1.1 Analyse der Darmflora 3-Wochen alter C57BL/6-Wildtypiere .....	67
3.4.1.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion .....	68
3.4.2 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei jungen konventionell besiedelten C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	69
3.4.2.1 <i>E. coli</i> -Lasten junger konventionell besiedelter C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tiere .....	71
3.4.2.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion .....	71
3.4.2.3 Klinischer „Score“ im Verlauf der Infektion .....	73
3.4.2.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei jungen C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tieren nach <i>C. jejuni</i> -Infektion .....	75
3.4.2.5 Zytokinmessung aus Organkulturüberständen .....	76
3.5 Gnotobiotische C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tiere.....	77
3.5.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei gnotobiotischen C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tieren.....	77
3.5.2 Klinisches Bild .....	78
3.5.3 Bestimmung der Colonlänge.....	78
3.5.4 Messung des pH-Wertes.....	79
3.5.5 Histopathologie des Colons.....	80
3.5.6 Analyse immunhistochemischer Parameter bei gnotobiotischen C10/IL10 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	81
3.5.6.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten.....	81
3.5.6.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen .....	82
3.5.7 mRNA-Expression im Colon .....	83
3.5.7.1 Proinflammatorische Zytokine im Colon.....	83
3.5.7.2 MUC2 mRNA-Expression im Colon .....	85
3.5.8 Zytokinbestimmung aus Colon-Organkulturüberständen .....	86

3.6 Die Bedeutung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der <i>C. jejuni</i> -Enteritis .....	88
3.6.1 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei konventionell besiedelten TLR2 <sup>-/-</sup> - und TLR4 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	88
3.6.2 Auswirkung der TLR/IL10- Doppel-Defizienz auf das Kolonisationsverhalten .....	89
3.6.3 Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> bei gnotobiotischen C10/IL10 <sup>-/-</sup> -, TLR2 <sup>-/-</sup> /IL10 <sup>-/-</sup> - und TLR4 <sup>-/-</sup> /IL10 <sup>-/-</sup> -Tieren.....	90
3.6.3.1 Translokation von <i>C. jejuni</i> B2 .....	92
3.6.3.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion .....	93
3.6.3.3 Klinischer „Score“ im Infektionsverlauf.....	94
3.6.3.4 Darmlängenveränderung und pH-Werte .....	97
3.6.3.5 Histopathologie des Colons.....	98
3.6.3.6 Analyse immunhistochemischer Parameter .....	99
3.6.3.7 mRNA-Expression im Colon .....	101
3.6.3.8 Zytokinbestimmung aus Colon-Kulturüberständen .....	106
4. Diskussion .....	109
4.1 Einführung.....	109
4.2 Untersuchung der Kolonisationsresistenz gegen <i>C. jejuni</i> in murinen Modellen .....	109
4.3 Auswirkungen eines Inflammationszustandes auf die Kolonisationsresistenz.....	111
4.4 Altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz.....	113
4.5 Akutes murines Inflammationsmodell zur Untersuchung der Immunantwort.....	114
4.5.1 Klinisches Bild und Histopathologie.....	115
4.5.2 Immunhistochemische Untersuchungen des Colons.....	116
4.5.3 Zytokinbestimmungen auf Protein- und mRNA-Ebene.....	117
4.6 Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 bei der <i>Campylobacter</i> -Enteritis im Mausmodell .....	119
4.6.1 Die Rolle von TLR2 und TLR4 im akuten Inflammationsmodell .....	120
4.6.1.1 Klinisches Bild, Translokationen und Histopathologie.....	121
4.6.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen des Colons.....	122
4.6.1.3 Zytokinbestimmungen auf Protein- und mRNA-Ebene.....	122
5. Zusammenfassung .....	124
Literaturverzeichnis.....	126
Lebenslauf .....	130
Publikationen.....	131



Danksagungen ..... 132  
Selbständigkeitserklärung ..... 133

## Abkürzungsverzeichnis

°C – Grad Celsius	MFA – mit muriner Flora assoziiert
Abb. – Abbildung	min - Minuten
APC – Engl: Antigen-Presenting-Cell (Antigenpräsentierende Zelle)	MLN – Mesenteriale Lymphknoten
APS – Ammoniumperoxodisulfat	MPO7 – Myeloperoxidase 7
Aqua dest. – destilliertes Wasser	mRNA – Engl: messenger RNA
bp – Basenpaare	MUC – Mucin
BSA – Bovines-Serum-Albumin	n – Anzahl
bzw. – beziehungsweise	NF-κB – Engl: Nuclear-Factor-Kappa-B
ca. – circa	NK Zellen – Natürliche Killer Zellen
CBA – Engl: Cytometric Bead Assay	nm– nanometer
CBF – Campus Benjamin Franklin	NO – Stickstoffmonoxid
CBF1 – Engl: cell-binding-factor 1	p – P-Wert
CD – Engl : Cluster of Differentiation	PAMPS – Engl: Pathogen-Associated-Molecular- Patterns
<i>C. difficile</i> – <i>Clostridium difficile</i>	PBS – Engl: Phosphate-Buffered-Saline
CDC – Engl: Center of Disease Control	PCR – Engl: Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
CDT – Engl: Cytolethal Distending Toxin	p.i. – post infectionem
<i>C. jejuni</i> – <i>Campylobacter jejuni</i>	PP – Peyersche Plaques
cm – centimeter	RKI – Robert Koch Institut
CNA – Colistin / Nalidixin Säure-Agar	RNA – Engl: Ribonucleic-Acid (Ribonukleinsäure)
d – Tag	RT – Engl: Real time
DC– Engl: Dendritic Cell (Dendritische Zelle)	sek – Sekunden
DNA – Desoxyribonukleinsäure	SPF – Engl: Special-Pathogen-Free (spezifisch- pathogenfrei)
DSS – Engl: Dextrane-Sodium-Sulphate	sog. – sogenannte
EFSA – European Food Safety Authority	spp. – Spezies
<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>	Tab. – Tabelle
ELISA – Engl: Enzyme-linked Immunosorbent Assay	TBE – Tris-borat-EDTA
g – Gramm	TCA – Trichloressigsäure
GALT – Engl: Gut-Associated-Lymphoid-Tissue	TGF – Engl: Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
GBS – Guillain-Barré-Syndrom	<i>T. gondii</i> – <i>Toxoplasma gondii</i>
HE – Hämatoxylin-Eosin	TLR – Toll-like-Rezeptor
HFA – mit humaner Flora assoziiert	TNFα – Tumor-Nekrose-Faktor α
HPRT – Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase	TRIF – Engl: Toll-Receptor-associated Activator of Interferon
IEL – intraepitheliale Lymphozyten	μ – Micro
IFN – Interferon	vs. – versus
Ig – Immunglobulin	wt – Wildtyp
IL – Interleukin	z.B. – zum Beispiel
k – Kilo	
KC – Engl: Keratinocyte Cytokine	
KBE – Kolonie-bildende-Einheiten	
KV – Kanamycin / Vancomycin	
l – Liter	
LOS – Lipooligosaccharid	
LPL – Lamina propria Lymphozyten	
LPS – Lipopolysaccharid	
m – milli	
MAMPs – Engl: Microbe-Associated-Molecular- Patterns	
MCP – Engl: Monocyte chemoattractant protein	

## **1. Einleitung**

### **1.1 *Campylobacter jejuni*-Enteritis beim Menschen**

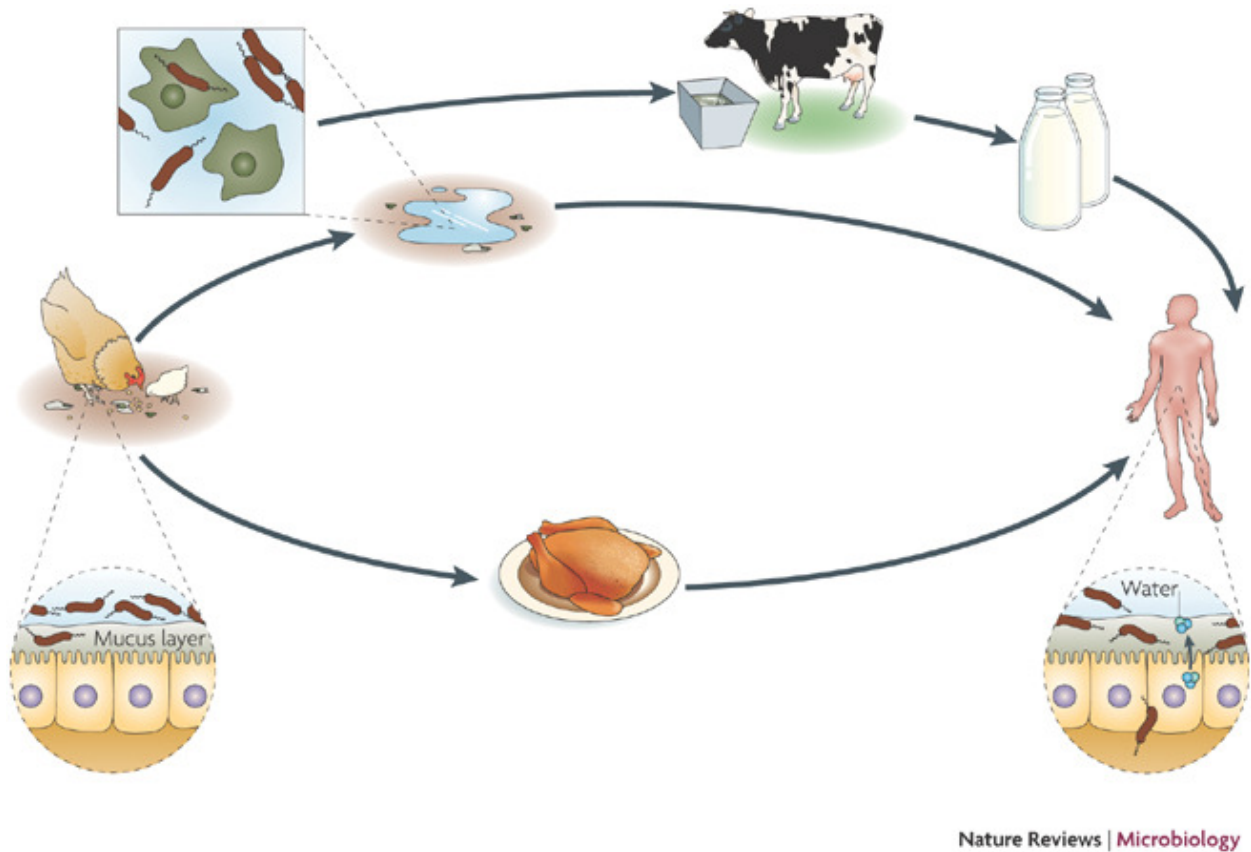
#### **1.1.1 Epidemiologie**

*Campylobacter jejuni* gehört zu den häufigsten Verursachern bakteriell bedingter akuter Diarrhöen beim Menschen (Janssen *et al.* 2008). Campylobacteriosen treten weltweit auf, wobei die Inzidenzraten deutliche Unterschiede aufweisen. Daten der European Food Safety Authority (EFSA) bestätigten *Campylobacter jejuni* mit Inzidenzraten von durchschnittlich 45/100000 Einwohner/Jahr als häufigstes gastrointestinales Pathogen, während in den USA Campylobacteriosen mit 13/100000 Einwohnern/Jahr hinter Salmonellosen die zweit häufigste Ursache bakterieller gastrointestinaler Infektionen darstellen (EFSA 2009, CDC 2010). Im Jahr 2009 wurden dem Robert-Koch-Institut ca. 62000 *Campylobacter*-Infektionen in Deutschland gemeldet (RKI, 2009). Auf Grund des normalerweise selbstlimitierenden Verlaufs der Erkrankung kann von Inzidenzraten ausgegangen werden, die 8 bis 30fach höher liegen als die auf Grundlage gemeldeter Fälle berechneten (Samuel *et al.* 2004).

Campylobacteriosen zeigen eine saisonale Abhängigkeit mit verstärktem Auftreten in den Sommermonaten. Des Weiteren ist eine bimodale Häufigkeitsverteilung hinsichtlich betroffener Altersgruppen zu beobachten. Infektionen treten gehäuft im Alter zwischen 0-4 Jahren sowie in der Altersgruppe der 15-44jährigen auf (Butzler 2004).

#### **1.1.2 Übertragungswege**

*Campylobacter jejuni* gehört zu den Zoonoseerregern. Als Zoonosen werden Krankheiten oder Infektionen bezeichnet, die von Tieren auf Menschen übertragen werden. Die Infektion kann über direkten Tierkontakt oder durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel verursacht werden. Viele Säugetiere und Vögel tragen *Campylobacter jejuni* als Bestandteil der kommensalen Darmflora natürlicherweise in sich und stellen somit ein Erregerreservoir dar (Wassenaar *et al.* 1991). Neben dem Verzehr unzureichend gegarten Geflügelfleisches, in Industrienationen der häufigste Ursprung einer Campylobacteriose, stellen unpasteurisierte Milch sowie kontaminiertes Wasser weitere Infektionsquellen dar (Abb. 1; Sahin *et al.* 2002, Young *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2006).



**Abb. 1: Übertragungswege und Erregerreservoir.** Säugetiere und Vögel stellen ein Erregerreservoir dar. Die Infektion kann über direkten Tierkontakt oder durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel verursacht werden (aus Young *et al.* 2007).

Im Gegensatz zur beschriebenen Epidemiologie in Industrienationen zeigen durch *Campylobacter jejuni* hervorgerufene Enteritiden in Entwicklungsländern ein hyperendemisches Auftreten, welches in erster Linie auf schlechte sanitäre Anlagen sowie engen häuslichen Tierkontakt zurückzuführen ist (Crushell *et al.* 2003). Betroffen ist vor allem die Altersgruppe der Kinder unter 5 Jahren, welche häufig bis zu 10 voneinander unabhängige Infektionen während der ersten Lebensjahre erleiden (Rao *et al.* 2001, Taylor *et al.* 1993). Saisonal gehäuftes Auftreten sowie das biphasische Auftreten hinsichtlich betroffener Altersgruppen kann in Entwicklungsländern nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu Industrienationen findet man dort unter Jugendlichen und Erwachsenen regelmäßig asymptomatische Verläufe, was mit dem Auftreten spezifischer, gegen *Campylobacter jejuni* gerichteter Serum IgA Antikörper korreliert (Blaser *et al.* 1985).

### 1.1.3 Das klinische Bild der *Campylobacter*-Enteritis

Die klinischen Verläufe der *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen können ausgesprochen variabel sein (Zilbauer *et al.* 2008). Klassischerweise manifestieren sich *Campylobacter jejuni*-Infektionen beim Menschen in Form akuter Gastroenteritiden. Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 1-3 Tagen und einer unspezifischen Prodromalphase kommt es zu akuten, anfangs wässrigen, später blutigen Diarrhöen, welche von krampfartigen abdominellen Schmerzen (Tenesmen), Fieber sowie Übelkeit und Erbrechen begleitet sein können. Im Stuhl imponieren mikroskopisch Leukozyten und Erythrozyten. Die inflammatorische Gewebereaktion in Jejunum, Ileum und Colon spiegelt sich in Infiltraten der Lamina propria mit neutrophilen Granulozyten, mononukleären Zellen und Eosinophilen wider. In Folge der Inflammation kann es zu Degeneration sowie Atrophie der Darmschleimhaut und Kryptenabszessen kommen, welche zu Gewebsulzerationen führen können (Wassenaar & Blaser 1999, Allos 2001, Butzler 2004, de Zoete *et al.* 2010). Die Schwere der Symptome sowie der Verlauf der Erkrankung sind jedoch sowohl von der Virulenz des entsprechenden Stammes als auch vom Immunstatus des Patienten abhängig (Zilbauer *et al.* 2008). Bei immunkompetenten Menschen zeigen *Campylobacter*-Enteritiden meist einen selbstlimitierenden Verlauf mit einem Abklingen der Symptome ab dem vierten Tag. Therapeutisch stehen symptomatische Maßnahmen wie Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution an erster Stelle. Eine antimikrobielle Behandlung sollte bei schweren Verlaufsformen (ca. 20 % der Fälle) wie z.B. bei persistierendem Fieber, anhaltenden Diarrhöen sowie bei immunkompromittierten Patienten oder bei Rückfällen (ca. 5 - 10 %) in Erwägung gezogen werden (Crushell *et al.* 2004). Makrolide und Gyrasehemmer sind hierbei Mittel der ersten Wahl. Ebenfalls wirksam sind Tetracycline, Aminoglycoside, Clindamycin sowie Chloramphenicol.

Gelegentlich entwickelt sich als Spätfolge einer Infektion eine postinfektiöse reaktive Arthritis, wie sie auch nach *Yersinien*-, *Salmonellen*- oder *Shigellen*infektionen beobachtet wird. Als schwerste Folgeerkrankung einer *Campylobacter*-Enteritis ist das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) zu nennen. Bei rund einem Viertel der GBS-Patienten kann eine vorangegangene *Campylobacter*-Infektion serologisch nachgewiesen werden (Hughes & Cornblath 2005). Bezogen auf die *Campylobacter*-Infektionen entwickelt sich ein GBS mit einer Häufigkeit von 1/1000 Infektionen (Gilbert *et al.* 2004).

Das Guillain-Barré-Syndrom bezeichnet eine autoimmune Erkrankung, bei der es zu einer meist reversiblen peripheren Neuropathie kommt (Nachamkin *et al.* 1998). Als Folgeerkrankung einer *Campylobacter*iose treten die Symptome 1-3 Wochen nach Infektion mit *C. jejuni* auf. Der

Pathogenese *Campylobacter*-assoziierter Fälle des GBS liegt am ehesten molekulare Mimikry zwischen Gangliosiden peripherer Nerven und dem Core-Protein des *Campylobacter*-Lipooligosaccharid zu Grunde (Godschalk *et al.* 2007, Gilbert *et al.* 2004).

#### **1.1.4 *Campylobacter jejuni* - Charakterisierung des Erregers**

*Campylobacter jejuni* zählt zur Klasse der Epsilonproteobacteria und ist der Gattung *Campylobacter* zugehörig, welche neben den Gattungen *Arcobacter*, *Bacteroides ureolyticus* sowie *Sulfurospirillum* die Familie der *Campylobacteraceae* bildet.

Die Gattung *Campylobacter* umfasst 17 Spezies, von denen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* hinsichtlich der Humanpathogenität die wichtigsten Spezies darstellen (Snelling *et al.* 2005, Poly & Guerry 2008). *Campylobacter jejuni* ist für über 90 % der diagnostizierten *Campylobacteriosen* beim Menschen verantwortlich (Jannsen *et al.* 2008).

Morphologisch betrachtet handelt es sich bei Mitgliedern der Gattung *Campylobacter* um gramnegative, spiralförmig gekrümmte, dünne (1,5-6,0µm lang, 0,2-0,5µm breit) Stäbchenbakterien. *Campylobacter* spp. benötigen zum Überleben eine mikroaerophile Atmosphäre, gekennzeichnet durch 3-15 % Sauerstoff-, sowie 2-10 % Kohlenstoffdioxidgehalt. Die optimale Wachstumstemperatur von *Campylobacter jejuni* beträgt 42°C (Snelling *et al.* 2005, Ketley 1997).

Die genetische Variabilität von *Campylobacter jejuni* sowie das Fehlen typischer Virulenzfaktoren haben bislang das Verständnis der Pathogenese der *Campylobacter*-Enteritis erschwert.

Motilität, Toxinproduktion sowie Adhäsion und Invasion von Epithelzellen werden als wichtige Pathogenitäts-assoziierte Faktoren des Bakteriums diskutiert.

*Campylobacter* spp. weisen uni- oder bipolare Flagellen auf, welche der Motilität dienen. Die Motilität eines Pathogens spielt schon zu frühen Zeitpunkten der Infektion, beim Durchdringen der viskösen, das Darmepithel überziehenden Mukusschicht, eine entscheidende Rolle (Wassenaar & Blaser 1999, Ketley 1997). Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten die Bedeutung der Flagellum-vermittelten Motilität hinsichtlich der Invasivität und der Kolonisierung von *Campylobacter jejuni* bestätigen (Grant *et al.* 1993, Wassenaar *et al.* 1991, Morooka *et al.* 1985, Konkel *et al.* 2004). Die Bedeutung des Flagellums für die Virulenz von

*Campylobacter jejuni* wird weiterhin durch seine immunogene Eigenschaft bestärkt (Nachamkin & Yang 1989, Baqar *et al.* 2008).

Cytolethal Distending Toxine (CDTs) stellen eine Familie von hitze-labilen Proteinen dar, welche den Zellzyklus eukaryotischer Zellen blockieren (Ge *et al.* 2008). CDTs werden von einer Vielzahl pathogener gramnegativer Bakterien, unter anderem von *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* und *Salmonella enterica* serovar Typhi produziert (Smith & Bayles 2006, Haghjoo & Galan 2004). Untersuchungen von cdtB-Mutanten in murinen Modellen konnten Hinweise darauf geben, dass das CDT eine Rolle für das stabile Ansiedeln von *C. jejuni* und die Ausbildung histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt spielt (Purdy *et al.* 2000, Fox *et al.* 2004 ).

Die Fähigkeit an Epithelzellen adhären zu können spielt eine entscheidende Rolle für das Kolonisationsverhalten von Darmpathogenen. Durch den Vergleich von Wildtypen des Stammes *C. jejuni* 81-176 mit Mutanten, welche keine Expression des Adhäsins CBF1 (cell-binding factor 1) aufwiesen, konnte zunächst *in vitro* die Bedeutung von CBF1 für das Adhäsionsverhalten bestätigt werden. In einem *in vivo* Mausmodell mit BALB/c-Tieren zeigte sich, dass die Mutanten verglichen mit den Wildtypen signifikant schwächer und kürzer kolonisierten (Pei *et al.* 1998).

Der inflammatorische Charakter der *Campylobacter*-Enteritis sowie die auftretende epitheliale Zellzerstörung legen die Frage nach der Invasivität des Pathogens nahe.

Colon-Biopsate von Patienten, histologische Untersuchungen im Tiermodell sowie zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen epithelialen Zelllinien konnten das invasive Potenzial von *Campylobacter jejuni* bestätigen (van Spreeuwel *et al.* 1985, Mansfield *et al.* 2007, Everest *et al.* 1992, Krause-Gruszczynska *et al.* 2007, Harvey *et al.* 1999).

## **1.2 Die kommensale Darmflora**

### **1.2.1 Die Darmflora – Zusammensetzung und Funktionen**

Die mikrobielle Gastrointestinalflora von Säugetieren setzt sich aus über 500 verschiedenen Spezies zusammen. Vom Magen ausgehend nehmen sowohl die Diversität als auch die Dichte der Bakterienpopulation in aboraler Richtung zu. Im Colon befinden sich ungefähr  $10^{11}$ - $10^{12}$  Bakterien pro Gramm Darminhalt (O'Hara & Shanahan 2006, Palmer *et al.* 2007).

Die Normalflora des Colons besteht zu über 90 % aus obligat anaeroben Bakterien. Vorherrschend sind Mitglieder der Gattungen *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridiales* und *Lactobacillales*. Weniger häufig vorkommende Bakterien stellen z.B. Mitglieder der Gattungen *Enterococcus* spp. und *Enterobacteriaceae* spp. dar (Guarner & Malagelada 2003, Ley *et al.* 2008).

Die bakterielle Darmflora übernimmt zahlreiche protektive, strukturelle und metabolische Funktionen. Der Wirtsorganismus stellt mit seinen konstanten Wachstumsbedingungen eine Nische für die Darmflora dar, so dass die Wechselbeziehung zwischen Wirt und kommensaler Darmflora im gesunden Zustand als Symbiose bezeichnet werden kann.

Eine bedeutende protektive Funktion der kommensalen Darmflora besteht in der Verhinderung der Besiedlung des Darms mit pathogenen Keimen. Diese sogenannte Kolonisationsresistenz beschreibt das Unvermögen einer Vielzahl pathogener Bakterien, dank der zahlenmäßigen Dominanz der kommensalen Bakterien, den Darm zu besiedeln und einen Krankheitsprozess auszulösen (Stecher & Hardt 2008).

Weder die molekulare Basis der Kolonisationsresistenz noch Mechanismen und Wege, durch welche es manchen enteropathogenen Erregern gelingt, die Kolonisationsresistenz zu durchbrechen, sind hinreichend bekannt.

Die Bedeutung der kommensalen Darmflora für die Kolonisationsresistenz konnte durch die Arbeit mit keimfreien murinen Modellen sowie antibiotisch behandelten Mäusen untermauert werden (Guarner & Malagelada 2003). In einem durch *Salmonella enterica* induzierten murinen Colitis-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass die Komplexität der kommensalen Flora mit der Resistenz gegenüber dem Pathogen korreliert (Stecher *et al.* 2010).

In Modellen mit *Citrobacter rodentium* und *Salmonella enterica* spp. *I serovar Typhimurium* (S. Typhimurium) zeigte sich eine Verbindung zwischen der inflammatorischen Wirtsantwort und der Überwindung der Kolonisationsresistenz durch das Pathogen. Der genaue Mechanismus, durch den ein Inflammationszustand die Barriere Kolonisationsresistenz zerstört, ist nicht bekannt. Diskutiert werden unter anderem veränderte physiologische Bedingungen sowie die durch die Inflammation induzierte Veränderung der Zusammensetzung der kommensalen Flora (Lupp *et al.* 2007, Stecher *et al.* 2007, Stecher & Hardt 2008).

Unter den metabolischen Funktionen der kommensalen Darmflora ist die Fermentation unverdaubarer Nahrungsbestandteile, die Produktion von Vitamin K sowie die Produktion kurzkettiger Fettsäuren hervorzuheben. Kurzkettige Fettsäuren tragen zur Proliferation und



Differenzierung der intestinalen Epithelzellen bei (Hooper *et al.* 2002, Guarner & Malagelada 2003).

Weiterhin kommt der kommensalen Darmflora eine immunmodulatorische Bedeutung zu. In komparativen Studien mit keimfreien und normalbesiedelten Mäusen sowie durch Betrachtung zuvor keimfreier Tiere, welche mit einer apathogenen Flora besiedelt wurden, konnte die Rolle der Darmflora hinsichtlich der Entwicklung des mukosalen Immunsystems bestätigt werden. Gnotobiotisch gehaltene Mäuse zeigen unterentwickelte Peyersche Plaques (PP) und mesenteriale Lymphknoten (MLNs) sowie eine im Vergleich zu normal besiedelten Tieren verringerte Zahl an intestinalen IgA sezernierenden Plasmazellen. Auch die Anzahl an T-Zellen, speziell die der CD4+ Zellen der Lamina propria, ist bei keimfreien Tieren vermindert (Salzman *et al.* 2007, Smith *et al.* 2007).

### **1.2.2 Die Darmflora – Interaktionen mit dem Immunsystem**

Der Gastrointestinaltrakt von Säugetieren beherbergt die größte Grenzfläche des Organismus zur belebten Außenwelt. Diese mukosale Oberfläche steht in kontinuierlichem Kontakt zu der enormen Vielfalt und Dichte an Bakterien der kommensalen Intestinalflora, zu Antigenen aus der Nahrung sowie potenziell pathogenen Organismen.

Die Aufrechterhaltung dieses mikrobiellen Ökosystems erfordert eine fein regulierte homöostatische Balance zwischen Tolerierung der kommensalen Darmflora einerseits und der Erkennung potenziell pathogener Organismen andererseits.

Diese Differenzierung ist Aufgabe des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (*engl.* GALT, gut associated lymphoid tissue, bestehend aus, Peyer'schen Plaques (PP), intraepithelialen Lymphozyten (IEL), Lamina-propria-Lymphozyten (LPL) und mesenterialen Lymphknoten (MLN) sowie Dendritischen Zellen und Makrophagen), welches eine überschießende Reaktion auf die kommensale Flora verhindern und gleichzeitig eine schnelle und adäquate Immunantwort auf Pathogene sicherstellen muss (Artis 2008, Hooper & Macpherson 2010).

Für die Detektion der Darmflora und die Elimination von Pathogenen spielen sogenannte Toll Like Rezeptoren (TLR) eine entscheidende Rolle (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Diese evolutionär hoch konservierten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden vor allem auf und in Makrophagen und dendritischen Zellen sowie auf intestinalen Epithelzellen exprimiert und erkennen extra- und intrazelluläre Moleküle von Bakterien, Viren und Pilzen. Diese TLR-

Liganden sind spezifische molekulare Bestandteile von Mikroorganismen, sogenannte MAMPS – Microbe-Associated-Molecular-Patterns (auch PAMPS - Pathogen-Associated-Molecular-Patterns genannt). Beispiele sind das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, welches TLR4 aktiviert sowie Lipoteichonsäure, die den Liganden des TLR2-Rezeptors darstellt (Magalhaes *et al.* 2007, Chaturvedi & Pierce 2009). Die Stimulation der TLRs führt zu einer proinflammatorischen Immunantwort, welche mit der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden einhergeht (Medzhitov 2007).

Eine wesentliche und grundlegende Bedeutung für die Aufrechterhaltung des symbiotischen Verhältnisses kommt der räumlichen Trennung von dicht besiedeltem Darmlumen und subepithelialelem Gewebe zu (Duerkop *et al.* 2009). Die Barriere, welche durch die intestinalen Epithelzellen gebildet wird, wird durch weitere Mechanismen der angeborenen und erworbenen Abwehr unterstützt. Die dem Epithel aufliegende Mukusschicht verhindert den direkten Kontakt von Kommensalen zu Epithelzellen. Sie ist zweischichtig aufgebaut, Hauptbestandteil und strukturgebende Komponente ist das Glykoprotein MUC2. Im physiologischen Zustand ist die innere, dem Epithel zugewandte Mukusschicht nicht von Bakterien besiedelt und stellt somit einen sterilen Raum dar (Johansson *et al.* 2008). Der protektive Effekt der Mukusschicht konnte durch Studien mit MUC2-defizienten Mäusen bestätigt werden. Diese zeigten degenerative Veränderungen des Epithels und der Lamina propria, superfizielle Erosionen sowie inflammatorische Zellinfiltrationen (Van der Sluis *et al.* 2006). Defensine, Cathelicidine oder auch C-Typ Lectine stellen Peptide mit antimikrobieller Wirkung dar. Diese sind in der Lage, Bakterien, welche in die innere Mukusschicht eingedrungen sind, abzutöten. Von Bedeutung ist des Weiteren Immunglobulin A (IgA), welches von B-Zellen produziert wird. IgA wird über die apikale Epithelzellmembran in das Darmlumen sezerniert und verringert hier die Adhärenz von Bakterien an den Epithelzellen sowie deren Translokation über die Epithelschicht (Hooper 2009, Garrett *et al.* 2010). Diese ineinandergreifenden Mechanismen tragen zur luminalen Kompartimentierung der Darmflora bei und haben zum Ziel, ein opportunistisches Penetrieren von kommensalen Darmbakterien zu minimieren.

Rakoff-Nahoum *et al.* konnten zeigen, dass die Detektion von kommensalen Bakterien durch Toll Like Rezeptoren zur Produktion von Zytokinen wie IL-6, KC-1 und TNF führt, welche Reparaturprozesse am Epithel in Gang setzen und so zur Aufrechterhaltung der Barriere und Homöostase im Darm beitragen. Diese Befunden demonstrieren einen protektiven Charakter der

Interaktion von kommensalen Bakterien und TLRs und deuten auf eine aktive immunmodulatorische Rolle der kommensalen Darmflora hin (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004).

### 1.3 Zielsetzung

Wildtypmäuse mit physiologischer kommensaler Darmflora weisen eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz gegenüber dem Pathogen *C. jejuni* auf. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der kommensalen Darmflora hinsichtlich der Kolonisationsresistenz zu untersuchen. Neben der Bedeutung der kommensalen Darmflora für die Kolonisationsresistenz, sollten am Beispiel der *C. jejuni*-Infektion Informationen gewonnen werden, wie es Pathogenen gelingt, die Kolonisationsresistenz zu überwinden. Dafür wurde das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* in unterschiedlichen Modellen betrachtet.

Das Studium der Pathogenese der *Campylobacter*-Enteritis wird nicht zuletzt durch das Fehlen geeigneter Säugetiermodelle erschwert. Ebenso ist weitgehend unbekannt, welche Immunantworten *C. jejuni* im Wirtsorganismus hervorruft. Aus diesem Grund stellt die Etablierung eines murinen Modells, welches das klinische Bild der *Campylobacter*-Enteritis, wie es beim Menschen beobachtet wird, nachahmt, ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Anhand eines solchen Modells sollte die Immunantwort auf eine *C. jejuni*-Infektion näher charakterisiert werden.

Weiterhin sollte die Bedeutung von TLR2- und TLR4-Signalwegen bei *C. jejuni*-Infektionen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Substanz	Hersteller/ Zusammensetzung
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Inst. f. Mikrobiologie
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Ciprofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Formaldehydlösung (4%)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Gram's crystal violet Solution	Fluka, Steinheim
Gram's safranin Solution	Fluka, Steinheim
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Imipenem	MSD, Haar
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lugols Lösung	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg
N-(1-naphthyl)ethylendiamine	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Puffer (10x)	108 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 7,3 g EDTA, Aqua dest. auf 1000 ml
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Vancomycin	Cell Pharm, Bad Vilbel
Wasserstoffperoxid	Biochrom AG, Berlin
Xylol	J.T.Baker, Phillipsburg

## 2.1.2 Kommerzielle „Kits“

Tabelle 2: Kommerzielle „Kits“

Kitbezeichnung	Hersteller
BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Envision Peroxidase Kit	DAKO, Hamburg
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine Mouse/Rat IL-22 Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
StreptavidinAP Kit	DAKO, Hamburg
SuperScript <sup>TM</sup> III Platinum <sup>R</sup> One-Step Quantitative-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.1.3 Oligonukleotidprimer und -sonden

Tabelle 3: Oligonukleotidprimer

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Orientierung
HPRT ex7,8 F	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	sense
HPRT as	CACAggACTAgAACACCTgC	antisense
mu IFN $\gamma$ se	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA	sense
mu IFN $\gamma$ 04	CTCTTCCCCACCCCgAATCA	antisense
IL-06ex3 F	TgATggATgCTACCAAActggAT	sense
mu IL-06 A	ggTCTTggTCCTTAgCCACT	antisense
IL-10 L	TAggCgAATgTTCTTCC	sense
IL-10 R	CAgCTCTAggAgCATgTggC	antisense
IL-10 neo R	CCTgCGTgCAATCCATCTTg	antisense
IL-18 S	ACCCCAgACCAgACTgATAATATAC	sense
IL-18 R	gAAgATTCAAActCCATCTTgTTg	antisense
IL-22 S	gCTgAAggAgACAgTgAAAAAg	sense
IL-22 R	AggAAggAgCAgTTCTTc	antisense
IL-23 F'	CCAgCgggACATATgAATCTAC	sense
IL-23 R''	TgCAAgCAGAACTggCTgTT	antisense
Muc2 F	CTggATTgTAACAACACATgTACTTg	sense
Muc2 A	CTCTTCCAActgAACAgCC	antisense
TLR2-common	CTTCCTgAATTTgTCCAgTACA	sense
TLR2 MUT	gggCCAgCTCATTCTCCAC	antisense
TLR2 WT	ACgAgCAAgATCAACAaggAgA	antisense
TLR4 Cr sense	gCAAgtTTCTATATgCATTCTC	sense
TLR4 Cr antisense	CCTCCATTTCCAATAggTAg	antisense
TLR4 Ex sense	CAgTCggTCAgCAAACgCCTTCTTC	sense
TLR4 Ex antisense	CAAaggCAggCTAgCAggAAaggTg	antisense
TNF $\alpha$ ex 3,4 F	CTgTAgCCCACgTCgTAgCA	sense
TNF $\alpha$ R	CggCAgAgAggAggTTgACT	antisense

**Tabelle 4: Oligonukleotidsonden**

Sonde	Sequenz 5' - 3'
HPRT FL-Sonde	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA
HPRT LC-Sonde	TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg
IFN $\gamma$ FL-Sonde	CATCAgCAACAACATAAagCgTCA
IFN $\gamma$ LC-Sonde	CATCAgCAACAACATAAagCgTCA
IL-6 FL-Sonde	CATAAAATAgTCCTTCCTACCCCAATTTCC
IL-6 LC-Sonde	TgCTCTCCTAACAgATAAgCTggAgTCAC
IL-18 FL-Sonde	AggATgCTgAAgTAggggAAgC
IL-18 LC-Sonde	CTgCAggCAgTACAggACAaggTC
IL-22 FL-Sonde	CTCAgAgACATAAACAgCAggTCCAgT
IL-22 LC-Sonde	CCCCAATCgCCTTgATCTCTCCA
IL-23 FL-Sonde	CCCgTATCCAgTgTgAAgATggTT
IL-23 LC-Sonde	TgACCCACAaggACTCAAggACAA
Muc2 FL-Sonde	AgCACCTgCTCTATCTACgggAgTg
Muc2 LC-Sonde	CCACTACATCACCTTCgACgggAA
TNF $\alpha$ FL-Sonde	CCCgACTACgTgCTCCTCACCCA
TNF $\alpha$ LC-Sonde	CCgTCAgCCgATTTgCTATCTCATAACC

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB Molbiol Berlin hergestellt.

## 2.1.4 DNA-Längenmarker, Enzyme

**Tabelle 5: DNA-Längenmarker, Enzyme**

Produktbezeichnung	Hersteller
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City
DNase I	Roche, Mannheim
Envision Peroxidase anti-Kaninchen	DAKO, Hamburg
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Fermentas, St Leon-Rot
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St Leon-Rot
Liberase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Streptavidin Alkalische Phosphatase	DAKO, Hamburg

## 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 6: Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Biotin. Esel-anti-Kaninchen	1:200	Dianova, Hamburg
Biotin. Kaninchen-anti-Ratte	1:200	DAKO, Hamburg
B220/ CD45R	1:200	ebioscience, San Diego
Caspase3	1:200	CellSignaling, Danvers

CD3	1:20	DAKO, Hamburg
Foxp3	1:100	ebioscience, San Diego
Ki67	1:100	DAKO, Hamburg
MPO7	1:400	DAKO, Hamburg

## 2.1.6 Nährmedien und Seren

Tabelle 7: Nährmedien und Seren

Nährmedium/ Serum	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia Schafblut Agar	Oxoid, Wesel
Columbia Schafblut + CNA	BD Biosciences, Heidelberg
Columbia Schafblut + Kanamycin/ Vancomycin	Oxoid, Wesel
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Karmali Selektivagar	Oxoid, Wesel
MacConkey Selektivagar	Oxoid, Wesel
De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Selektivagar	Oxoid, Wesel
RPMI 1640 + Glutamax	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe
Thioglycolat-Bouillon	Oxoid, Wesel

## 2.1.7 Geräte und Plastikwaren

Tabelle 8: Geräte und Plastikwaren

Gerät/ Plastikware	Hersteller
Anaerobier-Töpfe	Oxoid, Wesel
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Capillary Gap Microscope Slides	DAKO, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Tubes	Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
FastPrep FP120	Bio 101, La Jolla
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank -20	Liebherr, Rostock
Gefrierschrank -80	Sanyo-Fisher Sales, München
Horizontale Gelelektrophorese	PeqLab, Erlangen
Kühlplatte	MICROM GmbH, Walldorf
LightCycler	Roche, Mannheim
Microm HM 355	MICROM GmbH, Walldorf
Mikrotiterplatte, unbeschichtet	Nunc, Wiesbaden
Mörser und Stößel (Porzellan)	Halbenwanger, Berlin
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multistep pipette	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (serol.) 5, 10, 25 ml	Falcon, BD Biosciences, Heidelberg

Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenzentrifuge	Heraeus, Hanau
Präparierbesteck	Aesculap/Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/ 50 ml	Sarsted, Sarstedt/ Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
Rotor Stator, ART Micra D-1	Roth, Karlsruhe
Schüttler	Braun, Melsungen
Shandon EXCELSIOR ES	Thermo Electro Corporation, Waltham
SpectraFluor Plus	Teca, Crailsheim
Spritzen 1/ 5 / 10 ml	Braun, Melsungen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
TEC5 EME-2 5230 TecTM Tissue Tek®	Sakura, Staufen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Heilbronn
Uni Link Einbettkassetten	R. Langenbrinck, Emmendingen
Zeiss Standard 25	Zeiss, Göttingen
Zellsieb 70/ 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg

## 2.1.8 Sonstiges

**Tabelle 9: Sonstiges**

Material	Hersteller
AnaeroGen®	Oxoid, Wesel
AnaeroTest®	Merck, Darmstadt
CampyGen®	Oxoid, Wesel
Flüssigstickstoff	Fa. Messer, Griessheim
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim/ Simax, Selb
Haemocult®	Beckman Coulter, Krefeld
Knopfkanüle	Roth, Karlsruhe
LightCycler Glaskapillaren	Roche, Mannheim
Microbiologica Bactident® Oxidase	Merck, Darmstadt
Pehanon pH-Streifen	Macherey-Nagel, Düren

## 2.2 Versuchstiere und Haltung

### 2.2.1 Versuchstiere

Die C57BL/6-, C57BL/10- sowie NMRI-Mäuse wurden bei The Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben und im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Universitätsmedizin Berlin gezüchtet und gehalten.



TLR2<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Marina Freudenberg (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die TLR4-Defizienz kam auf Grund einer spontanen homozygoten Deletion des TLR4-Genes (Merlin *et al.* 2001) mit daraus resultierendem komplettem Funktionsverlust zustande.

Die TLR2-Defizienz wurde mittels Gentergeting erzeugt und in der Folge auf einen C57BL/10ScSn-Hintergrund gekreuzt (Werts *et al.* 2001, Lembo *et al.* 2003). Die TLR2<sup>-/-</sup>-Tiere wurden schließlich sechsfach mit C57BL/10ScSn-Tieren rückgekreuzt.

Die IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse im 129/SvJ-Hintergrund wurden von Professor R. Balfour Sartor (University of Carolina, USA) zur Verfügung gestellt.

Um IL10<sup>-/-</sup>-TLR2<sup>-/-</sup>- und IL10<sup>-/-</sup>-TLR4<sup>-/-</sup>- Mäuse im 129/SvJ//C57BL/10-ScSn-Hintergrund zu erhalten, wurden IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse mit TLR2<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt. Auf Grund der Tatsache, dass die Ausprägung der IL10-Colitis vom genetischen Hintergrund der Maus abhängt (Mahler & Leiter 2002) wurden als Kontrolltiere Kreuzungen aus C57BL/10-Wildtypen und IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen im 129/SvJ-Hintergrund verwendet. Diese Versuchstiere wurden ab der 6. Generation in die Experimente aufgenommen. Die Gendefekte jeder Maus wurden durch Genotypisierung überprüft.

### **2.2.2 Haltung unter SPF-Bedingungen**

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin gehalten. In den Räumen der Tierhaltung herrschten Spezifisch-Pathogenfreie (SPF) Bedingungen, 21°C Raumtemperatur, 50 % relative Luftfeuchte sowie ein 12/12 Stunden Hell- und Dunkelrhythmus. Die Tiere hatten während des gesamten Versuchsablaufes freien Zugang zu Leitungswasser und Futter. Einmal wöchentlich erhielten die Tiere neue Käfige mit frischem Einstreu, frischem Leitungswasser und autoklaviertem Futter.

### **2.2.3 Haltung unter sterilen Bedingungen**

Die Mäuse wurden in einem separaten Tierlabor in sterilen Käfigen gehalten. Diese waren zusätzlich mit sterilen Abdeckhauben versehen. Jede Intervention erfolgte unter sterilen Kautelen mit Einmal-Kittel, sterilen Handschuhen, Mundschutz und Kopfhaube. Die entsprechenden Antibiotika-Lösungen wurden zuvor steril filtriert und jedes verwendete Material, das mit den Mäusen in Kontakt kam, wurde autoklaviert bzw. entsprechend desinfiziert.

### 2.3 Klinische Beurteilung der Tiere

Die Erhebung des klinischen „Scores“ erfolgte im naiven, nicht infizierten Zustand sowie zu definierten Zeitpunkten nach Infektion der Tiere bis zum Sektionszeitpunkt. Für die Bewertung wurde ein standardisierter, modifizierter Score der akuten DSS-Colitis verwendet (Siegmond *et al.* 2001). Der klinische Aspekt, die Stuhlkonsistenz und der makroskopische bzw. mikroskopische Blutnachweis im Stuhl bildeten die drei Hauptkategorien, aus denen der „Score“ errechnet wurde. Für jede der Hauptkategorien wurden bis zu 4 Punkte vergeben, so dass sich nach Addition ein klinischer „Score“ von maximal 12 Punkten ergab. Tabelle 10 zeigt die Zuordnung der Punktwerte. Die Überprüfung, ob die Tiere Blut im Stuhl absetzten wurde durch einen Haemocult-Test durchgeführt. Hierfür wurde ein nach Greeger modifizierter Gujak-Test verwendet. Ein ca. 0,5cm langes Stück Faeces wurde auf die Fläche des Haemocult-Testfelds gegeben und die Rückseite mit der Entwicklungsflüssigkeit beträufelt. Nach einer Minute erfolgte die Beurteilung.

**Tab. 10: Punkt-Zuordnung des klinischen „Scores“**

<b>Klinischer Aspekt</b>	<b>Punktwert</b>
Unbeeinträchtigt Erscheinungsbild	0
Struppiges Fell	1
Struppiges Fell und gekrümmte Haltung	2
Struppiges Fell, gekrümmte Haltung und Isolationsverhalten	3
Präfinales Erscheinungsbild bzw. Tod	4
<b>Stuhlkonsistenz</b>	<b>Punktwert</b>
Harter, geformter Faeces	0
Weicher, breiiger Faeces	2
Flüssiger, am Anus klebender Faeces	4
<b>Haemocult</b>	<b>Punktwert</b>
Kein Farbumschlag	0
Farbumschlag	2
Makroskopisch sichtbares Blut oder Rektumprolaps	4

## 2.4 Tierversuche

Die Tierversuche der vorliegenden Arbeit wurden gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsvorhaben G 0173/07 vom 15.11.2007, Tötungsantrages 114/05 vom 27.04.2005).

### 2.4.1 Infektion mit *C. jejuni*

Bei dem Stamm *C. jejuni* ATCC 43431 und *C. jejuni* 81-176 handelte es sich um Patientenisolate, welche freundlichst von Prof. Dr. Steffen Backert (Universität Magdeburg) zur Verfügung gestellt wurden. Der Stamm *C. jejuni* B2 stellte ebenfalls ein Patientenisolat dar, das freundlicherweise von Prof. Dr. Uwe Groß (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde.

Jeder Stamm wurde in einer Cryobank bei -80°C gelagert. Zur Anzucht wurden 100µl sowie einige Kunststoffkügelchen aus der entsprechenden Cryobank entnommen und auf Karmali-Agar ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C über 48 Stunden. Anschließend wurden die Kolonien von je 2 bewachsenen Platten mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in 1,5ml steriles PBS eingerührt. Im Folgenden wurden jeweils 100µl der Suspension auf ca. 14 Karmali-Agares ausplattiert und 48h unter den genannten Bedingungen bebrütet. Die so konfluiert gewachsenen *Campylobacter*-Kolonien wurden mit einem sterilen Tupfer in die entsprechend der Tiermenge berechnete PBS-Menge überführt und jedes Tier unmittelbar mit 0,3ml *Campylobacter*-Suspension mittels Gavagesonde an drei konsekutiven Tagen peroral infiziert. Sollte das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei Tieren mit akuter *T. gondii*-Ileitis untersucht werden, so erfolgte die *C. jejuni*-Infektion drei Tage nach der *T. gondii*-Infektion (2.4.3).

Die *Campylobacter*-Konzentration von jeder Infektionssuspension wurde mittels einer seriellen Verdünnungsreihe berechnet und in KBE/ml angegeben. Um eine 1:100 Verdünnung zu erhalten, wurden 100µl der Infektionssuspension in 9,9ml steriles NaCl 0,9% gegeben und durchmischt. Durch die Überführung von 100µl aus der ersten Verdünnung in weitere 9,9ml steriles NaCl 0,9%, wurde die zweite Verdünnungsstufe (1:10000) hergestellt. Aus dieser wurden wiederum 100µl in 9,9ml steriles NaCl 0,9% gegeben, wodurch eine 1:1000000 Verdünnung entstand. 100µl der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden auf Columbia-Agar ausplattiert, je 100µl der letzten beiden Verdünnungsstufen wurden auf Karmali-Agar

ausplattiert. Die *Campylobacter*-Dichte in den verwendeten Infektionssuspensionen betrug ca.  $10^8$ - $10^9$  Koloniebildende Einheiten (KBE) *C. jejuni* /ml.

Um eine mögliche sekundäre Kontamination auszuschließen, wurden 100µl der Infektionssuspension unverdünnt auf CNA-Agar ausplattiert und 48h bei 37°C und normaler Atmosphäre bebrütet. Die Quantifizierung der Koloniebildenden Einheiten wurde wie unter 2.5.3 beschrieben vorgenommen.

## **2.4.2 Infektion mit *E. coli***

### **2.4.2.1 Gavage**

Zur Herstellung der *E. coli*-Suspension wurde auf einen aus dem Darminhalt einer naiven C57BL/6-Wildtypmaus isolierten Stamm, der im Vorfeld biochemisch und mittels Sequenzierung identifiziert worden war, zurückgegriffen und in Thioglycolat-Bouillon angezüchtet. Nach Übernacht-Bebrütung der Bouillons bei 37°C stellte sich eine Trübung von mindestens 6 MacFarland-Einheiten ein, einer Bakterienkonzentration von ca.  $10^9$  -  $10^{10}$  KBE/ml entsprechend.

Anschließend wurden je 100µl der Thioglycolat-Bouillon auf MacConkey-Agar plattiert. Nach Bebrütung wurden die Kolonien der überwucherten Platten in eine der jeweiligen Tierzahl angepassten Menge steriles PBS eingerührt.

Zur Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte erhielten die Tiere per Gavage jeweils 0,3ml der Suspension peroral mittels Schlündelsonde verabreicht. Die Gavage erfolgte zunächst an drei aufeinanderfolgenden Tagen. In einem späteren Experimentalansatz erfolgte die perorale Gabe täglich. Zur Überprüfung der Menge an verabreichtem *E. coli* wurde die *E. coli*-Infektionssuspension in drei Verdünnungsstufen je 1:100 auf Columbia- sowie MacConkey-Agar ausplattiert. Um eine mögliche sekundäre Kontamination auszuschließen, wurden zudem 100µl der Infektionssuspension unverdünnt auf CNA-Agar ausplattiert. Die Agares wurden 24h bei 37°C und normaler Atmosphäre bebrütet.

Die Quantifizierung der Koloniebildenden Einheiten wurde wie unter 2.5.3 beschrieben vorgenommen.

### **2.4.2.2 *E. coli* im Trinkwasser**

Zur Verabreichung von *E. coli* über das Trinkwasser der Tiere wurde *E. coli* zunächst wie unter 2.4.2.1 beschrieben angezüchtet. Im Folgenden wurden die Kolonien von je 3 dicht bewachsenen

Platten mittels sterilen Tupfern in 15ml steriles PBS eingerührt. Diese Suspension wurde in eine Trinkflasche überführt und mit 150ml PBS aufgefüllt. Zur Überprüfung der *E. coli*-Konzentration wurde von der in der Trinkflasche enthaltenen Suspension wie unter 2.4.2.1 beschrieben eine Probe entnommen und mittels serieller Verdünnung und Anzucht auf Columbia- sowie MacConkey-Agar die Konzentration berechnet.

### **2.4.3 Infektion mit *T. gondii***

Zur *T. gondii*-Infektion der Versuchstiere wurde der Parasit *Toxoplasma gondii* vom Stamm ME49 verwendet. Dieser Stamm ist zystenbildend, Maus-avirulent (Typ-II-Stamm) und wurde uns freundlicherweise von Prof. J. Remington (Stanford University, USA) zur Verfügung gestellt. Nach peroraler Infektion von NMRI-Mäusen (sog. „Bank-Mäuse“) mit 10 Zysten *T. gondii*, passiert der Parasit ohne lokale Entzündungsreaktion den Darm, gelangt über die sekundären Lymphorgane ins Blut und erreicht schließlich das ZNS. Dort verweilen die Parasiten als Bradyzoiten in sogenannten Zysten. Die Bradyzoiten stellen eine Art Ruhestadium des Parasiten dar und weisen eine sehr geringe Teilungsrate auf. Zur Zystengewinnung wurde eine entsprechende Anzahl NMRI-Mäuse getötet, unter sterilen Bedingungen der Schädel geöffnet und das Gehirn in toto entnommen. Jedes der entnommenen Gehirne wurde mit einem Mörser zerrieben, in 1ml sterilem PBS suspendiert und in einem 15ml-Röhrchen „gepoolt“ auf Eis gelagert. Aus der Gehirnsuspension wurde anschließend durch Zählung der Zysten in 10 $\mu$ l unter dem Mikroskop die Gesamtzahl der in der Suspension enthaltenen Zysten bestimmt. Zu beachten war hierbei ein sehr gewissenhaftes Resuspendieren und Vortexen der Suspension mit sofortigem Abpipettieren der 10 $\mu$ l, da sich die Zysten sehr schnell absetzten. Pro Suspension wurden jeweils mindestens vier mal 10 $\mu$ l von mindestens zwei unabhängigen Untersuchern ausgezählt und zur weiteren Berechnung der Mittelwert aus diesen Zählungen verwendet, um eventuelle individuelle Zählfehler so gering wie möglich zu halten. Für die orale Infektion war eine Konzentration von 100 Zysten pro 0,3ml erforderlich, wofür die Gehirnsuspension gegebenenfalls entsprechend mit PBS verdünnt wurde. Mittels einer Knopfkanüle wurden weibliche C57BL/6-Wildtypmäuse im Alter von 3-5 Monaten mit 100 Zysten *T. gondii* in 0,3ml PBS per Gavage infiziert.

#### **2.4.4 Aufbereitung humaner Faecesproben zur Herstellung mit humaner Flora assoziierter Tiere**

Die frisch abgesetzte Faecesprobe wurde unter dem Lamina-Airflow in ein 500ml Becherglas überführt. Unter Rühren mit einem Stab wurde der Suspension bis zu einem Gesamtvolumen von 300ml eine entsprechende Menge an PBS zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach abgelaufener Sedimentationszeit wurden 30-40ml Überstand der Suspension mittels einer 25ml Pipette vorsichtig in je 5 Falcons (50ml) überführt. Diese wurden erneut bei Raumtemperatur 15 Minuten zum Sedimentieren stehen gelassen, und der Überstand anschließend in 2ml Eppendorf-Tubes aliquottiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Stuhlproben stammten von fünf gesunden erwachsenen Probanden. Das Vorhandensein von enteropathogenen Keimen (z.B. *Salmonellen*, *Shigellen*, *Campylobacter*, *Yersinien*, *C. difficile*, enteropathogene *E. coli*) wurde durch kulturelle Analyse auf entsprechenden Selektivplatten vorab ausgeschlossen.

Vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen der individuellen Faecesproben wurden serielle Verdünnungen angefertigt und auf entsprechende Kulturmedien (Universal- und Selektivkulturplatten) ausplattiert, um eine quantitative komplexe Florenanalyse zu erheben und einen durch die Lagerung bedingten qualitativen bzw. quantitativen Verlust der Bakteriengruppen auszuschließen. Die quantitativen Unterschiede betragen hierbei vor/nach dem Auftauen maximal  $\frac{1}{2}$  logarithmische Stufe, was innerhalb der Maßgenauigkeit der Kultivierungsmethode als akzeptabel erschien.

#### **2.4.5 Aufbereitung muriner Faecesproben zur Herstellung mit muriner Flora assoziierter Tiere**

Zunächst wurden frische Faecesproben von C57BL/10-Wildtypmäußen aus SPF-Haltung gewonnen und in mit 1,5ml sterilem NaCl 0,9% gefüllte Eppendorftubes überführt, mit sterilen Tupfern homogenisiert und zu der der Tierzahl entsprechenden Menge gepoolt. Vor Gavage erfolgte eine quantitative und qualitative Bestandsaufnahme der Bakterienpopulationen in der Suspension mittels Ausplattieren serieller Dilution auf Universal- und Selektivnährmedien zur Erfassung von aeroben grampositiven Kokken (Enterokokken), gramnegativen Stäbchen (Enterobakterien, v.a. *E. coli*), *Lactobacillus* spp. sowie den obligat anaeroben gramnegativen Stäbchen (*Bacteroides/Prevotella* spp.) und grampositiven Stäbchen (*Clostridium/Eubacterium*) Populationen.

## **2.4.6 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse**

Zur Eradizierung der kommensalen Darmflora wurden die Mäuse zunächst in autoklavierte Käfige mit Abdeckhauben transferiert, unter den genannten sterilen Bedingungen gehalten (2.2.3) und über einen Zeitraum von ca. 6-8 Wochen ein Antibiotika-Cocktail, bestehend aus Ciprofloxacin (200mg/l; Bayer Vital), Metronidazol (1g/l; Fresenius), Ampicillin (1g/l; Ratiopharm), Imipenem (250mg/l; MSD) und Vancomycin (500mg/l; Cell Pharm) in sterilem Trinkwasser ad libitum verabreicht. Einmal pro Woche wurden von den Tieren Faecesproben gewonnen, in Thioglykolat-Bouillon (Oxoid) überführt und bei 37°C bebrütet, um die erfolgreiche Eradizierung der Darmflora zu kontrollieren. War in der Folge von drei Wochen im Faeces der Tiere keine kultivierbare Spezies mehr nachweisbar, galten die Tiere als keimfrei und es erfolgte die Rekolonisierung bzw. Infektion der Tiere.

### **2.4.6.1 Rekolonisierung und Infektion gnotobiotischer Mäuse**

Nach erfolgreicher Eradikation der kommensalen Darmflora wurde die Antibiotika-Therapie 2 Tage vor einer weiteren Intervention (Rekolonisierung, Infektion) beendet und durch die Gabe von sterilem Trinkwasser ersetzt.

Die Rekolonisierung der Tiere mit humaner bzw. muriner Flora (2.4.4 bzw. 2.4.5) erfolgte durch Gavage von 0,3ml Suspension an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

Nach 8-tägiger Kompartimentalisierung der entsprechenden Flora im murinen Gastrointestinaltrakt erfolgte die Infektion mit *C. jejuni* B2 an 3 konsekutiven Tagen mittels Gavage wie unter 2.4.1 beschrieben.

Bei Tieren, welche im gnotobiotischen Zustand, ohne Assoziation mit humaner oder muriner Flora, infiziert werden sollten, wurde die Infektion mit dem entsprechenden *C. jejuni*-Stamm bzw. mit *E. coli* wie unter 2.4.1 bzw. 2.4.2.1 beschrieben vorgenommen.

### **2.4.7 Probenentnahme**

Um die *C. jejuni*- oder *E. coli*-Lasten im Verlauf der Infektion qualitativ und quantitativ zu bestimmen, erfolgten regelmässige Faecesentnahmen und eine serielle Verdünnung der Faecesproben auf entsprechenden Kulturmedien. Ebenso wurden zur Analyse der Gastrointestinalflora zu den entsprechenden Zeitpunkten Faecesproben der Tiere asserviert.

Die Tötung der Mäuse erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach Infektion durch CO<sub>2</sub>-Inhalation. Naive Mäuse wurden in einem zu den infizierten Tieren korrelierenden Alter und Geschlecht getötet. Im Anschluss wurden die Tiere in 70% Isopropylalkohol eingetaucht um eine signifikante Keimreduktion des Fells zu erzielen. Danach wurden Brust- und Bauchfell steril eröffnet, Vollblut wurde mittels Herzpunktion gewonnen. Anschließend wurde der Situs durch einen Y-Schnitt des Peritoneums geöffnet und zunächst die Organe makroskopisch beurteilt. Dabei wurde insbesondere auf die Größe der mesenterialen Lymphknoten sowie der Milz geachtet. Der Gastrointestinaltrakt wurde insbesondere hinsichtlich Einblutungen, Stenosen, Wandverdickungen und Stuhlkonsistenz beurteilt. Der Darm wurde danach vom Mesenterium gelöst, der Länge nach ausgebreitet und Dünndarm- sowie Colonlänge gemessen. Des Weiteren wurden Milz, Leber, Nieren und mesenteriale Lymphknoten steril entnommen.

Zur Florenanalyse sowie zum Nachweis der *C. jejuni*- bzw. *E. coli*-Lasten in den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes wurde aus Magen, Doudenum, Ileum und Colon jeweils luminaler Inhalt in ein Eppendorfgefäß, gefüllt mit 1,5ml sterilem 0,9% NaCl, überführt. Bis zum Ende der Probenentnahme wurden die Eppendorftubes auf Eis gelagert. Der Darmabschnitt, aus dem der luminaler Inhalt gewonnen worden war, wurde aufgeschnitten. Mittels eines Streifenfestes wurde der pH-Wert bestimmt. Anschließend wurde das Darmstück gründlich gespült und in PBS auf Eis gelagert. Ein weiteres ca. 0,5cm langes Stück des Ileums und Colons wurde ebenfalls aufgeschnitten, in PBS gespült und in flüssigem Stickstoff gefroren.

Von jedem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes wurde ein Stück in eine Einbettkassette für Histologien gelegt und in 4% Formaldehyd fixiert.

## **2.5 Kulturelle Analysen der Gastrointestinalflora**

### **2.5.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes**

Bei der kulturellen Analyse wurde die Bakterienmenge auf das Gewicht des gewonnenen luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes bezogen. Dazu wurden die mit 1,5ml sterilem NaCl 0,9% gefüllten Eppendorfgefäße vor und nach Zugabe des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes gewogen und die Differenz errechnet.



### 2.5.2 Analyse der Darmflora

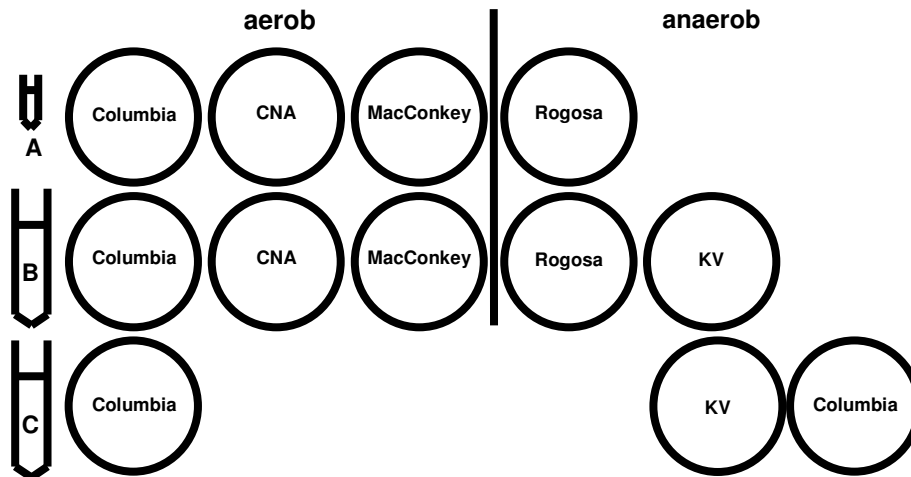
Im Modell der rekolonisierten Gnotobioten wurden zur Feststellung von Unterschieden zwischen der humanen und der murinen Flora qualitative und quantitative Analysen der kultivierbaren Colonflora durchgeführt. Die Analysen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten des Rekolonisierungsmodells. Zunächst wurde die Flora analysiert, mit der die Tiere rekolonisiert wurden. Dies entsprach der Suspension und stellte somit den Zeitpunkt vor Einbringen in den murinen Gastrointestinaltrakt dar. Die nächste Analyse erfolgte nach 8-tägiger Kompartimentalisierung der entsprechenden Flora im murinen Gastrointestinaltrakt, vor Infektion mit *C. jejuni* B2.

Bei der kulturellen Differenzierung und Quantifizierung der mikrobiellen Gastrointestinalflora war zunächst zu beachten, dass weder ein zu geringer Bewuchs, noch eine Überwucherung der Agarplatte eine optimale Auswertung ermöglichte. Daher wurden verschiedene Verdünnungsstufen verwendet. Als optimal für die Analyse der Flora des Gastrointestinaltraktes von mit muriner bzw. mit humaner Flora assoziierten Mäusen erwies sich das Auftragen von unverdünntem Gastrointestinalinhalt, zusammen mit der Verwendung von zwei Verdünnungen um jeweils zwei logarithmische Stufen. Zunächst wurde der in dem Eppendorfgemäß enthaltene Coloninhalt mit einem sterilen Tupfer homogenisiert. Um eine 1:100 Verdünnung zu erhalten, wurden 100µl des Homogenats in ein Falcon Tube, gefüllt mit 9,9ml sterilen 0,9% NaCl, überführt. Aus diesem Falcon Tube wurden wiederum 100µl Inhalt entnommen und in ein weiteres, mit 9,9ml sterilen 0,9% NaCl gefülltes Tube gegeben um eine 1:10000 Verdünnung zu erzeugen.

Die Verwendung der Verdünnungsstufen ermöglichte weiterhin eine interne Qualitätskontrolle, da zwischen den unterschiedlichen Verdünnungsstufen eine Differenz der Keimzahl von zwei logarithmischen Stufen bestehen sollte.

Es wurden jeweils 100µl des unverdünnten Darminhaltes und der entsprechenden Verdünnungsstufen auf die Nährböden aufgebracht und mit einem Glasspatel gleichmäßig ausplattiert. Anschließend erfolgte die aerobe Bebrütung der Columbia-, MacConkey- und Colistin/Nalidixin Säure (CNA)-Agares. Um optimales Wachstum zu erreichen, wurden die Columbia- und CNA-Nährböden bei 37°C bei 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert. Für die MacConkey-Agares war eine Bebrütung bei 37°C und normaler Atmosphäre ausreichend. Die anaerobe Bebrütung der Kanamycin/Vancomycin (KV)-, Rogosa- und weiterer Columbia-Nährböden erfolgte bei 37°C. Um eine sauerstofffreie Atmosphäre zu erzeugen, wurden die Platten in Anaerobiertöpfen überführt und unter der Verwendung des AnaeroGen® Systems

bebrütet. Zur Kontrolle der anaeroben Atmosphäre im Topf wurden spezielle Indikatorstreifen verwendet (AnaeroTest). Abb. 2 zeigt den verwendeten Plattensatz zur kulturellen Analyse der Colonflora der mit muriner bzw. humaner Flora assoziierten Tiere.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der verwendeten Nährböden für die kulturelle Analyse der Colonflora. „A“ ist unverdünnter Organinhalt. „B“ zeigt die 1:100 Verdünnung, „C“ stellt die 1:10000 Verdünnung dar.

### 2.5.3 Analyse aerob wachsender Bakterienspezies

Die Quantifizierung der Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) unterschiedlicher Morphotypen erfolgte nach dem in Tabelle 11 aufgeführten Prinzip.

**Tab. 11:** Quantifizierung der KBE

Gezählte KBE	Notierte KBE
1	$10^1$
10	$10^2$
100	$10^3$
1000	$10^4$
Beginnend konfluierend	$10^5$
Konfluierend	$10^6$
Überwucherung	$>10^6$

Um eine Präzisierung der quantitativen Auswertung zu erzielen, wurden 0,25 logarithmische Abstufungen vorgenommen. Die Begutachtung der aerob bebrüteten Platten erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Bei der Begutachtung nach 24 Stunden wurden die unterschiedlichen Koloniemorphologien dokumentiert und quantifiziert. Fragliche Koloniemorphologien wurden auf Universal- und Selektivnährböden isoliert, um nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung Gramfärbungen, mikrobiologische Differenzierungstests und gegebenenfalls eine Sequenzierung vorzunehmen. Falls bei der Subkultivierung keine Reinkultur angelegt werden konnte, waren zumindest für die Anwendung der Differenzierungssysteme und der Sequenzierung weitere Isolierungen bis zur Reinkultur notwendig. Für die Sequenzierung und Differenzierungstests wurden Subkultivierungen von Columbia-Nährböden verwendet. So konnten nach 48 Stunden aerober Bebrütung Enterobakterien (v.a. *E. coli*), Enterokokken sowie *Lactobacillus* spp. quantifiziert werden.

#### **2.5.4 Analyse obligat anaerob wachsender Bakterienspezies**

Bei der morphologischen Analyse anaerob wachsender Bakterienpopulationen wurde die gleiche Methodik der Quantifizierung (Tabelle 11) verwendet wie für die aerobe Analyse beschrieben. Die Begutachtung der anaeroben Nährböden erfolgte nach 48 Stunden anaerober Bebrütung. Die Quantifizierung von *Lactobacillus* spp. auf Rogosa-Nährböden wurde nach 48 Stunden vorgenommen. Nach 72 Stunden erfolgte die Begutachtung der anaerob bebrüteten KV- und Columbia-Nährböden. Nach Dokumentation und Quantifizierung der Morphotypen wurde fakultativ anaerobes von obligat anaerobem Wachstum differenziert. Dazu wurden repräsentative Morphotypen von einem anaerob inkubierten Nährboden auf zwei Columbia-Nährböden mittels eines fraktionierten Ausstrichs subkultiviert. Eine der Platten wurde aerob, die andere anaerob bebrütet. Die Begutachtung der aerob bebrüteten Platte erfolgte nach 24 und 48 Stunden, die der anaerob bebrüteten nach 48 Stunden Inkubation. Bei obligat anaerobem Wachstum war lediglich auf dem anaerob bebrüteten Nährboden Wachstum zu erkennen. Bei fakultativ anaeroben Bakterienspezies war auf beiden Platten Wachstum zu erkennen. Anschließend konnten von den Subkulturen Gramfärbungen, mikrobielle Differenzierungstests und Sequenzierungen angefertigt werden. Wie bei der aeroben Diagnostik waren Sequenzierungen sowie die Anwendung von Differenzierungssystemen nur bei Reinkulturen möglich. So gelang die Quantifizierung obligat anaerober gramnegativer Stäbchen (*Bacteroides/Prevotella* spp.) und grampositiver Stäbchen (*Clostridium/Eubacterium* spp.).

### 2.5.5 Gramfärbung

Um eine Gramfärbung durchzuführen, wurde zunächst eine repräsentative Kolonie des zu untersuchenden Morphetyps mit einem sterilen Glasstab aufgenommen und auf einen gereinigten Objektträger mit einem Tropfen 0,9% steriler NaCl-Lösung gebracht. Das Präparat wurde luftgetrocknet und für zwei Minuten in Methanol fixiert. Die Gramfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tab. 12: Protokoll der Gramfärbung**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
Gram's crystal violet Solution	2 Minuten
Spülen mit Leitungswasser	kurz
Lugols Lösung	2 Minuten
Spülen mit Leitungswasser	kurz
Ethanol 96%	10-15sek
Spülen mit Leitungswasser	kurz
Gram's safranin Solution	1 Minute
Spülen mit Leitungswasser	kurz

Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und in Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert. Dokumentiert wurde das Färbeverhalten (grampositiv/gramnegativ) sowie die Bakterienform (Kokken/ Stäbchen).

### 2.5.6 Katalase- und Oxidasetest zur mikrobiologischen Differenzierung

Um bereits vor der Sequenzierung Hinweise auf die Bakteriengattung zu erhalten, wurden folgende mikrobiologische Differenzierungstests verwendet:

#### **Katalase-Test:**

Das Enzym Katalase spaltet toxisches Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff. Die Entstehung von Sauerstoff wird durch Bläschenbildung angezeigt. Durch den Katalase-Test wird zum Beispiel eine Differenzierung von Staphylokokken (Katalase positiv) und anderen grampositiven Kokken, wie Enterokokken und Streptokokken (Katalase negativ) möglich. Zur Durchführung wurde eine KBE von einem Nährboden aufgenommen und in einen Tropfen 10% Wasserstoffperoxid gebracht.

### **Oxidase-Test:**

Das Enzym Oxidase führt zu einer Oxidation von Cytochrom. Die Oxidation resultiert in einem Farbumschlag. Zur Durchführung wurde eine KBE auf einen Oxidase-Teststreifen aufgebracht. Eine Oxidase-positive Reaktion wurde durch einen blauvioletten Farbumschlag angezeigt. So wurde z.B. die Differenzierung von *Pseudomonas* spp. (Oxidase positiv) von *Enterobacteriaceae* spp. ermöglicht.

### **2.5.7 Bakterielle Speziesdiagnostik**

Die Spezies der in Reinkultur angelegten Subkulturen wurde durch kommerzielle Differenzierungssysteme oder durch Sequenzierung bestimmt. Die Auswahl erfolgte je nach Fragestellung.

### **2.5.8 Biochemische Leistungsprüfung zur Speziesdiagnostik**

Bei diesen Verfahren mittels kommerziell erhältlichen Apisystemen erfolgt die Speziesdiagnostik durch eine biochemische Leistungsprüfung des jeweiligen Bakteriums. Enzymatische Reaktionen zeigen sich in einem Farbumschlag des Substrates, welcher numerisch kodiert und über entsprechende Bakterienspezies-Bibliotheken zugeordnet werden kann. Um zu bestimmen, welches System verwendet werden sollte, wurden die Ergebnisse der Kulturmorphologie auf den unterschiedlichen Nährböden, der Gramfärbung und der mikrobiologischen Differenzierungstests verwendet.

### **2.5.9 Kultureller Nachweis von *C. jejuni***

Nach Infektion der Tiere mit *C. jejuni* wurde die Erreger-Last zum einen im Infektionsverlauf aus Faeces, zum anderen zum Sektionszeitpunkt entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes kulturell bestimmt. Wie unter 2.5.1 beschrieben, wurde das mit Eppendorfgesäß ohne und mit Darminhalt gewogen. Danach wurde der Inhalt mit einem sterilen Tupfer mit dem PBS homogenisiert. Zur Optimierung der Quantifizierung wurde eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Hierfür wurden 100µl der homogenisierten Probe in 9,9ml steriles NaCl 0,9% gegeben und vermischt. 100µl der Ausgangssuspension bzw. der Verdünnung wurden auf Karmali-Selektivplatten unter Ausnutzung des gesamten Agars ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über 48 Stunden bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen. Anschließend wurde das Wachstum wie für die kulturelle aerobe Analyse beschrieben (2.5.3; Tabelle 11) abgelesen.

### **2.5.10 Kultureller Nachweis von *E. coli***

Zum kulturellen Nachweis von *E. coli* wurde die Faecesprobe bzw. der Gastrointestinalinhalt wie unter 2.5.9 beschrieben homogenisiert und verdünnt. 100µl der Ausgangslösung bzw. der Verdünnung wurden je auf einem Columbia- und MacConkey-Nährboden ausplattiert. Der Columbia-Universalagar wurde mitgeführt, um eine mögliche endogene Hemmung des Wachstums durch den Selektivagar auszuschließen. Die Bebrütung erfolgte über 24 Stunden unter normal atmosphärischen Bedingungen bei 37°C. Anschließend wurden die KBE wie unter 2.5.3 beschrieben quantifiziert. Die Identifizierung von *E. coli* erfolgte anhand der Koloniemorphologie, des Geruchs sowie des Farbindikators auf MacConkey-Agar (Farbumschlag zu Pink bei Laktose-positiven Isolaten, weiß bei Laktose-negativen Isolaten).

### **2.5.11 Bestimmung bakterieller Translokationsraten**

Um eine mögliche bakterielle Translokation von Bakterien zu untersuchen, wurden während der Sektion MLNs, die Milz sowie eine Niere in Thioglycolat-Bouillon gegeben. Von der Leber wurde ein 1 x 1 x 0,5cm großes Stück abgeschnitten und in die Nährlösung überführt, ca. 0,5ml Vollblut wurde mittels kardialer Punktion gewonnen und ebenfalls in Thioglycolat-Bouillon inkubiert. Die Bouillons wurden eine Woche bei 37°C bebrütet. Ein Wachstum von Bakterien, welches sich durch eine Trübung der Bouillon darstellte, wurde durch tägliche visuelle Kontrolle überwacht. Sofern kein bakterielles Wachstum zu beobachten war, wurden die Bouillons nach einer Woche auf zwei Columbia- und einer halben CNA-Platte mittels eines 3-Ösen-Ausstrichs fraktioniert ausgestrichen. Die Bebrütung einer Columbia- sowie der CNA-Platte erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil über 48 Stunden. Begutachtungen wurden nach 24 und 48 Stunden vorgenommen. Die zweite Columbia-Platte wurde anaerob bei 37°C über 48 Stunden bebrütet. Die anaerobe Atmosphäre wurde mittels eines AnaeroGen<sup>®</sup>-Systems erzeugt und mithilfe von AnaeroTest Indikatorstreifen überprüft. Die Begutachtung der anaerob bebrüteten Agares erfolgte nach 48 Stunden.

Bei *C. jejuni*-infizierten Tieren wurden die Nährlösungen zusätzlich auf eine Karmalplatte ausgestrichen, die unter mikroaerophilen Bedingungen (CampyGen) bei 37°C über 48 Stunden bebrütet wurde.

Bei Eintrüben der Bouillons wurden diese direkt auf einen erweiterten Plattensatz, bestehend aus einer MacConkey-, MRS- und KV-Platte fraktioniert ausgestrichen. MRS- und KV-Agar wurden unter anaeroben Bedingungen, wie oben beschrieben, bebrütet. Die Bebrütung der MacConkey-Platten erfolgte bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen über 48 Stunden.

Anhand mikrobiologischer Methoden (Koloniemorphologie, Mikroskopie, mikrobiologische Tests und Identifizierungssysteme) wurden die jeweiligen Bakterienspezies bestimmt.

Eine Quantifizierung war mit dieser Methode nicht möglich, da es sich bei den Bouillons um Anreicherungsmedien handelt, wodurch ausschließlich beantwortet werden kann, ob sich in den untersuchten Organen lebende Bakterien befanden oder nicht.

## **2.6 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes**

### **2.6.1 Herstellung histologischer Präparate**

Bei der Probenentnahme wurden die entnommenen Gastrointestinalabschnitte in Einbettkassetten für Histologien gelegt und in 4% Formaldehyd fixiert. Die Paraffin-Einbettung erfolgte im Institut für Pathologie der Charité, CBF. Die Fixative wurden gründlich mit Aqua dest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend erfolgte die Entfettung und Entalkoholisierung mit Xylol und Methylbenzoat sowie die Einbettung in Paraffin. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden von den Paraffinblöcken 4-5µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Obekträger überführt und über Nacht bei 60°C getrocknet und fixiert.

### **2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Für die histopathologische Beurteilung erfolgte die Anfärbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Dazu wurde eine 2 mal 5minütige Entparaffinisierung in Xylol sowie anschließende Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96%, 80% und 70% Ethanol) vorgenommen. Nach Waschen in Aqua dest. erfolgte die drei Minuten dauernde Färbung mit Hämatoxylin. Das Präparat wurde erneut gewaschen, in 1% Salzsäure (HCl) getaucht, wieder gewaschen und anschließend über fünf Minuten in Leitungswasser gespült. Es folgte ein weiterer Waschvorgang in Aqua dest. und die 30-60 Sekunden dauernde Färbung mit Eosin. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Xylol behandelt. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt und auf diese Weise haltbar gemacht.

### **2.6.3 Auswertung der histologischen Präparate**

Die HE-gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop unter 100-400facher Vergrößerung beurteilt und anhand des OVA-Colitis-„Score“ bewertet (Tabelle 13).

**Tab. 13: OVA-Score**

<b>Punktwert</b>	<b>Morphologisches Merkmal</b>
0	Keine Veränderungen
1	Einzelne, isolierte Zellinfiltrate in der Mukosa, keine Epithelhyperplasie
2	Wenige verstreute bis diffuse Zellinfiltrate in Mukosa und Submukosa, schwache Epithelhyperplasie, beginnender Verlust von Becherzellen
3	Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und häufig transmural, Epithelhyperplasie, Verlust von Becherzellen
4	Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und häufig transmural, schwere Entzündung, Verlust von Becherzellen und Krypten, schwere Epithelhyperplasie

---

Um eine genauere Beurteilung vornehmen zu können, wurden die Punkte in 0,25er Schritten unterteilt vergeben. Ausschlaggebend war jeweils die ausgeprägteste Läsion des Gewebeschnittes. Die Bewertung erfolgte durch drei unabhängige Gutachter. In die Auswertung floß der Mittelwert der drei Bewertungen ein.

#### **2.6.4 Herstellung und Beurteilung immunhistochemischer Schnitte**

Durch die Immunhistochemie können bestimmte Moleküle mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert und *in situ* sichtbar gemacht werden. Nach Anfertigung der Paraffinschnitte wie unter 2.6.1 beschrieben, wurden die Schnitte entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend erfolgte eine Epitop-Demaskierung in Citratpuffer (pH 6) im Schnellkochtopf. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit dem Primärantikörper gegen Caspase3, Ki67, CD3, MPO7 oder B220 inkubiert. Die Präparate für die Foxp3-Färbung wurden zunächst zur Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt und anschließend ebenfalls mit dem Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus dem Esel oder ein Anti-Ratte-Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Als tertiärer, Enzym-tragender Komplex wurde mit Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase bzw. im Falle von Foxp3 die Envision Peroxidase Anti-Kaninchen verwendet. Die Peroxidase wurde mittels Diaminobenzidin bzw. mit Fast Red als Chromogen detektiert und visualisiert.

Durch Zählen positiver Zellen in sechs repräsentativen Colonabschnitten in 400facher Vergrößerung und Mittelwertbildung erfolgte die Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl der Immunzellen pro Gesichtsfeld. Die immunhistochemischen Färbungen entstanden in



Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

## **2.7 Zytokin- und Proteinmessungen**

### **2.7.1 Zytokinbestimmung aus Organkulturüberständen des Colons**

Für die Zytokinmessungen wurde ein 1cm langes Stück Colon zunächst aufgeschnitten. Um vorhandenen Coloninhalt zu entfernen, folgte eine gründliche Spülung des Organstückes in PBS. Bis zur Verarbeitung wurde das Organstück in PBS auf Eis gelagert. Nach Überführen in RPMI/0,01% Penicillin/Streptomycin wurde das Colonstück über 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde entnommen, bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert und das Colonstück gewogen. Mit Hilfe der im Folgenden (2.7.2 - 2.7.5) beschriebenen Methoden wurden die Organkulturüberstände des Colons untersucht. Die Normalisierung der gemessenen Parameter erfolgte über Bezug auf Proteingehalt oder Organgewicht.

### **2.7.2 Cytometric Bead Array (CBA)**

Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-10 wurde mit dem CBA Mouse Inflammation Kit der Firma BD laut Protokoll vorgenommen. Das Kit enthält 6 verschiedene Gruppen von „Beads“, welche mit Antikörpern versehen sind, die jeweils gegen eines der vorgenannten Zytokine gerichtet sind. Die „Beads“, die Proben sowie detektierende Antikörper, welche mit Phycoerythrin (PE) konjugiert sind, wurden gemeinsam inkubiert, was zur Formung von Sandwich-Komplexen führte. Diese wurden mit dem FACS-Canto durchflusszytometrisch erfasst. Eine für die jeweilige Gruppe spezifische Fluoreszenz-Intensität diente zur Unterscheidung der verschiedenen „Beads“.

### **2.7.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-22 wurde das Quantikine Mouse/Rat IL-22 Kit von R&D Systems gemäß Protokoll verwendet. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit polyklonalem Maus/Ratte anti-IL-22-Antikörper versehen. Standard, Kontrolle und die Organkulturüberstände des entsprechenden Colonstückes wurden in die Vertiefungen pipettiert und im Folgenden vorhandenes IL-22 vom Antikörper gebunden. Danach wurde ein mit einem Enzym verbundener Antikörper gegen IL-22 zugegeben. Ein Substrat wurde hinzugefügt und vom gebundenen

Enzym umgesetzt. Die Menge von IL-22 wurde über die optische Dichte des umgesetzten Substrates anhand einer Standardkurve bestimmt.

#### **2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Colon-Organkulturüberstände erfolgte mittels der Trichloressigsäure (TCA)-Fällung. Dabei wurden zu 35µl Überstand 100µl 37% HCl und 25µl 20% TCA gegeben. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurde die entstandene Trübung bei 405nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer von Bovinem Serum Albumin (BSA) ausgehenden Standardkurve.

#### **2.7.5 Bestimmung der Konzentration von Stickstoffmonoxid**

Die Bestimmung der Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentration wurde mithilfe der Griess-Reaktion durchgeführt. Auf Grund der geringen Halbwertszeit von NO erfolgte der Nachweis über das Stoffwechselprodukt Nitrit. Für die Bestimmung wurden 3g Sulfanilamid in 18ml Phosphorsäure gegeben und mit 300ml Aqua dest. gemischt. Es folgte die Zugabe von 300mg N-(1-naphtyl) ethylenediamin gelöst in 300ml Aqua dest.. 50µl dieses Griess-Reagenz wurden zu 50µl Colonkultur-Überstand in eine Mikrotiterplatte gegeben. Durch Reaktion von N-(1-naphtyl) ethylenediamin mit dem im Organkulturüberstand vorhandenen Nitrit kam es zur Bildung eines Azofarbstoffes, dessen Absorption bei 550nm gemessen wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer von Natriumnitrit ausgehenden Standardkurve.

### **2.8 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.8.1 RNA-Extraktion aus Colongewebe**

Die RNA-Extraktion wurde dem Protokoll folgend mittels des peqGold Total RNA Kit vorgenommen. Dafür wurden Colonstücke, welche während der Probenentnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert worden waren, verwendet. Für die RNA-Isolierung wurden die Colonstücke mithilfe von „Bashing Beads“ der Firma Zymo Research zerkleinert und homogenisiert. RNasen wurden inaktiviert. Das Lysat wurde über eine DNA-Säule laufen gelassen, wodurch genomische DNA gebunden wurde. Die Probe lief über eine weitere Säule, in der die RNA an die Säulen-Membran band. Nach mehreren

Waschschritten zur Entfernung von Kontaminanten wurde die RNA in 40µl RNase-freiem Aqua bidest. eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.8.2 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA-Bestimmung

Die aus dem Colon gewonnene RNA wurde mit dem SuperScript™ III Platinum<sup>R</sup> One-Step Quantitative-PCR System laut Protokoll in cDNA umgeschrieben und im LightCycler analysiert. Dafür wurden 1µl RNA-Template mit 5µl 2fachem Puffer, je 0,5µl BSA, Primermix, Sonde FI und Sonde LC sowie 0,25µl MgCl<sub>2</sub>, 0,4µl Enzymmix und 1,35µl Aqua dest. in einer Glaskapillare vermischt und im LightCycler analysiert. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Tabelle 14 zeigt die Bedingungen des RT-PCR-Ablaufs.

**Tab. 14: Reaktionsbedingungen der RT-PCR**

	HPRT	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL18	Muc2	IL23p19	IL6	IL22
Reverse Transkription	30min	30min	30min	30min	30min	30min	30min	30min
	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	55°C	55°C
Initiale Denaturierung	2min	2min	2min	2min	2min	2min	2min	2min
	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Denaturierung	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek
	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Bindung der Oligonukleotide	7sek	10sek	10sek	10sek	10sek	7sek	7sek	8sek
	58°C	59°C	60°C	57°C	55°C	58°C	59°C	58°C
Strangverlängerung	10sek	9sek	7sek	9sek	7sek	5sek	10sek	5sek
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C

Die Denaturierung, Bindung der Oligonukleotide und Strangverlängerung wurden in 45 Zyklen durchgeführt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte am Ende eines jeden Zyklus.

Die Auswertung wurde nach der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung mit Effizienz-Korrektur durchgeführt. Als Kalibrator diente Darmgewebe einer mit 100 *Toxoplasma gondii*-Zysten infizierten, präfinal sezierten Maus. Da sich die Menge des verwendeten Ausgangsmaterials unterschied, wurden die relativen Mengen auf die RNA-Expression des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) „Housekeeping“ Gens bezogen. Die Bestimmung des „Crossing-Point“ erfolgte durch die Software RelQuant.

### **2.8.3 DNA-Extraktion aus Mausgewebe**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen laut Protokoll. Hierbei wurden die Schwanzspitzen der Mäuse mittels Proteinase K lysiert und die freigesetzte DNA an die QIAmp Membran gebunden. Nach 2maligem Waschen wurde die DNA in 50µl Aqua dest. eluiert und für die PCR verwendet.

### **2.8.4 Genotypisierung der Mäuse**

Zur Überprüfung der IL-10-, TLR2- und TLR4-Defizienz erfolgte die Amplifikation der aus den Schwanzspitzen extrahierten DNA (2.8.3) mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Mit dem Ziel, eine Heterozygotie auszuschließen, wurden sowohl die Mutation als auch die Wildtypvariante überprüft.

Zur Überprüfung der IL-10-Mutation wurden die Primer IL-10 L (forward), IL-10 R (reverse) sowie IL-10 neo r (reverse) verwendet, um ein 1000 Basenpaare (bp) umfassendes Genfragment zu amplifizieren. 1µl der Template-DNA wurden mit 0,25µl jedes Primers, 2,5µl MgCl<sub>2</sub>, 0,25µl BSA, 0,5µl Nukleotiden, 0,25µl Taq-Polymerase, 2,5µl 10-fach Puffer und 17,5µl Aqua dest. gemischt. Die Konditionen der IL-10-PCR erfolgten wie in Tabelle 15 beschrieben.

Die Überprüfung der TLR2-Mutation erfolgte, abgesehen von Template-DNA und Primern, mit den gleichen Reagenzien und Mengen wie im IL-10-Reaktionsansatz. Die Menge der Template-DNA wurde verdoppelt. Die Primer TLR2-common (forward) und TLR2-wt bzw. -mut. (reverse) wurden zur Amplifizierung eines 334bp umfassenden Fragments verwendet. Tabelle 15 zeigt die Reaktionsbedingungen der TLR2-PCR.

Für die Durchführung der TLR4-PCR wurden im Reaktionsansatz der IL-10-PCR identische Mengen verwendet. Abgesehen von den Primern und der Template-DNA wurden die gleichen Reagenzien benutzt. Im Ansatz zur Überprüfung der Mutation wurden TLR4 Cr 1 sense und TLR4 Cr 1 antisense Primer verwendet. Das Wildtyp-Gen wurde über die Primer TLR4 Ex sense und TLR4 Ex antisense amplifiziert. Die TLR4-PCR wurde unter den in Tabelle 15 dargestellten Konditionen durchgeführt.

**Tab. 15: Reaktionsbedingungen der PCR zur Genotypisierung**

	<b>IL10</b>	<b>TLR2</b>	<b>TLR4 Wt</b>	<b>TLR4 Mut</b>
Initiale	5min	3min	30sek	30sek
Denaturierung	95°C	95°C	94°C	94°C
Denaturierung	45sek	30sek	20sek	20sek
	95°C	94°C	94°C	94°C
Anlagerung	45sek	1min	1min	1min
der Oligonukleotide	63°C	65°C	68°C	50°C
Strangvelängerung	1min	1min	1min	1min
	72°C	72°C	72°C	72°C
Finale	5min	10min	7min	7min
Strangverlängerung	72°C	72°C	72°C	72°C
Zyklen	40	40	35	35

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% (IL-10), 2% (TLR-2) oder 3% (TLR-4) Agarose-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Aqua dest. verwendet. Zur Herstellung des Geles wurden 100ml 1x TBE-Puffer mit 1,5–3g Agarose gemischt und bis zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 1µl (10mg/ml) Ethidiumbromid wurde die Flüssigkeit zum Aushärten in eine Form gegossen.

Die DNA wurde im Verhältnis 1:1 mit Agarose-Gel-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Um die Größe der Reaktionsprodukte vergleichen zu können, wurde ein Standard in Form eines 50- und 100-bp-„Ladders“ aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer in 1x TBE über 30 Minuten bei 130 Volt. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid, welches sich in die DNA einlagert, war es möglich die DNA unter UV-Licht als Bande sichtbar zu machen. Abschließend wurde das Gel abfotografiert.

## 2.9 Statistische Analysen, Software

Graphische Darstellungen: GraphPad Prism 5.0a, GraphPad Software, LaJolla, USA  
 ELISA-Auswertung: SERION Evaluate, Virion, Rüslikon, Schweiz  
 LightCycler Software: Relquant 1.0, Roche Molecular Biochemicals, Basel, Schweiz

Dargestellt sind der Mittelwert bzw. Median. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's-t-Test berechnet. Für die statistische Auswertung der kulturellen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Signifikanzniveaus sind mit Sternen gekennzeichnet:

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Rolle der bakteriellen Darmflora bei der *C. jejuni*-Enteritis im Mausmodell

##### 3.1.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei Wildtypmäusen mit konventioneller Flora

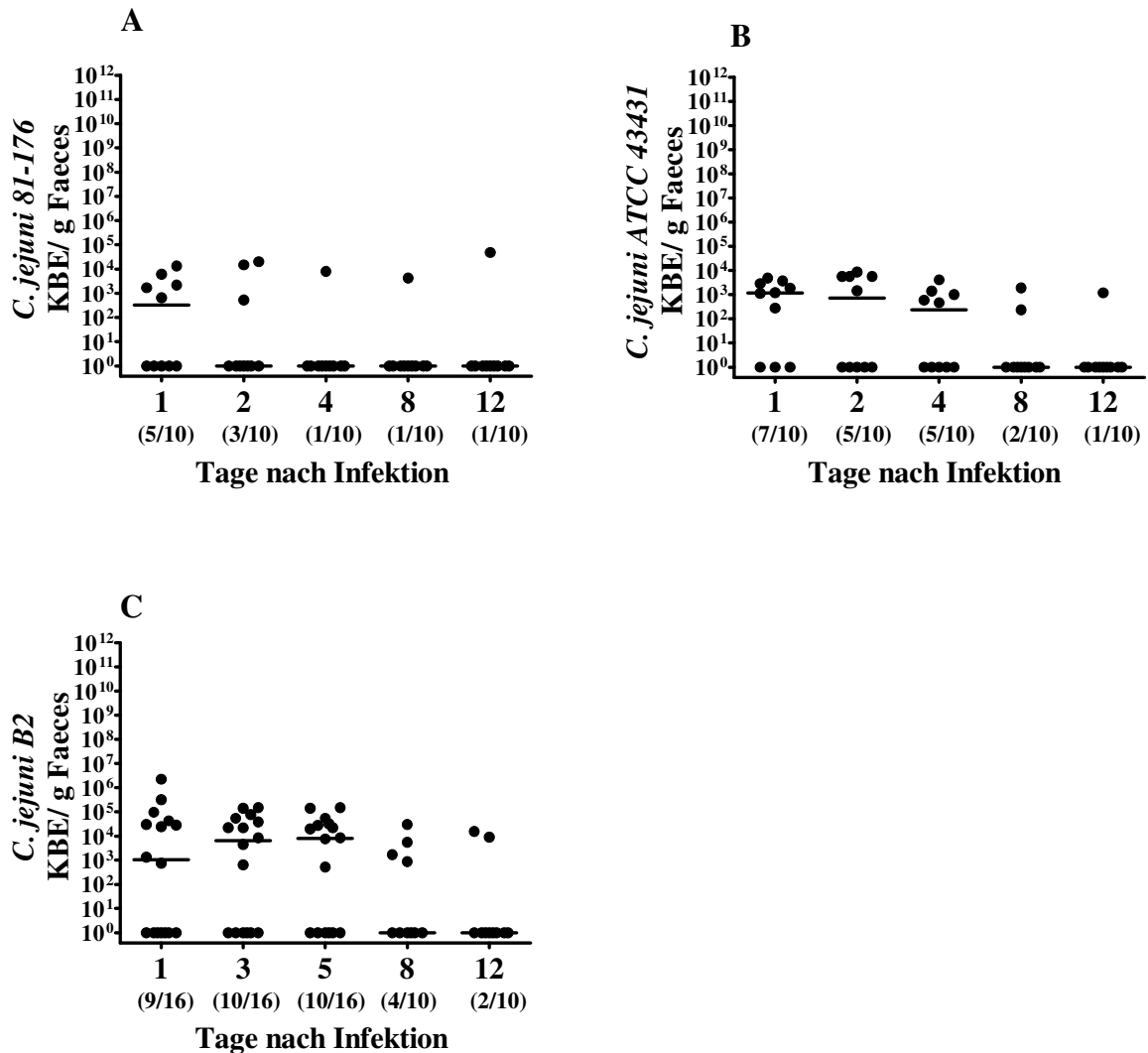
Um das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei Mäusen mit konventioneller Flora zu untersuchen, wurden C57BL/6-Wildtypiere mit drei unterschiedlichen *C. jejuni*-Stämmen infiziert. Die *C. jejuni*-Last wurde zu definierten Zeitpunkten nach der letzten von drei konsekutiven peroralen Infektionen mittels kultureller Methoden bestimmt.

Bei Tieren, welche mit dem Stamm *C. jejuni* 81-176 infiziert worden waren, wurde 1 Tag nach der letzten Infektion bei lediglich 50 % der Tiere *C. jejuni* 81-176 im Faeces nachgewiesen (Abb. 3A). Von diesem Zeitpunkt ausgehend, war eine starke Abnahme der *C. jejuni* 81-176-Last zu beobachten. Ab Tag 4 nach Infektion konnte bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nur noch bei einem von zehn infizierten Tieren *C. jejuni* 81-176 im Faeces nachgewiesen werden.

In der Gruppe der *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tiere gelang 1 Tag nach der letzten Infektion der kulturelle Nachweis in 70 % der Fälle mit einer Last von  $1,2 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$  KBE/g im Median (Abb. 3B). Im zeitlichen Verlauf war die *C. jejuni* ATCC 43431-Last weiterhin rückläufig. An Tag 12 nach Infektion war bei einem von zehn infizierten Tieren *C. jejuni* ATCC 43431 nachweisbar ( $1,2 \times 10^3$  KBE/g).

In der Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *C. jejuni* B2 war 1 Tag nach der letzten Infektion bei ca. 56,3 % der Tiere eine Besiedlung nachweisbar (Abb. 3C). Im zeitlichen Verlauf konnte eine deutliche Abnahme der *C. jejuni* B2-Last beobachtet werden. Am Ende des Untersuchungszeitraumes konnte *C. jejuni* B2 nur noch bei 20 % der Tiere nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd ließ sich festhalten, dass keiner der drei untersuchten *C. jejuni*-Stämme bei Wildtypieren mit SPF-Flora dauerhaft kolonisieren konnte.



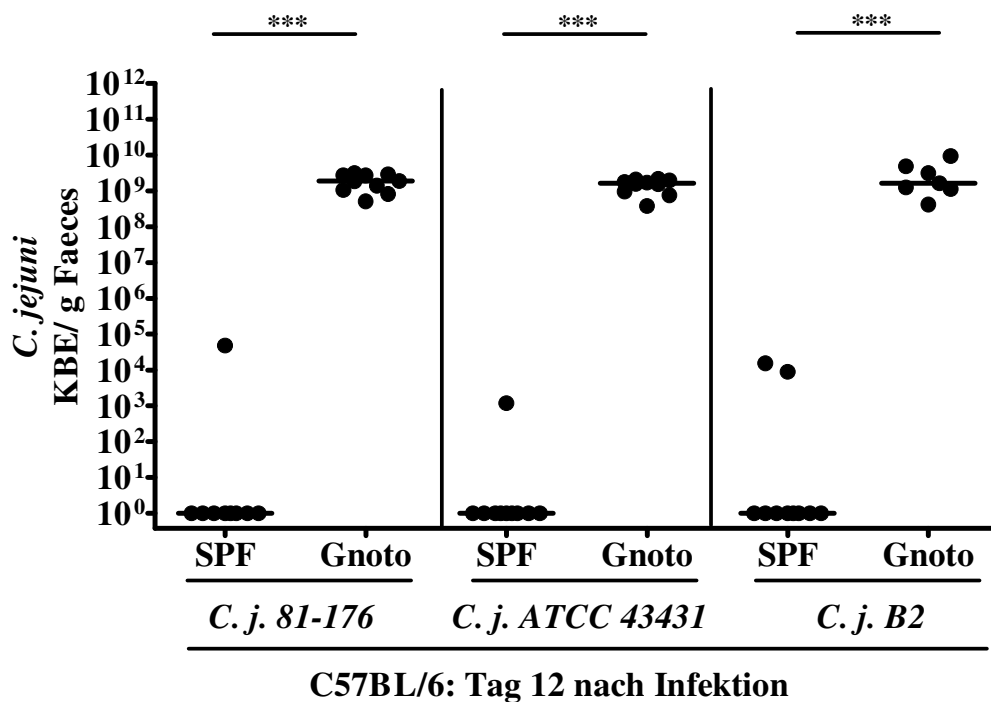
**Abb. 3: Kinetik der *C. jejuni*-Lasten bei C57/BL6-Wildtypmieren.** Gezeigt sind die *C. jejuni*-Lasten und der jeweilige Median von individuellen Tieren, welche mit *C. jejuni* 81-176 (A), *C. jejuni* ATCC 43431 (B) oder *C. jejuni* B2 (C) infiziert wurden. Die Anzahl der positiven Nachweise im zeitlichen Verlauf sowie die Anzahl der untersuchten Tiere sind in Klammern angegeben. Balken symbolisieren den Median.

### 3.1.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtypmieren

Durch die Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *C. jejuni* bei Wildtypmieren mit konventioneller Flora konnte anhand von drei unterschiedlichen *C. jejuni*-Stämmen gezeigt werden, dass diese Tiere eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* aufwiesen. Um die Bedeutung der kommensalen Darmflora für die beobachtete Kolonisationsresistenz zu verifizieren, wurde im Folgenden das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* in gnotobiotischen C57/BL6- sowie C57/BL10-Wildtypmäusen untersucht. Bei diesen Tieren wurde

mittels 5-facher antibiotischer Behandlung über 6-8 Wochen die komplette Darmflora eradiziert. Im Gegensatz zu von Geburt an keimfreien Mäusen handelte es sich hierbei um Tiere, die ein vollständig entwickeltes Immunsystem aufwiesen.

Analog zu den Untersuchungen bei Tieren desselben Genotyps mit SPF-Flora erfolgte die Bestimmung der *C. jejuni*-Lasten zu definierten Zeitpunkten bis Tag 12 nach der letzten Infektion. Abbildung 4 zeigt die kulturell erhobenen *C. jejuni*-Lasten im Faeces an Tag 12 von Tieren, welche mit *C. jejuni* 81-176, *C. jejuni* ATCC 43431 oder *C. jejuni* B2 infiziert worden waren. Während bei konventionell besiedelten Tieren an Tag 12 ein deutlicher Abfall der *C. jejuni*-Last unter die Nachweisgrenze zu beobachten war, kam es bei allen untersuchten *C. jejuni*-Stämmen im Colon gnotobiotischer Mäuse zu einer stabilen Kolonisierung, welche signifikant gegenüber dem Kolonisierungsniveau bei konventionell besiedelten Tieren war (Abb. 4; alle  $p < 0.0005$ ).

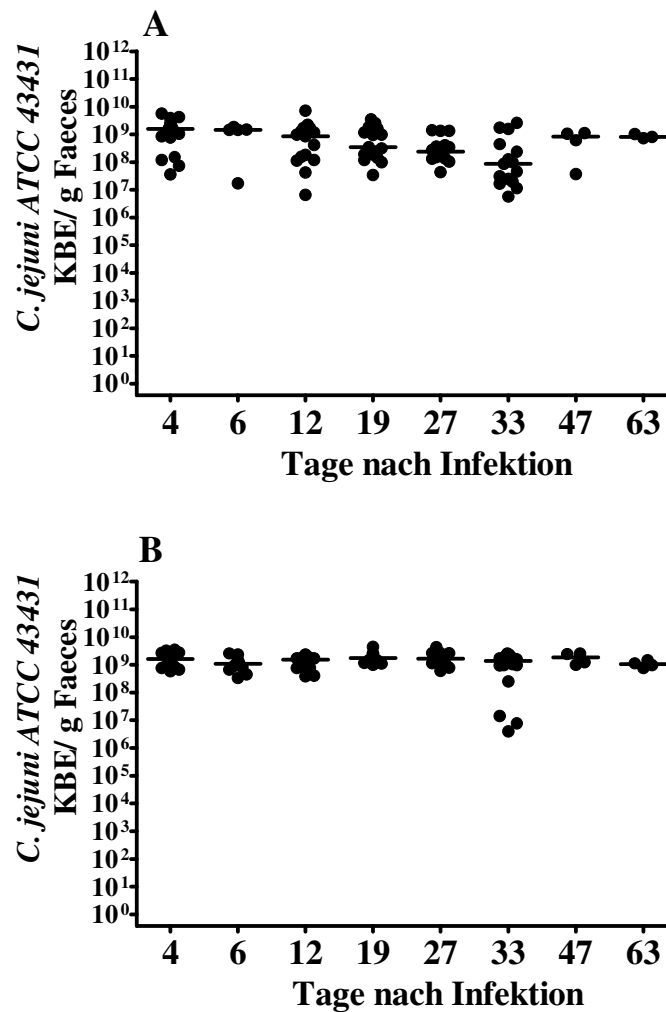


**Abb. 4: *C. jejuni*-Lasten an Tag 12 p.i. SPF vs. Gnotobioten:** *C. jejuni*-Lasten bei C57BL/6-Wildtyp-tieren mit SPF-Flora (SPF) und gnotobiotischen (Gnoto) Tieren. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).



### 3.1.2.1 Langzeit-Kinetik der *C. jejuni*-Last bei gnotobiotischen C57BL/10- und C57BL/6-Wildtyptieren

Mit dem Ziel, die Kinetik der *C. jejuni*-Besiedlung bei gnotobiotischen Tieren über den bislang betrachteten Zeitraum von 12 Tagen hinaus zu untersuchen, wurde eine Langzeitkinetik über 63 Tage durchgeführt. C57BL/10- sowie C57BL/6-Wildtyptiere wurden nach antibiotischer Behandlung an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert. Es folgten regelmäßige Faecesentnahmen zur Bestimmung der *C. jejuni* ATCC 43431-Last. Über den Zeitraum von 7 Wochen konnte, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse, eine stabile Kolonisierung beobachtet werden (Abb. 5). C57BL/10-Wildtyptiere hatten im Infektionsverlauf *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten zwischen  $8,6 \times 10^7 \pm 7,93 \times 10^8$  KBE/g und  $1,6 \times 10^9 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/g Faeces, bei C57BL/6-Wildtyptieren wurden zwischen  $1,1 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^8$  KBE/g und  $1,83 \times 10^9 \pm 6,9 \times 10^8$  KBE/g nachgewiesen.



**Abb. 5:** Kinetik der *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten bei gnotobiotischen C57BL/10-Wildtyptieren (A) und gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren (B). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der *C. jejuni*-Lasten nach drei konsekutiven peroralen Infektionen. Balken symbolisieren den Median. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

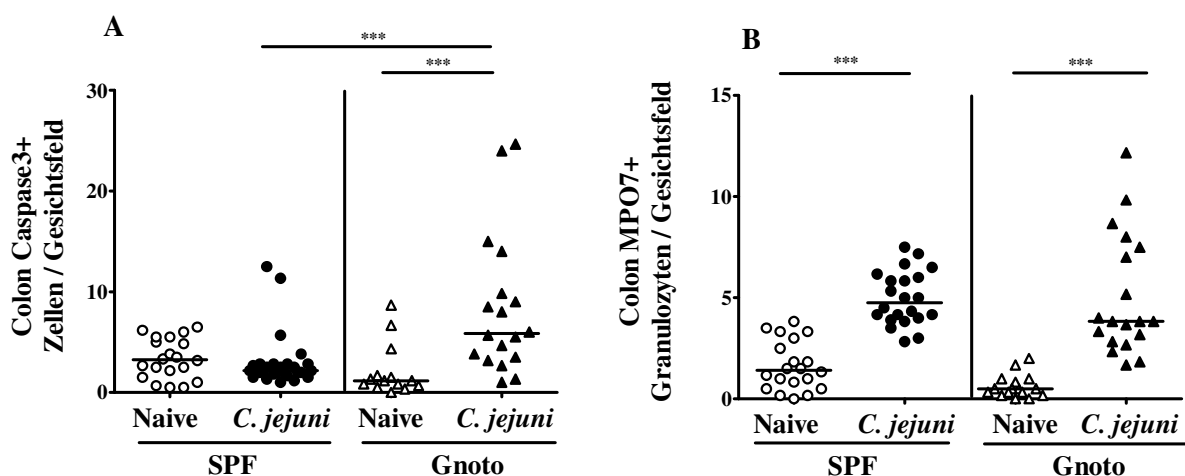
### 3.1.2.2 Analyse immunhistochemischer Parameter bei Gnotobioten

Bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren war ein stabiles Kolonisieren von *C. jejuni* zu beobachten. Zur Untersuchung *C. jejuni*-vermittelter Immunantworten erfolgten *in situ* immunhistochemische Untersuchungen des Colons an Tag 12 nach der letzten Infektion. Zusätzlich zu naiven gnotobiotischen Kontrolltieren wurden die *in situ* immunhistochemischen Untersuchungen bei naiven sowie infizierten Tieren desselben Genotyps mit SPF-Flora durchgeführt.

#### 3.1.2.2.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten

Caspase3 stellt das Effektormolekül der Apoptose dar. Bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren konnte an Tag 12 nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 ein signifikanter Anstieg Caspase3-positiver Zellen im Colon, im Vergleich zu nicht infizierten gnotobiotischen Tieren sowie infizierten Tieren mit SPF-Flora beobachtet werden (beide  $p < 0,0005$ ; Abb. 6A).

Myeloperoxidase 7 (MPO7) wird von myeloiden Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise neutrophilen Granulozyten, produziert. MPO7 ist ein wichtiger Marker für das Vorhandensein von Effektorzellen im Rahmen inflammatorischer Reaktionen. Die Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 führte bei gnotobiotischen Tieren wie auch bei Tieren mit SPF-Flora zu einem signifikanten Anstieg MPO7-positiver Zellen im Colon (beide  $p < 0,0005$ ; Abb. 6B).



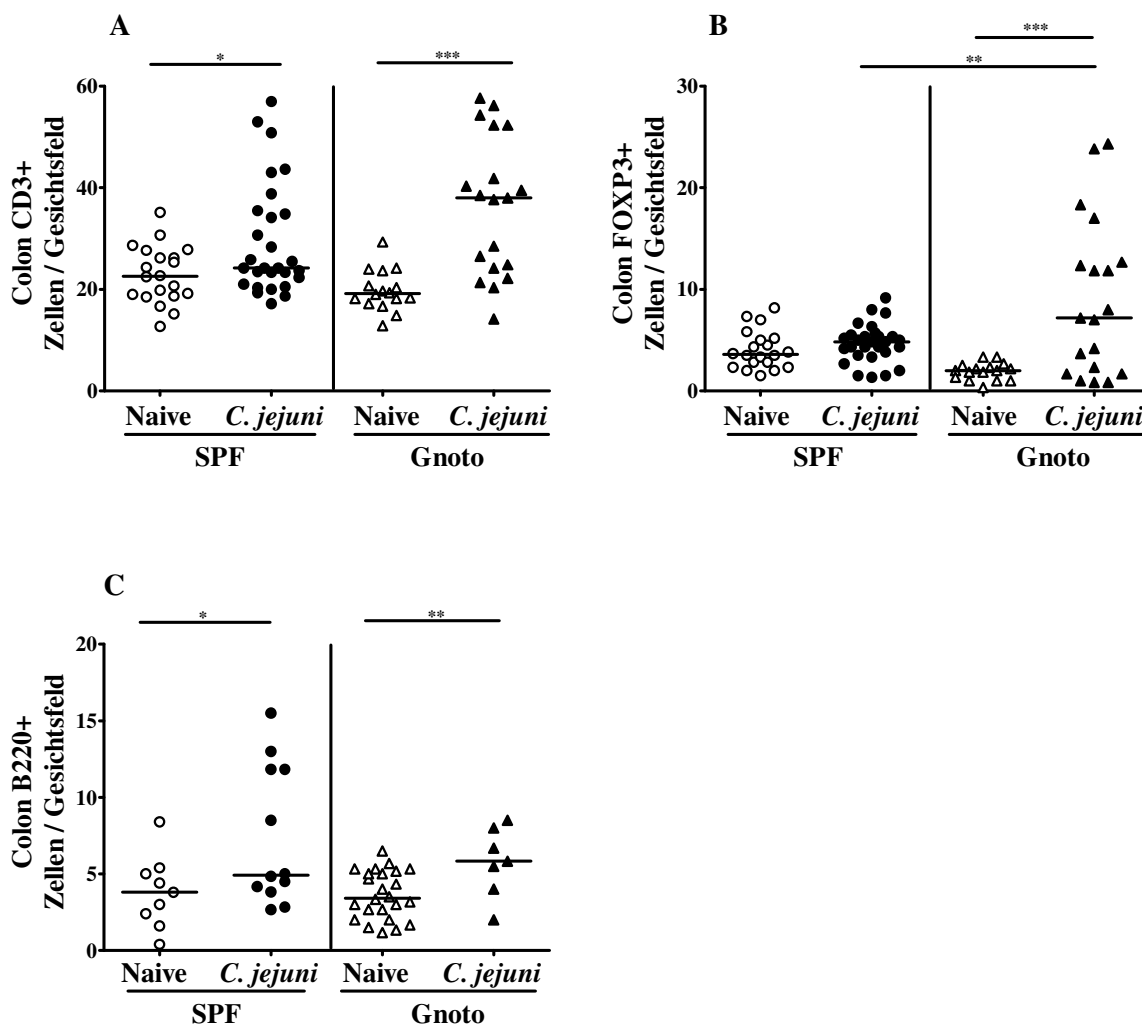
**Abb. 6: Apoptotische Zellen (Caspase3-positiv - A) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv - B) bei C57BL/6-Wildtyptieren.** Gezeigt sind apoptotische Zellen (A) und neutrophile Granulozyten (B) im Colon gnotobiotischer (Gnoto) C57BL/6-Wildtyptiere sowie bei Tieren mit SPF-Flora (SPF). Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere an Tag 12 nach der letzten Infektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren die Mittelwerte. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.2.2.2 T-Zellen und regulatorische T-Zellen und B-Zellen

Da es sich bei der *Campylobacter*-Enteritis um eine T-Zell-vermittelte Entzündung handelt wurden im folgenden CD3-positive T-Zellen im Colon bestimmt. Die Infektion mit *C. jejuni ATCC 43431* führte an d12 p.i. sowohl bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren als auch bei Tieren mit SPF-Flora im Vergleich zu naiven Tieren des entsprechenden Besiedlungszustands zu einem signifikanten Anstieg CD3-positiver T-Zellen. Hierbei war der zu beobachtende Unterschied des Anstiegs unter gnotobiotischen Tieren deutlich ausgeprägter als unter Tieren mit SPF-Flora (Abb. 7A;  $p < 0,0005$  und  $p < 0,05$ ).

Foxp3 gilt als Marker für regulatorische T-Zellen. Die Infektion gnotobiotischer Tiere mit *C. jejuni ATCC 43431* führte zu einem signifikanten Anstieg Foxp3-positiver regulatorischer T-Zellen im Colon *in situ* (Abb. 7B;  $p < 0,001$ ). Dieser Anstieg war signifikant stärker ausgeprägt als bei infizierten Tieren mit SPF-Flora ( $p < 0,01$ ).

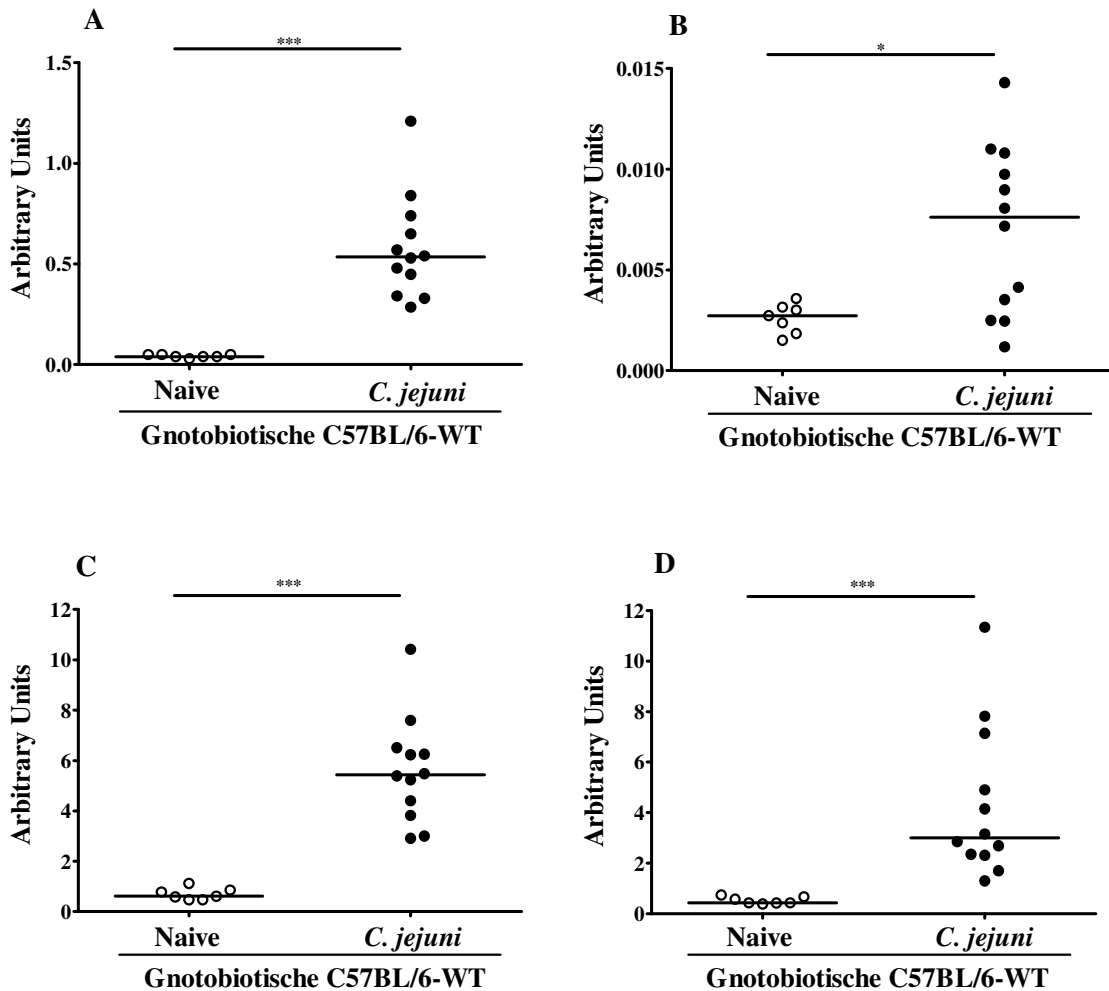
Hinsichtlich der Population B220-positiver B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *C. jejuni ATCC 43431* bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren sowie bei Tieren mit SPF-Flora zu einem, im Vergleich zu den entsprechenden naiven Gruppen, diskreten aber signifikanten Anstieg führte (Abb. 7C;  $p < 0,01$  und  $p < 0,05$ ).



**Abb. 7: T-Zellen (A), regulatorische T-Zellen (B) und B-Zellen (C) bei gnotobiotischen und SPF-C57BL/6-Wildtypmäußen.** Gezeigt sind T-Zellen (CD3-positiv - A) und regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) sowie B-Zellen (B220-positiv - C) bei naiven und *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tieren an Tag 12 nach der letzten Infektion. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren die Mittelwerte. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.2.3 mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon gnotobiotischer Mäuse

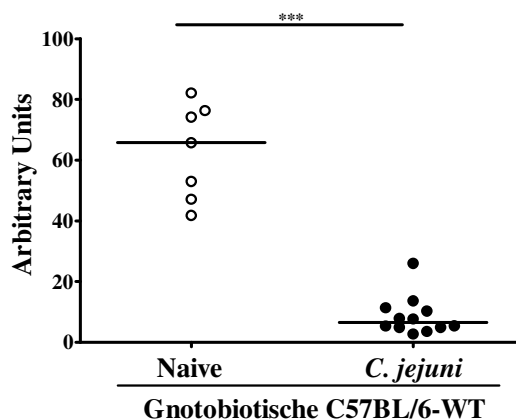
Die Messung der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon bei infizierten und naiven gnotobiotischen C57BL/6/10-Wildtypmäußen ergab signifikante Unterschiede. An Tag 40 nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 waren signifikant höhere mRNA-Expressionen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18 und IL-23p19 nachweisbar (Abb. 8).



**Abb. 8: mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon an d40 p.i..** Dargestellt sind die mRNA-Expressionen von TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-18 (C) und IL-23p19 (D). Offene Symbole stehen für naive gnotobiotische C57BL6-Wildtypiere, geschlossene Symbole für *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere. Balken symbolisieren die Mittelwerte. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.2.4 MUC2 mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer Mäuse

Hinsichtlich der mRNA-Expression von MUC2 im Colon konnte nach Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 ein signifikanter Abfall beobachtet werden (Abb. 9;  $p < 0,005$ ).



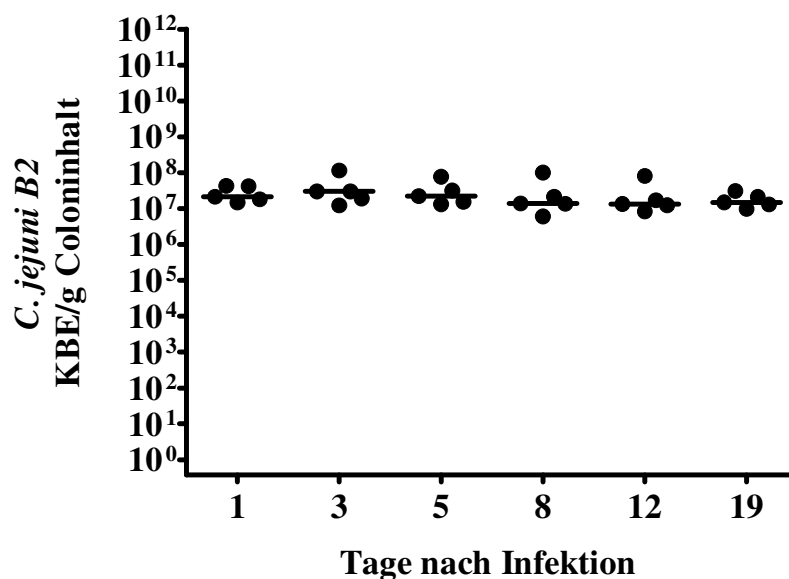
**Abb. 9: MUC2 mRNA-Expression im Colon an d40 p.i.** Dargestellt sind die mRNA-Expressionen von MUC2. Offene Symbole stehen für naive gnotobiotische C57BL6-Wildtypmäuse, geschlossene Symbole für *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere. Balken symbolisieren die Mittelwerte. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.3 Rekolonisierung gnotobiotischer C57BL/6-Wildtypmäuse

Die stabile Kolonisierung von *C. jejuni* bei gnotobiotischen Tieren deutete darauf hin, dass die kommensale murine Darmflora eine entscheidende Rolle für die Kolonisationsresistenz spielte. Im Folgenden wurden C57BL/6-Wildtypmäuse mit humaner oder muriner Faecesflora rekolonisiert. Es sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die beiden Rekolonisierungsregime mit Faeces verschiedener Spezies auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* haben. Nach 8-tägiger Kompartimentalisierung der humanen bzw. murinen Flora im murinen Gastrointestinaltrakt erfolgte die Infektion mit *C. jejuni* B2.

#### 3.1.3.1 *C. jejuni* B2-Kinetik bei mit humaner vs. muriner Flora assoziierten Gnotobioten

Zur Untersuchung der *C. jejuni* B2-Kinetik im Experimentalverlauf erfolgten regelmäßige Faecesentnahmen zur Bestimmung der *C. jejuni* B2-Last. In der Gruppe der mit muriner Flora assoziierten Tiere war zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion *C. jejuni* B2 nachweisbar (nicht dargestellt). Bei Tieren hingegen, welche mit humaner Flora assoziiert worden waren, konnte während des gesamten Untersuchungszeitraumes eine stabile Kolonisierung mit *C. jejuni* B2 nachgewiesen werden (Abb. 10).



**Abb. 10: Kinetik der *C. jejuni B2*-Lasten bei mit humaner Flora assoziierten Tieren.** Dargestellt ist der Verlauf der *C. jejuni B2*-Lasten bei mit humaner Flora assoziierten C57BL/6-Wildtypmäußen. Balken symbolisieren den Median.

Zum Sektionszeitpunkt an Tag 22 nach der letzten Infektion erfolgte die Entnahme des luminalen Inhaltes von Magen, Duodenum, Jejunum und Colon zum Nachweis von *C. jejuni B2*. Bei mit muriner Flora assoziierten Tieren war entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes kein *C. jejuni B2* nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte in der Gruppe der mit humaner Flora assoziierten Tiere in allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes *C. jejuni B2* nachgewiesen werden. Im Magen fanden sich  $4,7 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^6$  KBE/g, am ehesten auf Grund der großen Standardabweichung nicht signifikant gegenüber mit muriner Flora rekolonisierten Tieren. Die *C. jejuni B2*-Lasten in Duodenum und Ileum waren signifikant höher als in der Gruppe der mit muriner Flora assoziierten Tiere ( $3,4 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^4$  KBE/g und  $1,6 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^5$  KBE/g; beide  $p < 0,05$ ). Die höchste *C. jejuni B2*-Last fand sich im Colon mit humaner Flora assoziierter Tiere ( $5,6 \times 10^6 \pm 6,5 \times 10^7$  KBE/g;  $p < 0,01$ ; Abb. 11).

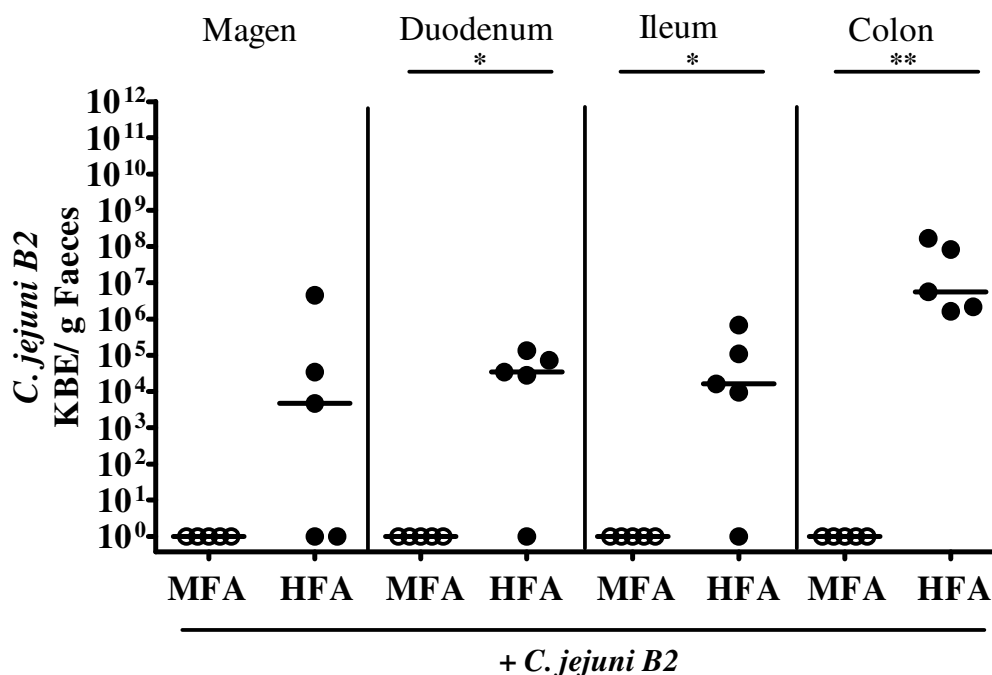


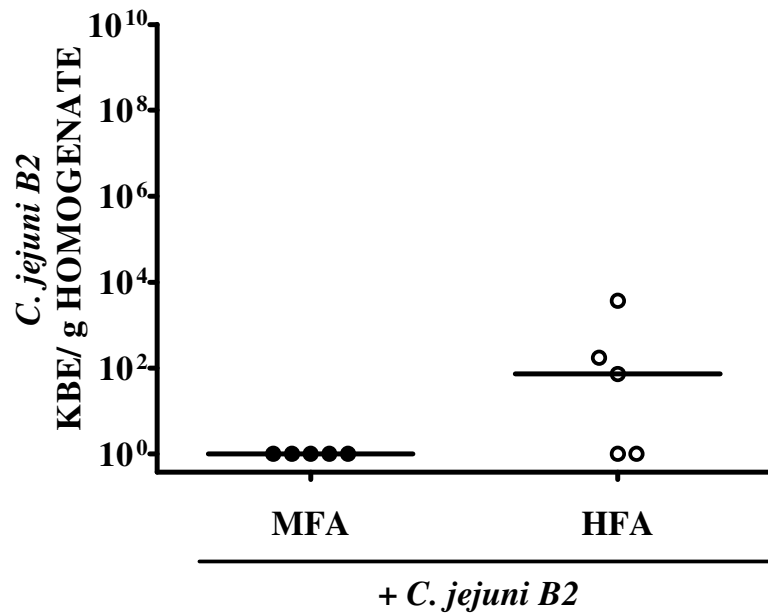
Abb. 11: *C. jejuni B2*-Lasten im Gastrointestinaltrakt rekolonisierter gnotobiotischer C57BL/6-Wildtypiere an Tag 22 p.i.. Geschlossene Zeichen symbolisieren mit humanem Faeces assoziierte Tiere (HFA), offene Zeichen symbolisieren mit murinem Faeces assoziierte Tiere (MFA). Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.1.3.2 *C. jejuni B2* Translokation bei mit humaner und muriner Flora assoziierten

#### Gnotobioten

Mittels Anreicherungs- und Kultivierungsmethoden von mesenterialen Lymphknoten (MLN), Milz, Leber, Nieren und Vollblutproben sollte erfasst werden, ob es im Laufe der Infektion zu einer Translokation von *C. jejuni B2* in sekundäre Immunorgane oder zu einer Bakteriämie kam. An Tag 22 nach der letzten Infektion konnte bei 60 % der mit humaner Flora assoziierten Tiere, nicht jedoch bei mit muriner Flora assoziierten Tieren, eine Translokation von *C. jejuni B2* in mesenteriale Lymphknoten nachgewiesen werden ( $7,3 \times 10^1 \pm 1,6 \times 10^3$  KBE/g; Abb. 12). Translokationen von *C. jejuni B2* in Milz, Leber, Nieren oder Blut konnten hingegen nicht festgestellt werden (nicht dargestellt).

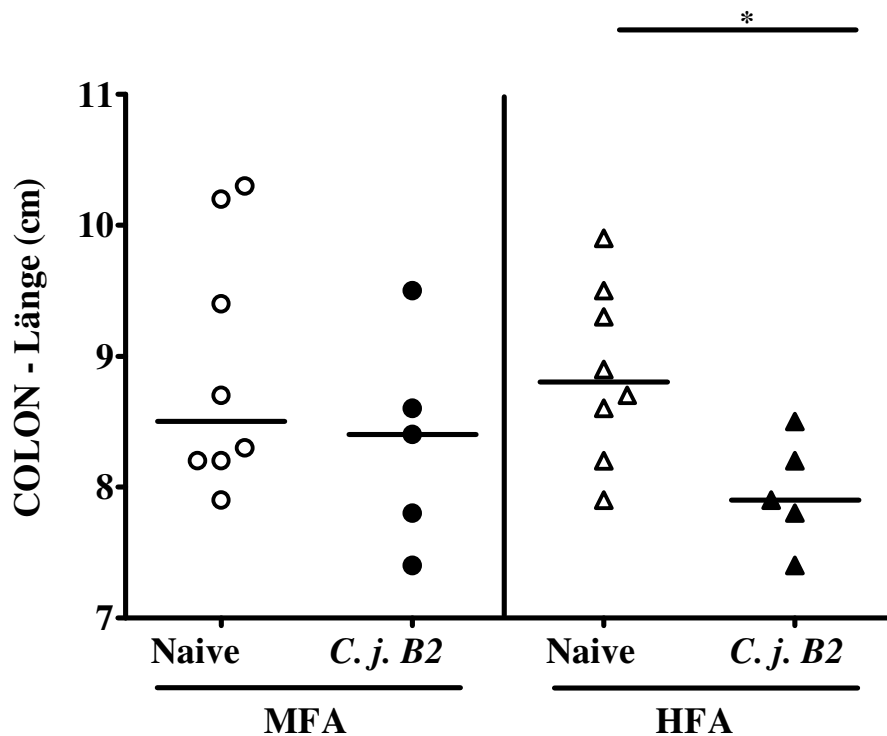




**Abb. 12: Translokation von *C. jejuni B2* in MLN.** Mit humaner Flora assoziierte Gnotobioten zeigten eine Translokation von *C. jejuni B2* in mesenteriale Lymphknoten (MLN) an d22 p.i.. Balken symbolisieren den Median.

### 3.1.3.3 Veränderung der Darmlängen bei „humanisierten“ und „murinisierten“ Gnotobioten

Als Parameter zur Beurteilung von entzündlichen Reaktionen und Objektivierung der Pathologie nach *C. jejuni B2*-Infektion wurde die Colonlänge von naiven sowie mit *C. jejuni* infizierten rekolonisierten Tieren ermittelt. Die Infektion mit *C. jejuni B2* führte an d22 p.i. bei mit humaner Flora assoziierten Gnotobioten zu einer signifikanten Verkürzung der Colonlänge um ca. 11 % (Abb. 13). In der Gruppe der mit muriner Flora assoziierten Tiere konnte nach *C. jejuni B2*-Infektion keine Verkürzung des Colons (< 1 %) festgestellt werden.



**Abb. 13: Colonlängenveränderung an d22 p.i.** Dargestellt sind die Colonlängen von mit humaner (HFA) und muriner (MFA) Flora assoziierten Gnotobioten im naiven Zustand sowie an d22 p.i. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene Symbole zeigen infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.3.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei rekolonisierten Gnotobioten

Gnotobiotische C57BL/6-Wildtypiere, welche mit humaner Flora assoziiert worden waren, zeigten im Verlauf der *C. jejuni* B2-Infektion stabile *C. jejuni*-Lasten. Zur Untersuchung *C. jejuni*-vermittelter Immunantworten erfolgten an d22 p.i. *in situ* immunhistochemische Analysen des Colons. Folgende Zellmerkmale wurden untersucht: Caspase3, CD3, Foxp3, MPO7 und B220.

#### 3.1.3.4.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten

Bei mit humaner Flora assoziierten gnotobiotischen C57BL/6-Wildtypieren konnte an Tag 22 p.i. ein signifikanter Anstieg Caspase3-positiver Zellen im Colon, im Vergleich zu mit muriner

Flora assoziierten Tieren sowie naiven Kontrollgruppen mit entsprechendem Rekolonisierungsstatus, beobachtet werden (alle  $p < 0,0005$ ; Abb. 14A).

Die Infektion mit *C. jejuni* B2 führte bei mit humaner Flora assoziierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg MPO7-positiver Zellen im Colon ( $p < 0,0005$ ; Abb. 14B). Auch bei mit muriner Flora assoziierten Tieren konnte nach *C. jejuni* B2-Infektion ein diskreter Anstieg MPO7-positiver Zellen dokumentiert werden, welcher jedoch nicht signifikant war. Mit humaner Flora assoziierte Tiere wiesen an Tag 22 p.i. signifikant mehr MPO7-positive Zellen auf als infizierte Tiere der mit muriner Flora assoziierten Gruppe ( $p < 0,05$ ; Abb. 14B).

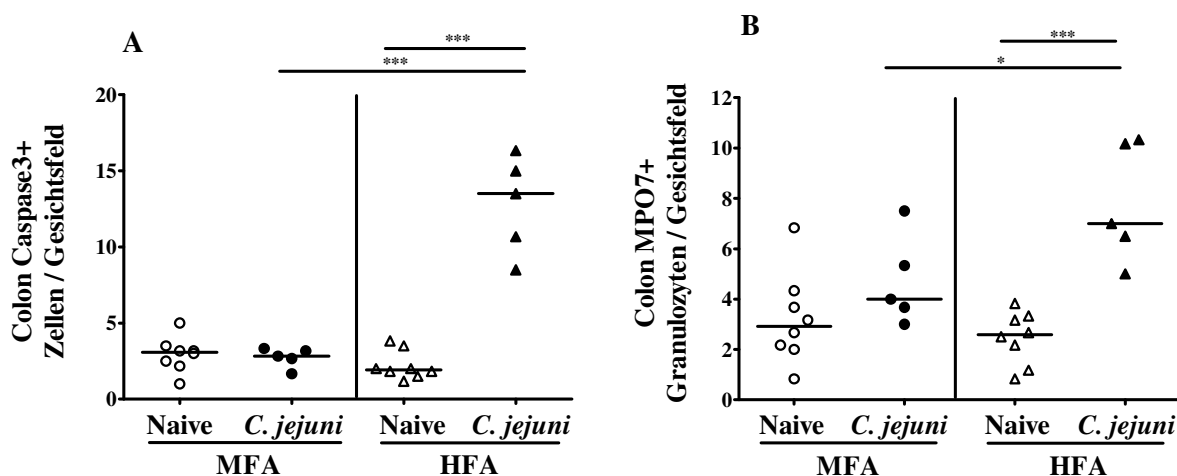


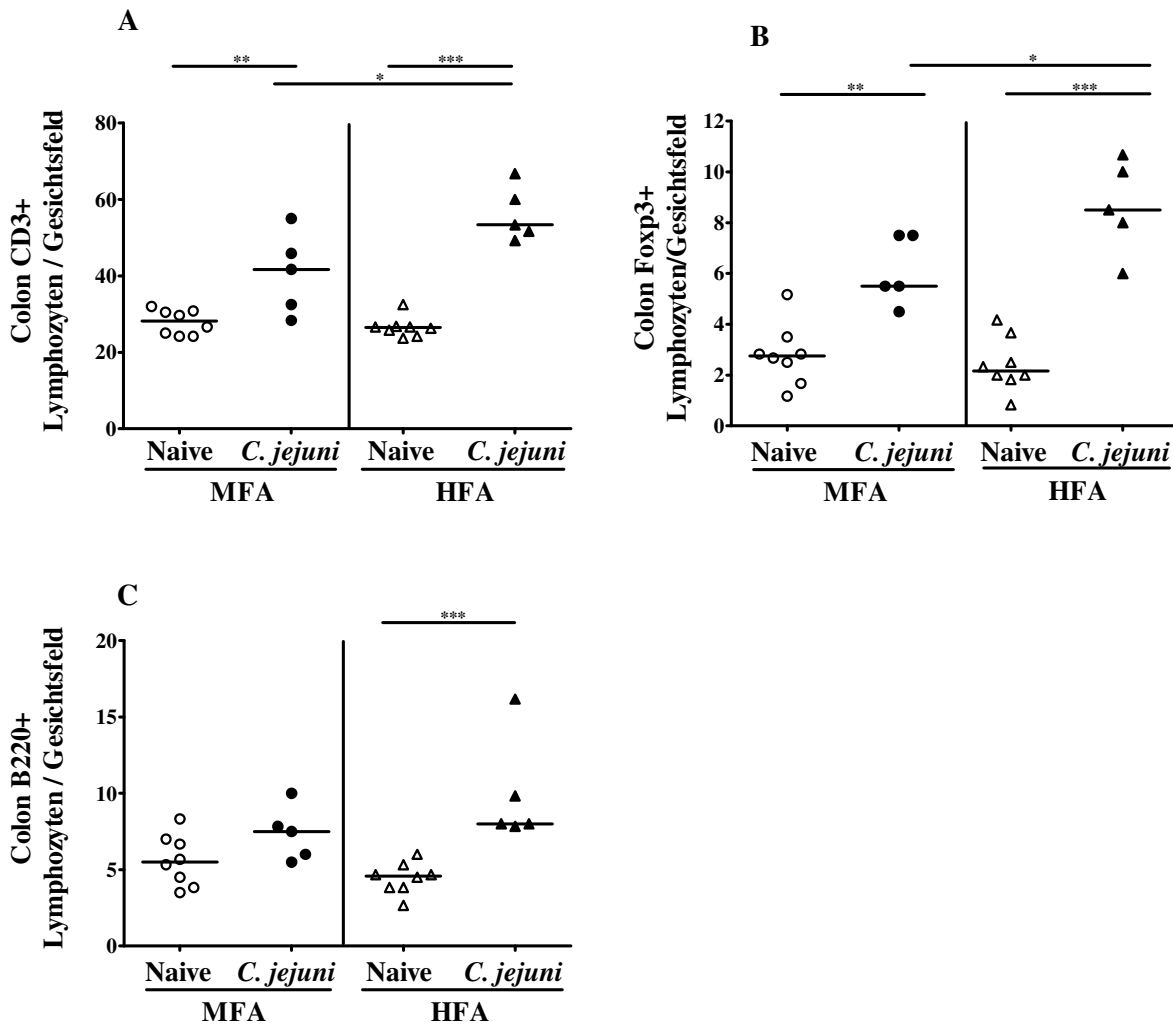
Abb. 14: Apoptotische Zellen (Caspase3-positiv - A) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv - B) bei mit muriner (MFA) und humaner (HFA) Flora assoziierten C57BL/6-Wildtypmäußen. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni* B2-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.1.3.4.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen

Im Vergleich zu naiven Tieren mit entsprechendem Rekolonisierungsstatus, führte die Infektion mit *C. jejuni* B2 an Tag 22 p.i. zu einem signifikanten Anstieg CD3-positiver Zellen und Foxp3-positiver regulatorischer T-Zellen im Colon *in situ* (Abb. 15). Unter den infizierten Gruppen wiesen mit humaner Flora assoziierte Tiere, im Vergleich zu mit muriner Flora assoziierten, bei beiden Populationen signifikant mehr Zellen auf ( $p < 0,05$ ; Abb. 15).

Es konnte gezeigt werden, dass es nach Infektion mit *C. jejuni* B2 bei mit humaner Flora assoziierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg B220-positiver Zellen kam ( $p < 0,005$ ; Abb. 15C). In der Gruppe der mit muriner Flora assoziierten Tiere war nach *C. jejuni* B2-Infektion allenfalls ein diskreter Trend in Richtung eines Anstieges der B220-positiven

Zellpopulation zu beobachten (nicht signifikant; Abb. 15C). Unter den infizierten Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl der B220-positiven Zellen (Abb. 15C).



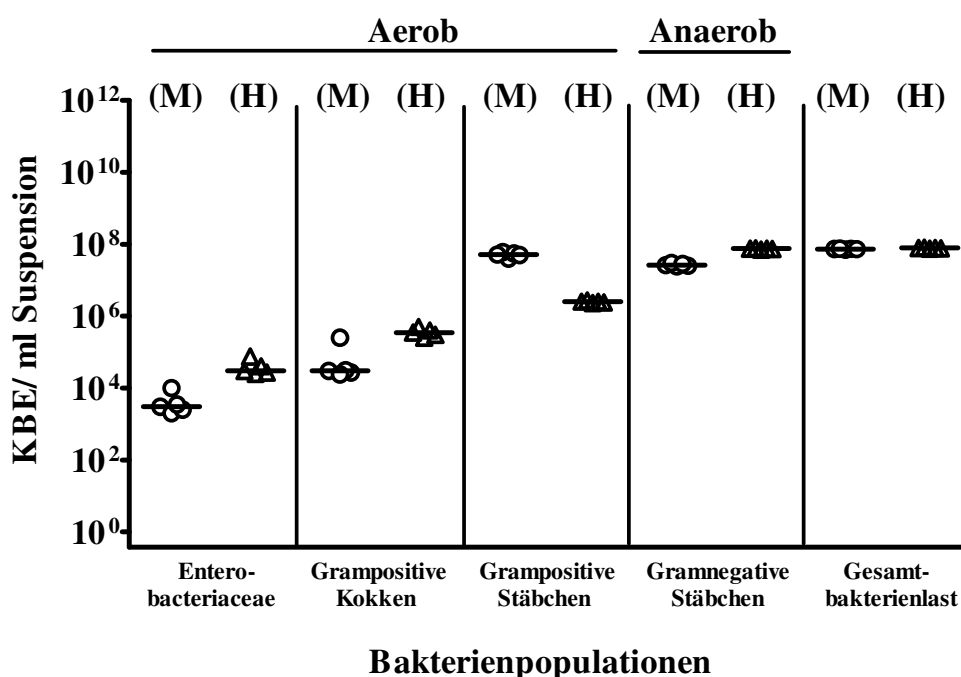
**Abb. 15:** T-Zellen (A), regulatorische T-Zellen (B) und B-Zellen (C) bei mit humaner (HFA) oder mit muriner (MFA) Flora assoziierten C57BL/6-Wildtyptieren an d22 nach *C. jejuni* B2-Infektion. Gezeigt sind T-Zellen (CD3-positiv - A), regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) und B-Zellen (B220-positiv - C) bei mit humaner oder mit muriner Flora assoziierten naiven und infizierten Tieren. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

Weiterhin konnte durch die immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die alleinige Rekolonisierung von gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren mit humaner Flora nicht zu einem Anstieg der untersuchten Zellpopulationen im Colon *in situ* führte.

### 3.1.4 Analysen der humanen und murinen Darmflora

Das im Vorangegangenen beschriebene Modell der Rekolonisierung mit humaner bzw. muriner Flora zeigte, abhängig vom Rekolonisierungsregime, deutliche Unterschiede hinsichtlich des Kolonisierungsverhaltens von *C. jejuni* sowie differente Immunantworten des Wirts auf das Pathogen. Zur Feststellung von Unterschieden zwischen der humanen und der murinen Flora wurden qualitative und quantitative Analysen der kultivierbaren Colonflora durchgeführt.

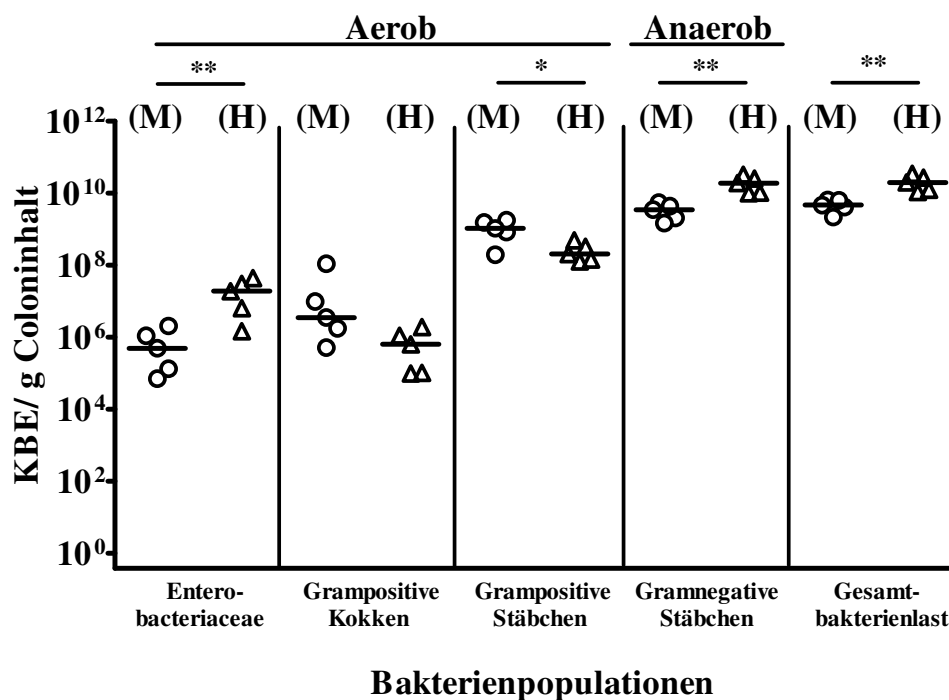
Hinsichtlich der Rekolonisierungs-Suspensionen ergaben sich bei der Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rekolonisierungsregimen (Abb. 16).



**Abb. 16: Bakterienpopulationen der Rekolonisierungs-Suspensionen.** Dargestellt sind die Bakterienpopulationen der Rekolonisierungs-Suspensionen der humanen (H) und murinen (M) Flora vor Einbringen in den murinen Gastrointestinaltrakt. Balken symbolisieren den Median.

Nach 8-tägiger Kompartimentalisierung im murinen Gastrointestinaltrakt wiesen mit humaner Flora assoziierte Mäuse im Vergleich zu mit muriner Flora assoziierten Mäusen signifikant mehr *Enterobacteriaceae* ( $1,9 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$  KBE/g gegenüber  $4,9 \times 10^5 \pm 7,3 \times 10^5$  KBE/g;  $p < 0,01$ ; Abb. 17) und anaerobe gramnegative Stäbchen (vor allem *Bacteroides / Prevotella* spp.  $1,9 \times 10^{10} \pm 8,9 \times 10^9$  KBE/g gegenüber  $3,5 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/g;  $p < 0,01$ ; Abb. 17) sowie signifikant weniger aerobe grampositive Stäbchen (vor allem *Lactobacillus* spp.  $2,0 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8$  KBE/g gegenüber  $1,1 \times 10^9 \pm 5,5 \times 10^8$  KBE/g;  $p < 0,01$ , Abb. 17) auf. Die Gesamtbakterienlast der mit humaner Flora assoziierten Tiere war mit

$2,0 \times 10^{10} \pm 8,9 \times 10^9$  KBE/g signifikant höher als die der mit muriner Flora assoziierten Tiere ( $4,7 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$  KBE/g;  $p < 0,01$ ; Abb. 17).



**Abb. 17: Bakterienpopulationen im Colon bei mit humaner (H) bzw. muriner (M) Flora rekolonisierten gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyptieren.** Dargestellt sind die Bakterienpopulationen nach 8-tägiger Kompartimentalisierung, vor Infektion mit *C. jejuni* B2. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* in Inflammationsmodellen

Die Analyse der humanen und murinen Flora nach 8-tägiger Kompartimentalisierung im murinen Gastrointestinaltrakt zeigte signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung. Die Faecesflora von Tieren, welche mit humaner Darmflora rekolonisiert worden waren, zeigte im Vergleich zur mit muriner Flora assoziierten Tieren unmittelbar vor Infektion mit *C. jejuni* B2 signifikant mehr *Enterobacteriaceae* ( $1,9 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$  KBE/g gegenüber  $4,9 \times 10^5 \pm 7,3 \times 10^5$  KBE/g;  $p < 0,01$ ; Abb. 17).

Im Folgenden wurde das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* in verschiedenen Inflammationsmodellen untersucht. Ziel dieser Untersuchungen sollte sein, die Auswirkung einer inflammatorisch veränderten Darmflora auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* aufzuzeigen.

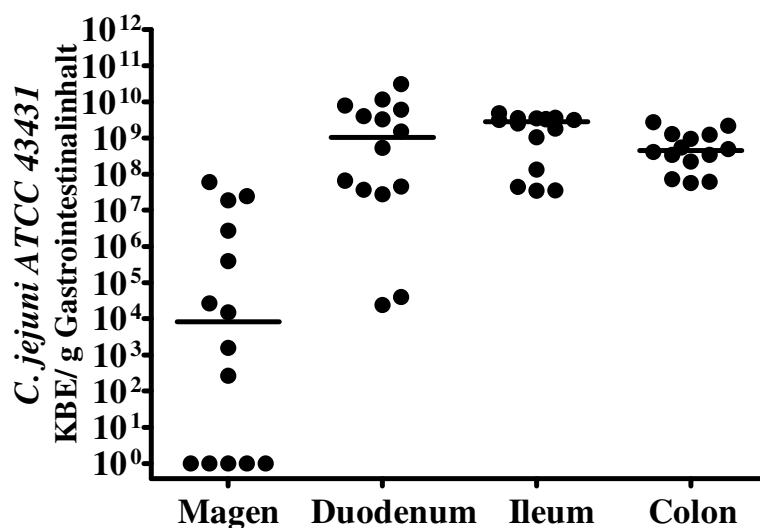
### 3.2.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei akuter *T. gondii*-Ileitis

#### 3.2.1.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* ATCC 43431 bei akuter *T. gondii*-Ileitis

Tiere, die 3 Tage nach der *T. gondii*-Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert worden waren zeigten 24 Stunden nach der letzten der drei konsekutiven *C. jejuni*-Infektionen eine *C. jejuni*-Last von  $2,9 \times 10^8 \pm 5,4 \times 10^8$  KBE/g Faeces (nicht dargestellt). Zum Sektionszeitpunkt erfolgte die Bestimmung der *C. jejuni* ATCC 43431-Last entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes. Im Magen konnten  $8,3 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^7$  KBE/g Mageninhalt, im Duodenum  $1,2 \times 10^9 \pm 8,4 \times 10^9$  KBE/g Duodenalinhalt nachgewiesen werden. Im unteren Gastrointestinaltrakt fanden sich  $2,8 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$  KBE/g im Ileum, sowie  $4,5 \times 10^8 \pm 8,2 \times 10^8$  KBE/g im Colon (Abb. 18).

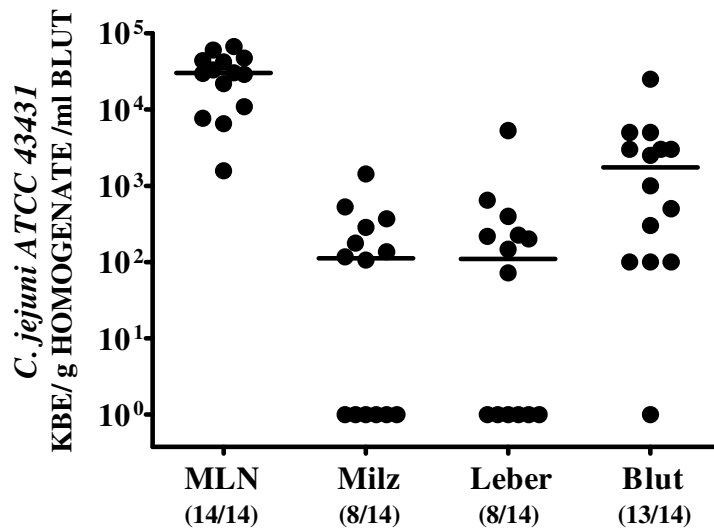
#### 3.2.1.1.1 Translokation von *C. jejuni* ATCC 43431 bei C57BL/6-Wildtypmäusen mit akuter *T. gondii*-Ileitis

Zwei Tage nach der letzten *C. jejuni* ATCC 43431-Infektion wurden in mesenterialen Lymphknoten aller Tiere *C. jejuni* ATCC 43431 nachgewiesen ( $3,0 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^4$  KBE/g; Abb. 19). Ca. 57 % (8/14) der Tiere wiesen Translokationen von lebenden *C. jejuni* ATCC 43431 in die Milz und die Leber auf. Translokationen in das Blut wurden bei ca. 93 % (13/14) der Tiere nachgewiesen (Abb. 19).



Tag 7 p.i. mit *T. gondii*, Tag 2 p.i. mit *C. jejuni* ATCC 43431

**Abb. 18:** *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten bei C57BL/6-Wildtypmäußen mit akuter *T. gondii*-Ileitis. Gezeigt sind die *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten im Gastrointestinaltrakt weiblicher C57BL/6-Wildtypmäußen an Tag 7 nach *T. gondii*-Infektion und Tag 2 nach der letzten *C. jejuni* ATCC 43431-Infektion. Balken symbolisieren den Median.

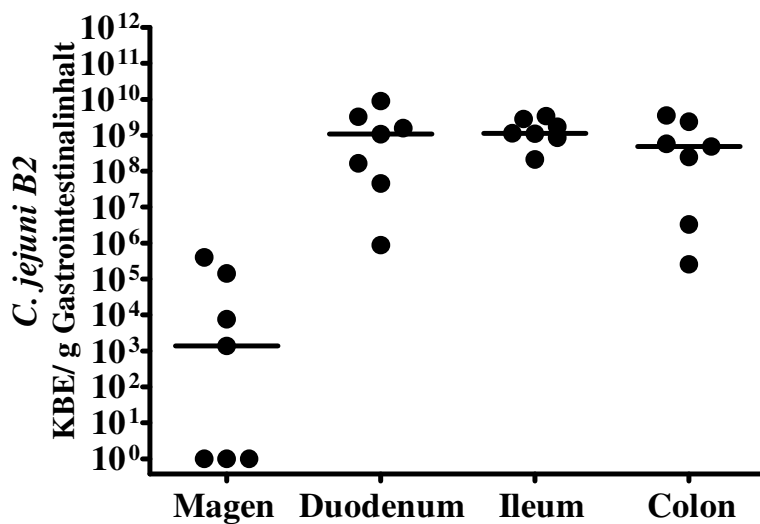


Tag 7 p.i. mit *T. gondii*, Tag 2 p.i. mit *C. jejuni* ATCC 43431

**Abb. 19:** *C. jejuni* ATCC 43431-Translokation bei C57BL/6-Wildtyptieren mit akuter *T. gondii*-Ileitis. Gezeigt sind die *C. jejuni* ATCC 43431-Translokationen in MLN, Milz, Leber und Blut bei weiblichen C57BL/6-Wildtyptieren an Tag 7 nach *T. gondii*-Infektion und Tag 2 nach der letzten *C. jejuni* ATCC 43431-Infektion. Balken symbolisieren den Median.

### 3.2.1.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* B2 bei akuter *T. gondii*-Ileitis

*C. jejuni* B2 zeigte bei Tieren mit akuter *T. gondii*-Ileitis ein mit dem Stamm *C. jejuni* ATCC 43431 vergleichbares Kolonisationsverhalten. Abb. 20 zeigt die *C. jejuni* B2-Lasten entlang des Gastrointestinaltraktes.



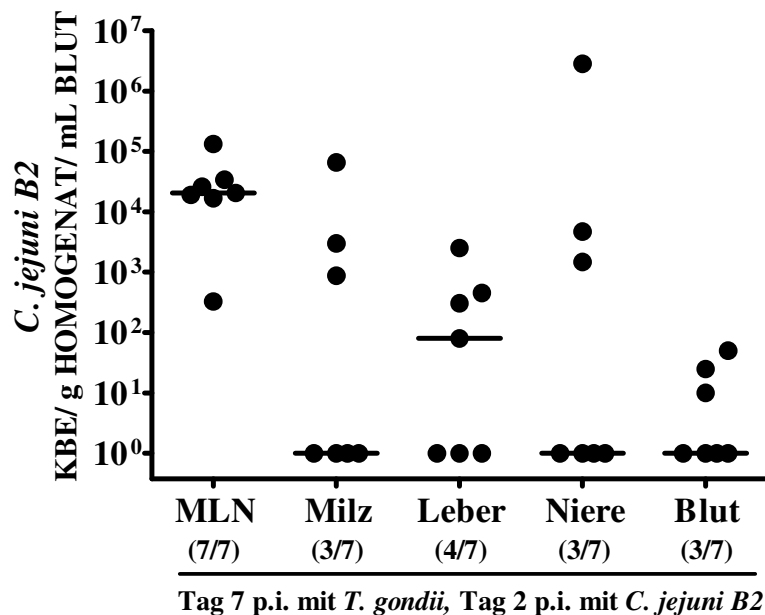
Tag 7 p.i. mit *T. gondii*, Tag 2 p.i. mit *C. jejuni* B2

**Abb. 20:** *C. jejuni* B2-Lasten bei C57BL/6-Wildtyptieren mit akuter *T. gondii*-Ileitis. Gezeigt sind die *C. jejuni* B2-Lasten im Gastrointestinaltrakt weiblicher C57BL/6-Wildtyptiere an Tag 7 nach *T. gondii*-Infektion und Tag 2 nach der letzten *C. jejuni* B2-Infektion. Balken symbolisieren den Median.



### 3.2.1.2.1 Translokation von *C. jejuni* B2 bei C57BL/6-Wildtypmäusen mit akuter *T. gondii*-Ileitis

Bei Tieren mit akuter *T. gondii*-Ileitis konnte 2 Tage nach der letzten *C. jejuni* B2-Infektion bei sämtlichen Tieren eine Translokation in mesenteriale Lymphknoten nachgewiesen werden, im Median  $2,1 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$  KBE/g. Ca. 57 % (4/7) der Tiere zeigten eine Translokation von *C. jejuni* B2 in die Leber. Bei je ca. 43 % (3/7) der Tiere konnte eine Translokation von *C. jejuni* B2 in Milz, Niere und Blut nachgewiesen werden (Abb. 21).



**Abb. 21:** *C. jejuni* B2-Translokation bei C57BL/6-Wildtypmäußen mit akuter *T. gondii*-Ileitis. Gezeigt sind die *C. jejuni* B2-Translokationen in MLN, Milz, Leber, Nieren und Blut bei weiblichen C57BL/6-Wildtypmäußen an Tag 7 nach *T. gondii*-Infektion und Tag 2 nach der letzten *C. jejuni* B2-Infektion. Balken symbolisieren den Median.

### 3.2.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei chronischer Inflammation

Bei der Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *C. jejuni* bei Tieren mit chronischer IL-10<sup>-/-</sup>-Colitis konnte ein stabiles Ansiedeln von *C. jejuni* ATCC 43431 nachgewiesen werden. Im Infektionsverlauf konnte kein signifikanter Abfall der *C. jejuni* ATCC 43431-Last beobachtet werden. 12 Tage nach der letzten Infektion waren bei ca. 69 % der Tiere *C. jejuni* im Faeces nachweisbar (im Median  $1,2 \times 10^8 \pm 3,8 \times 10^8$  KBE/g; Abb. 22).

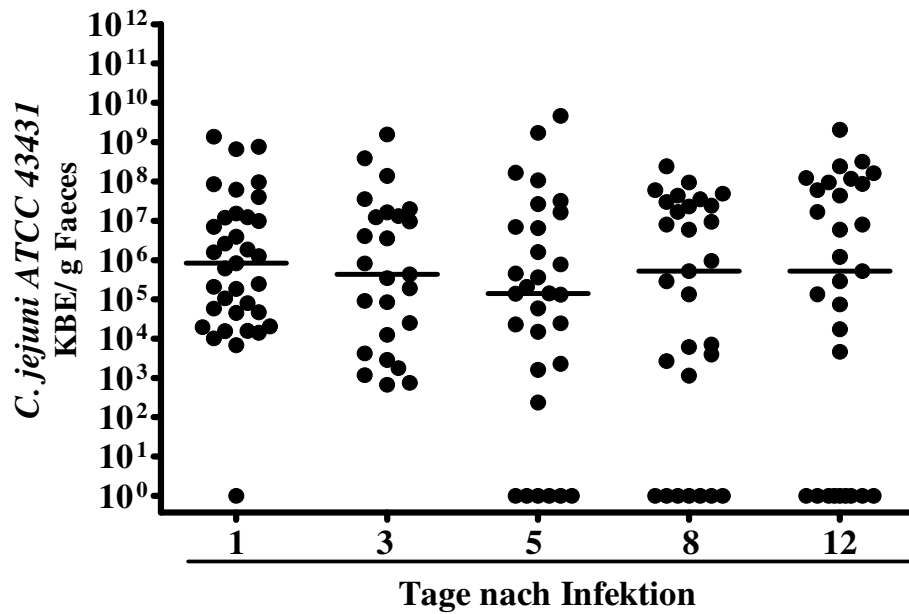


Abb. 22: *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten bei 129/SvEv-Tieren mit chronischer IL10<sup>-/-</sup>-Colitis. Gezeigt sind die *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten im Faeces im Verlauf der Infektion. Balken symbolisieren den Median.

### 3.2.2.1 *E. coli*-Lasten bei Tieren mit chronischer IL10<sup>-/-</sup>-Colitis

Um Auswirkungen der IL-10-Defizienz auf die intraluminale *E. coli*-Dichte zu erfassen, erfolgte der Nachweis der *E. coli*-Last mittels kultureller Analyse. Im 129/SvEv-Hintergrund gezüchtete IL10<sup>-/-</sup>-Tiere hatten im Vergleich zu 129/SvEv-Wildtyptieren um ca. 4 logarithmische Stufen höhere *E. coli*-Lasten ( $4,8 \times 10^8 \pm 1,1 \times 10^9$  KBE/g gegenüber  $9,9 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^7$  KBE/g;  $p < 0,005$ ; Abb. 23).

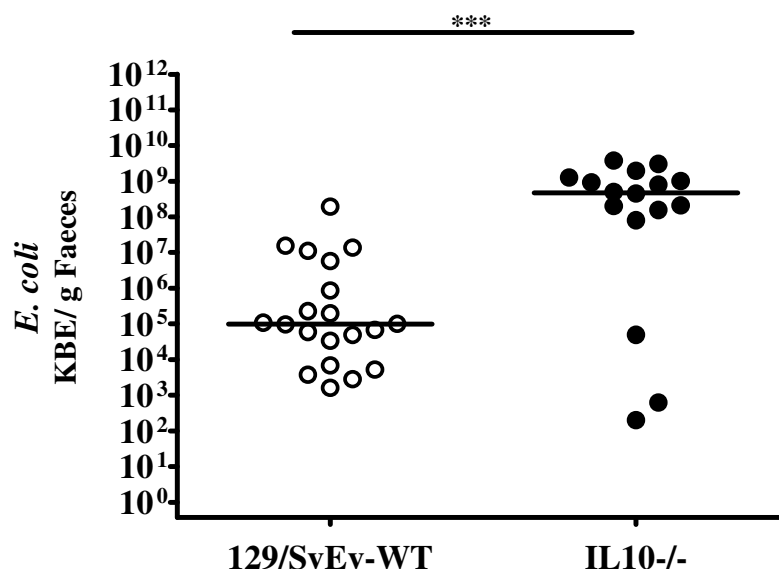


Abb. 23: *E. coli*-Lasten bei 129/SvEv-Wildtyp-Tieren und IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.3 Auswirkungen der intraluminalen Erhöhung der *E. coli*-Dichte auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni*

Im Modell der mit humaner Flora assoziierten Maus sowie dem akuten und chronischen Inflammationsmodell konnte eine stabile Besiedlung mit *C. jejuni* beobachtet werden. Allen Modellen gemeinsam war die höhere Last an *Enterobacteriaceae* (vor allem *E. coli*) in der Faecesflora. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine sekundäre intraluminale Erhöhung der *E. coli*-Dichte Auswirkungen auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* hat.

#### 3.3.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* ATCC 43431 nach Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte

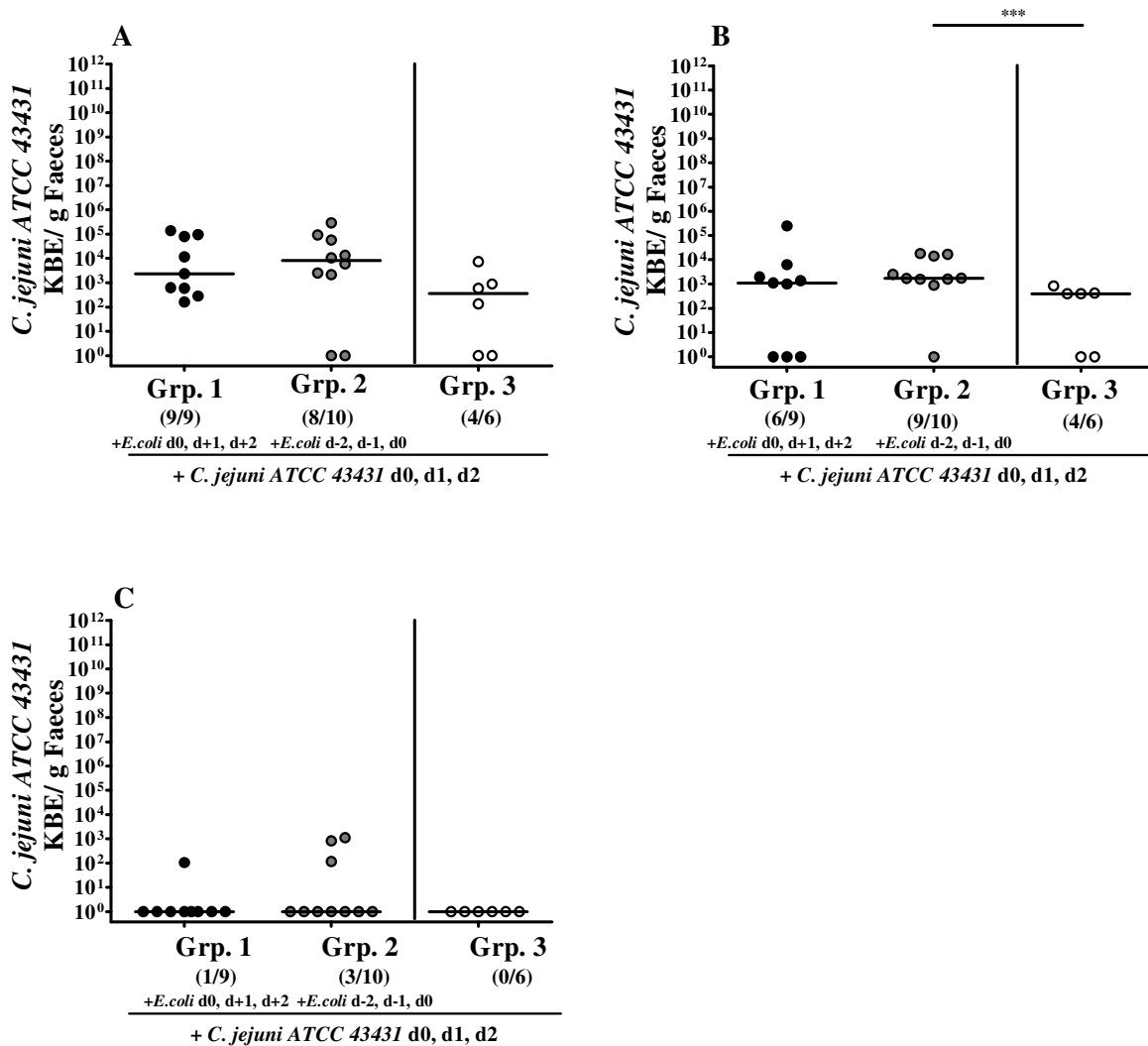
C57BL/6-Wildtyp-Tiere mit SPF-Flora wurden peroral mit *E. coli* mittels Gavage kolonisiert und anschließend mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert. Des Weiteren wurde untersucht, ob die gleichzeitige oder vorherige *E. coli*-Gabe Einfluß auf die *C. jejuni*-Besiedlungsdichte nahm (Tab. 16).

**Tab. 16: Zeitliches Vorgehen bei sekundärer intraluminaler Erhöhung der *E. coli*-Dichte und Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431**

Gruppe 1	<i>E.coli</i> peroral + <i>C. jejuni</i> ATCC 43431 peroral an d0, d+1, d+2
Gruppe 2	<i>E.coli</i> peroral an d-2, d-1, d0 + <i>C. jejuni</i> ATCC 43431 an d0, d+1, d+2
Gruppe 3	<i>C. jejuni</i> ATCC 43431 peroral an d0, d+1, d+2

In Gruppe 1 erfolgten *E. coli*-Kolonisierung und *C. jejuni* ATCC 43431-Infektion zeitgleich an drei aufeinanderfolgenden Tagen. In Gruppe 2 wurden die Tiere zunächst mit *E. coli* kolonisiert, an die letzte *E. coli*-Gavage schloss sich die 3malige Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 an. Gruppe 3 diente als Kontrollgruppe, in der keine sekundäre Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte vorgenommen wurde.

24 Stunden nach der letzten von drei konsekutiven *C. jejuni* ATCC 43431-Infektionen konnten keine signifikanten Unterschiede der *C. jejuni*-Lasten zwischen den Gruppen im Faeces nachgewiesen werden (Abb. 24A). Zwei Tage nach der letzten Infektion fand sich bei mit *E. coli* vorbehandelten Tieren (Gruppe 2) signifikant mehr *C. jejuni* ATCC 43431 in der Colonflora als bei Tieren, welche nicht mit *E. coli* kolonisiert worden waren (Gruppe 3; Abb. 24B). Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, 12 Tage nach der letzten Infektion, konnte in allen drei Gruppen ein Rückgang der *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten unter die Nachweisgrenze beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren lediglich in den mit *E. coli* kolonisierten Gruppen bei 1/9 bzw. 3/9 Tieren *C. jejuni* ATCC 43431 im Faeces nachweisbar (Abb. 24C).



**Abb. 24:** *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten an Tag 1 (A), Tag 2 (B) und Tag 12 (C) p.i.. Dargestellt sind die *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten. Geschlossene Symbole stehen für Tiere, welche mit *E. coli* kolonisiert und mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert wurden, offene Symbole für Tiere, die mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert wurden. Die Anzahl der positiven Nachweise sowie die Anzahl der untersuchten Tiere sind in Klammern angegeben. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

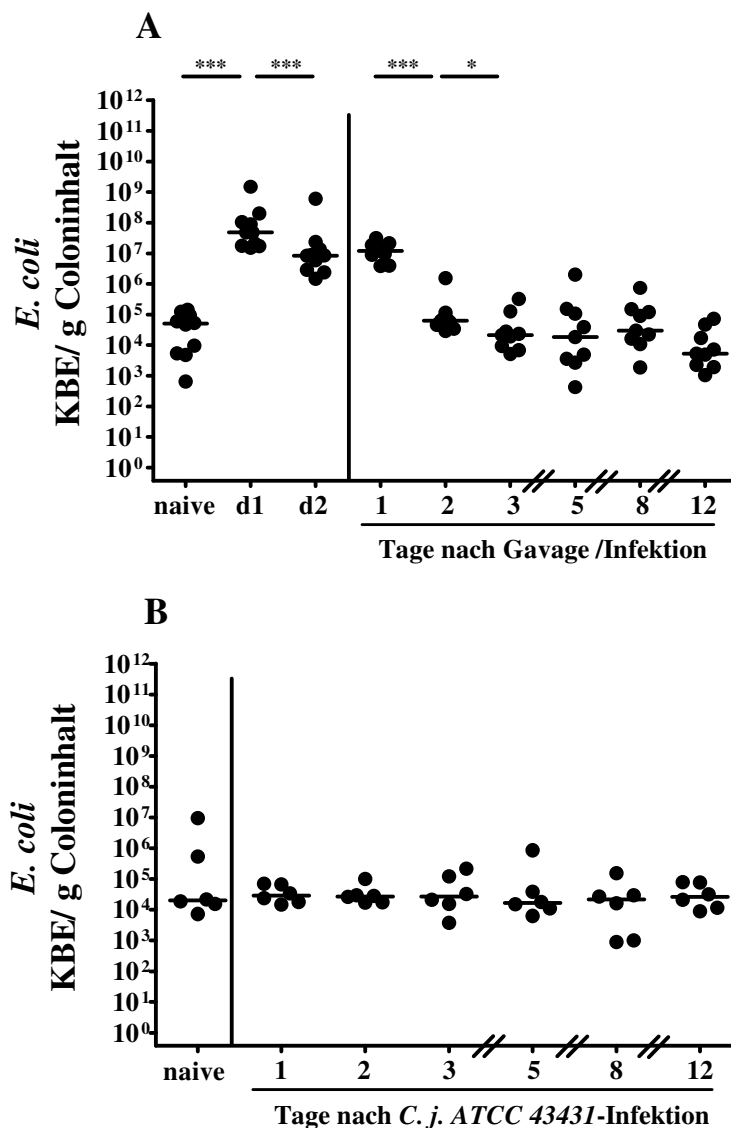
### 3.3.1.1 Kinetik der *E. coli*-Lasten nach intraluminaler Erhöhung mittels Gavage

Um zu erfassen, inwieweit eine 3-malige Rekolonisierung der konventionell besiedelten Mäuse mit *E. coli* zu einer dauerhaften Erhöhung der *E. coli*-Last im Gastrointestinaltrakt führte, erfolgten regelmäßige Faecesentnahmen zum *E. coli*-Nachweis. Bei Tieren, welche zeitgleich mit *E. coli* und *C. jejuni* ATCC 43431 behandelt wurden (Grp.1), fanden sich vor Intervention  $5,0 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^4$  KBE *E. coli*/g Coloninhalt (Abb. 25A). Nach einmaliger peroraler Gavage mit *E. coli* stieg die intraluminale *E. coli*-Dichte um ca. 3 logarithmische Stufen (Abb. 25A;  $p < 0,00005$ ). Nach der zweiten peroralen *E. coli*-Gavage zeigte sich ein diskreter Abfall der *E. coli*-Last um ca.  $\frac{1}{2}$  logarithmische Stufe (Abb. 25A;  $p < 0,005$ ). 24 Stunden nach der dritten

und letzten *E. coli*-Gavage blieb die *E. coli*-Last unverändert, während bereits 48 Stunden nach der letzten *E. coli*-Gavage ein signifikanter Abfall der *E. coli*-Last um ca. 2 logarithmische Stufen zu beobachten war (Abb. 25A;  $p < 0.005$ ). Somit war 2 Tage nach der letzten *E. coli*-Gavage das Ausgangsniveau naiver Tiere erreicht.

Auch in Gruppe 2, in der sich die Infektion mit *C. jejuni ATCC 43431* an die letzte perorale *E. coli*-Gavage anschloss, erfolgte die kulturelle Analyse der *E. coli*-Kinetik, die der bereits beschriebenen entsprach (nicht dargestellt).

Die alleinige Infektion mit *C. jejuni ATCC 43431* führte im zeitlichen Verlauf zu keiner nennenswerten Veränderung der *E. coli*-Last im Colon (Abb. 25B).



**Abb. 25: Kinetik der *E. coli*-Lasten.** Dargestellt sind die *E. coli*-Lasten von Tieren, welche an d0, d+1 und d+2 mit *E. coli* und *C. jejuni ATCC 43431* peroral infiziert wurden (A) sowie die *E. coli*-Lasten von C57BL/6-Wildtyp-tieren, welche nur mit *C. jejuni ATCC 43431* infiziert wurden (B). Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.3.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* nach dauerhafter Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte

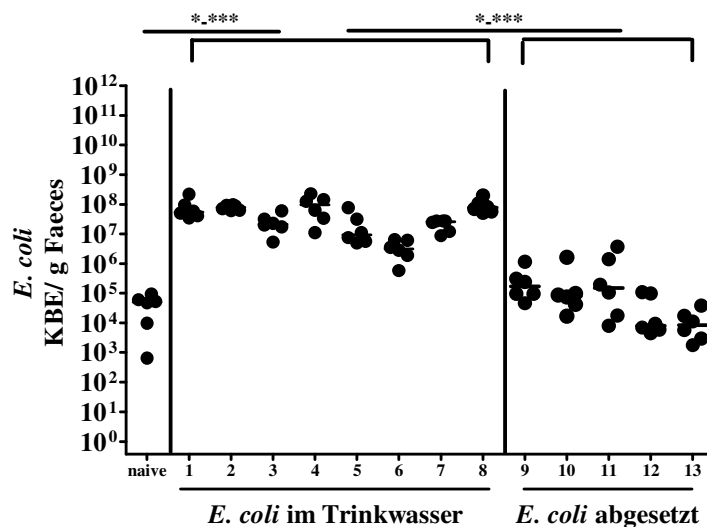
#### 3.3.2.1 Dauerhafte Erhöhung der *E. coli*-Dichte mittels Gavage

Mit dem Ziel, eine dauerhafte Erhöhung der *E. coli*-Dichte im Gastrointestinaltrakt zu erreichen, wurden C57BL/6-Mäuse über 8 Tage täglich mit *E. coli* gavagiert. Einen Tag nach der ersten *E. coli*-Gavage erfolgte die Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 bzw. *C. jejuni* B2. In einer Kontrollgruppe erfolgte lediglich die tägliche Gavage mit *E. coli*. Die *E. coli*-Lasten der Tiere, welche nach der ersten *E. coli*-Gavage mit *C. jejuni* ATCC 43431 oder *C. jejuni* B2 infiziert wurden, unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen der Gruppe ohne *C. jejuni*-Infektion. Die kulturelle Kontrolle der *E. coli*-Lasten ergab im Zeitverlauf zwischen  $2,2 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^6$  KBE/g und  $2,6 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^8$  KBE/g Coloninhalt ohne dass sich die Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten signifikant unterschieden (nicht dargestellt).

#### 3.3.2.2 Gabe von *E. coli* in das Trinkwasser

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine stabile Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte auch durch Gabe von *E. coli* in das Trinkwasser der Tiere möglich war.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Gabe von  $10^7$ - $10^9$  KBE *E. coli*/ml Trinkwasser eine dauerhafte, signifikante Erhöhung der *E. coli*-Dichte im Faeces erzielt werden konnte und es 24h nach Absetzen von *E. coli* im Trinkwasser wieder zu einem signifikanten Abfall der *E. coli*-Dichte kam (Abb. 26;  $p < 0,005$ ).



**Abb. 26: Kinetik der *E. coli*-Lasten bei C57BL/6-Wildtyptieren.** Dargestellt sind die *E. coli*-Lasten von Tieren im naiven Zustand sowie nach Verabreichung von *E. coli* über das Trinkwasser. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.3.2.3 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* nach dauerhafter Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Last

In der Gruppe der mit *C. jejuni* ATCC 43431 infizierten Tiere zeigte sich im Verlauf ein Rückgang der *C. jejuni* ATCC 43431-Last im Faeces. Bereits an Tag 7 nach der letzten von drei konsekutiven peroralen *C. jejuni* Infektionen war die *C. jejuni* ATCC 43431-Last unter die Nachweisgrenze gefallen.

Im Gegensatz dazu konnte eine stabile Kolonisierung von *C. jejuni* B2 beobachtet werden. Auch 12 Tage nach der letzten Infektion betrug die *C. jejuni* B2 Last noch  $1,9 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^5$  KBE/g Coloninhalt (Abb. 27;  $p < 0,005$ ).

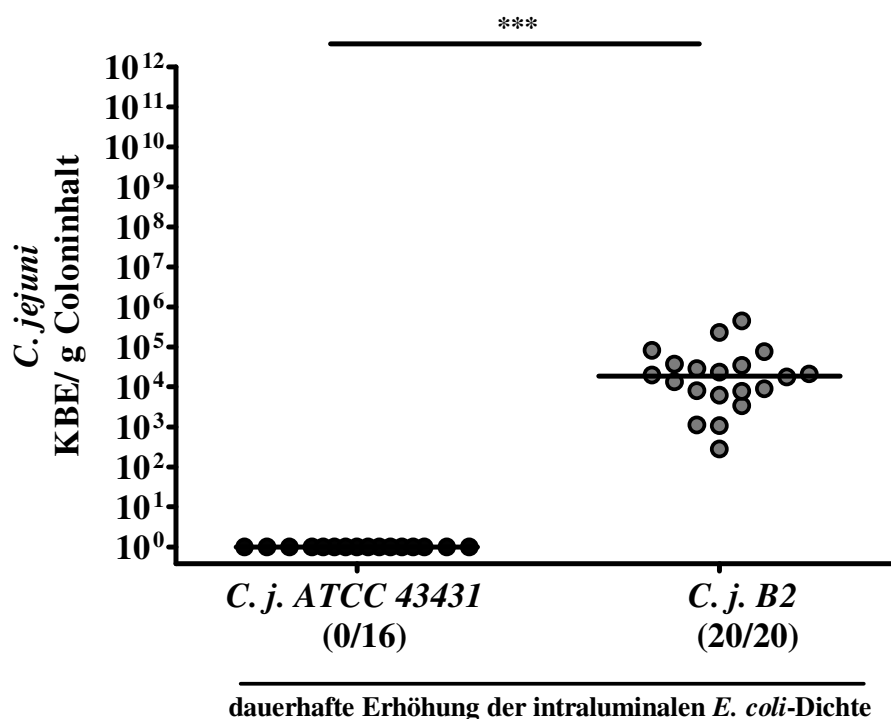


Abb. 27: *C. jejuni*-Lasten an Tag 12 nach Infektion bei dauerhafter Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.3.2.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei dauerhaft erhöhter *E. coli*-Dichte

Im Vorangegangenen konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* B2 bei C57BL/6-Wildtypmäußen mit konventioneller Flora bei dauerhafter Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte stabil ansiedelte. Zur Untersuchung *Campylobacter jejuni*-vermittelter Immunantworten erfolgten an



Tag 12 p.i. *in situ* immunhistochemische Analysen von Colonschnitten. Folgende Zellmerkmale wurden untersucht: Caspase3, CD3, Foxp3, MPO7 und B220.

### 3.3.2.4.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten

An Tag 12 nach Infektion zeigte sich bei *C. jejuni*-infizierten Tieren im Vergleich zu Tieren, die lediglich mit *E. coli* behandelt wurden ein signifikanter Anstieg Caspase3-positiver apoptotischer Zellen sowie MPO7-positiver neutrophiler Granulozyten im Colon *in situ*. Der Anstieg der apoptotischen Zellen im Colon war bei *C. jejuni* B2 infizierten Tieren ungefähr doppelt so hoch wie bei *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tieren (Abb. 28A;  $p < 0,05$  und  $p < 0,00001$ ). Hinsichtlich der Population der neutrophilen Granulozyten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *C. jejuni* ATCC 43431- und *C. jejuni* B2-infizierten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 28B).

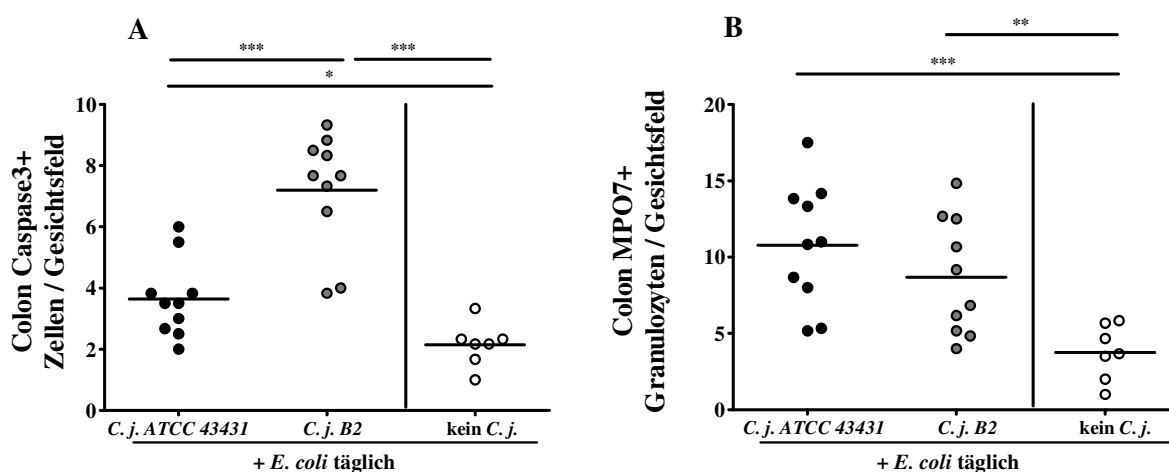


Abb. 28: Apoptotische Zellen (Caspase3-positiv - A) und Neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv - B) bei C57BL/6-Wildtypmäußen mit erhöhten *E. coli*-Lasten. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.3.2.4.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen

*C. jejuni*-infizierte Tiere wiesen, unabhängig vom verwendeten *C. jejuni*-Stamm, im Vergleich zu nicht infizierten Tieren an Tag 12 p.i. signifikant mehr CD3-positive T-Zellen, Foxp3-positive regulatorische T-Zellen sowie B220-positive B-Zellen im Colon *in situ* auf (Abb. 29).

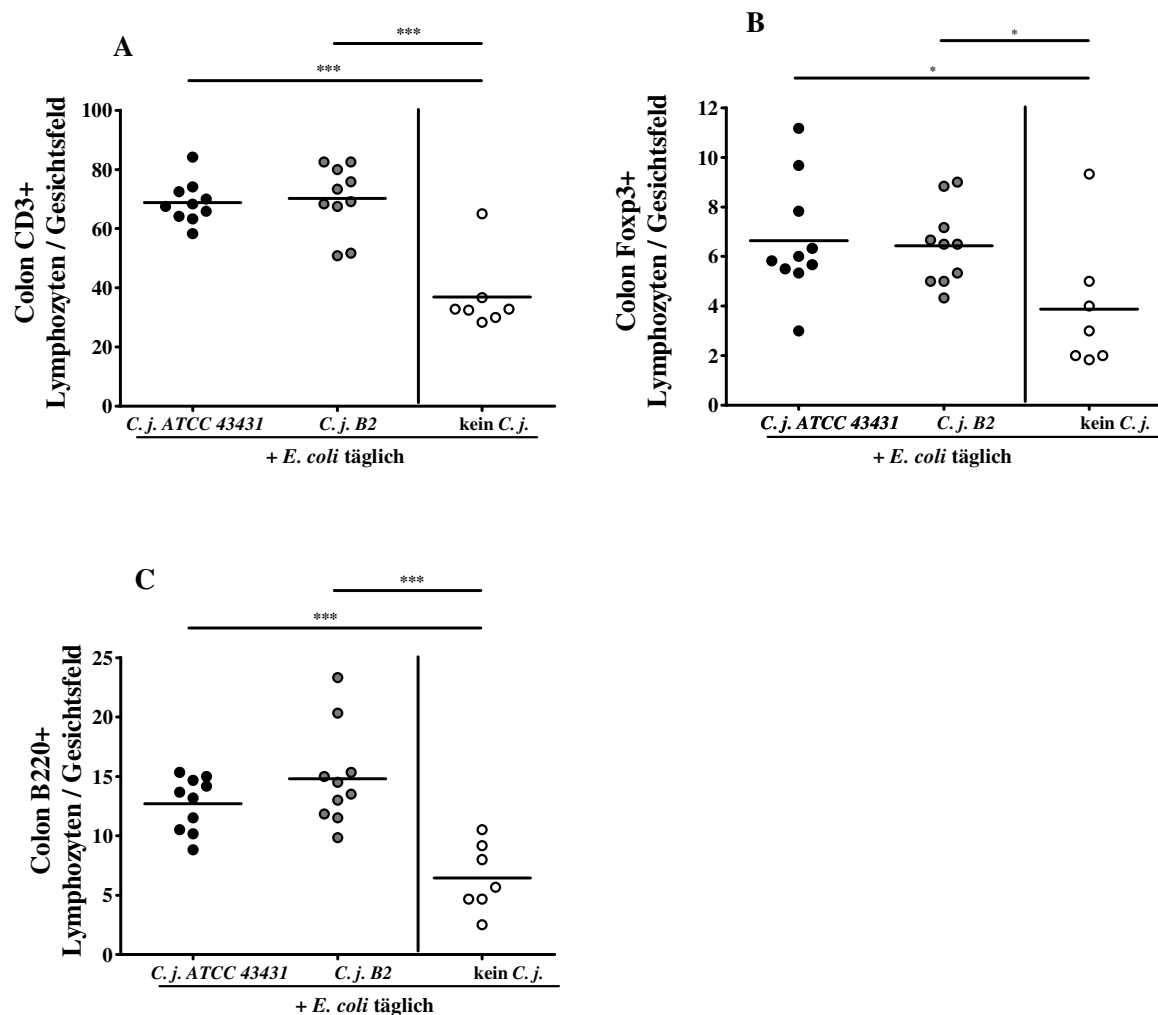


Abb. 29: T-Zellen (CD3-positiv - A), regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) und B-Zellen (B220-positiv - C) bei C57BL/6-Wildtyptieren mit erhöhten *E. coli*-Lasten. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.4 Altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz

Um eine mögliche altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz gegen *C. jejuni* zu untersuchen, wurde im Folgenden das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei 3-Wochen alten C57BL/6-Wildtyptieren, direkt nach Absetzen von der Mutter, untersucht.

#### 3.4.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei jungen C57BL/6-Wildtyptieren

C57BL/6-Wildtyptiere wurden im Alter von drei Wochen mit *C. jejuni* B2 infiziert. An die letzte der drei konsekutiven peroralen Infektionen schlossen sich engmaschige, nach 14 Tagen wöchentliche Faecesentnahmen zur Erfassung der *C. jejuni*-Lasten an.

Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 103 nach der letzten Infektion konnte eine stabile *C. jejuni* B2-Besiedlung ( $9,0 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^5$  KBE/g bis  $5,6 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^7$  KBE/g) nachgewiesen werden (Abb. 30A). Zum Sektionszeitpunkt an Tag 103 konnte *C. jejuni* B2 im Bereich des gesamten Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden. Die höchste *C. jejuni* B2-Last fand sich mit  $1,1 \times 10^5 \pm 8,4 \times 10^5$  KBE/g im Colon (Abb. 30B)

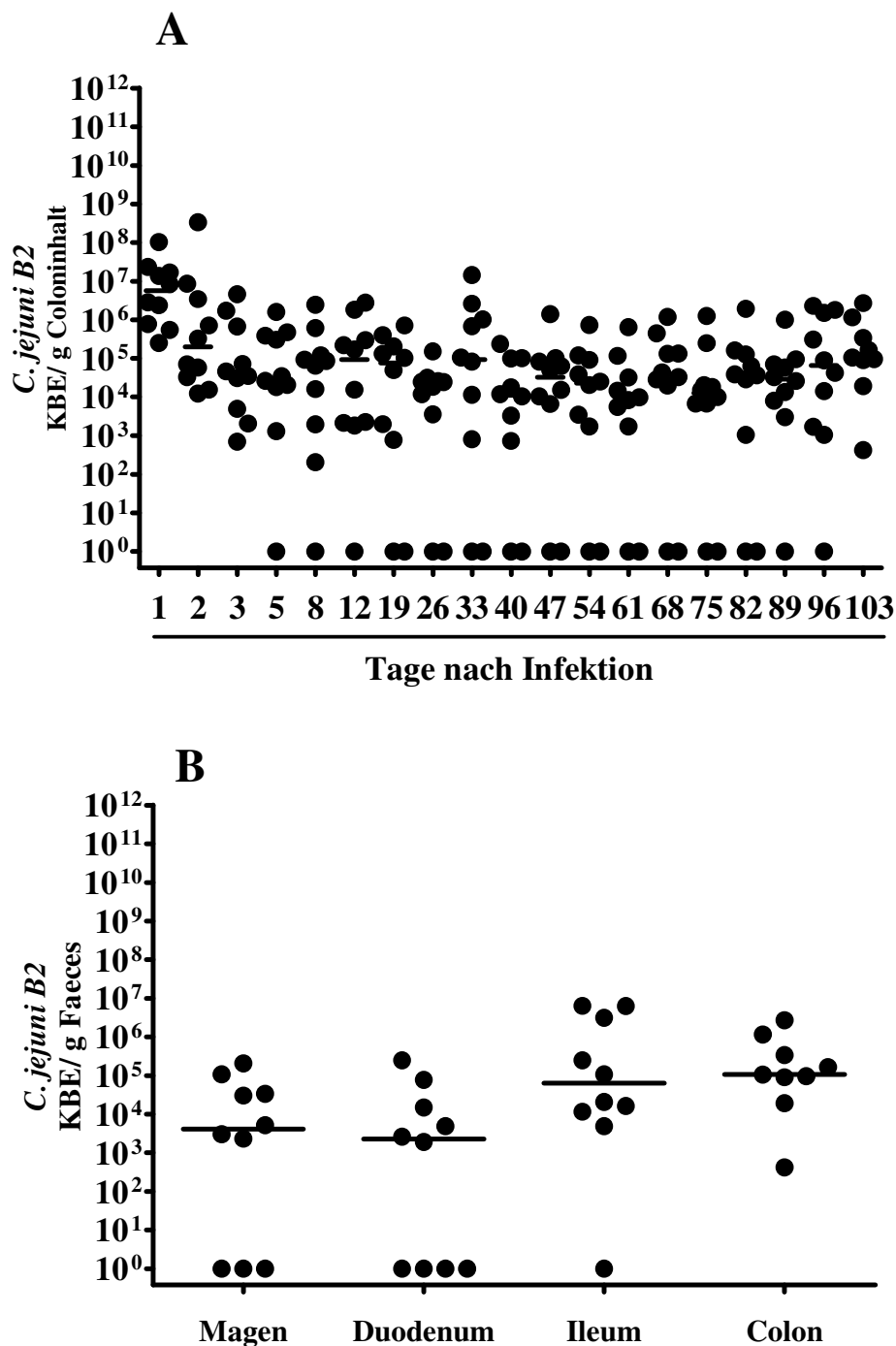
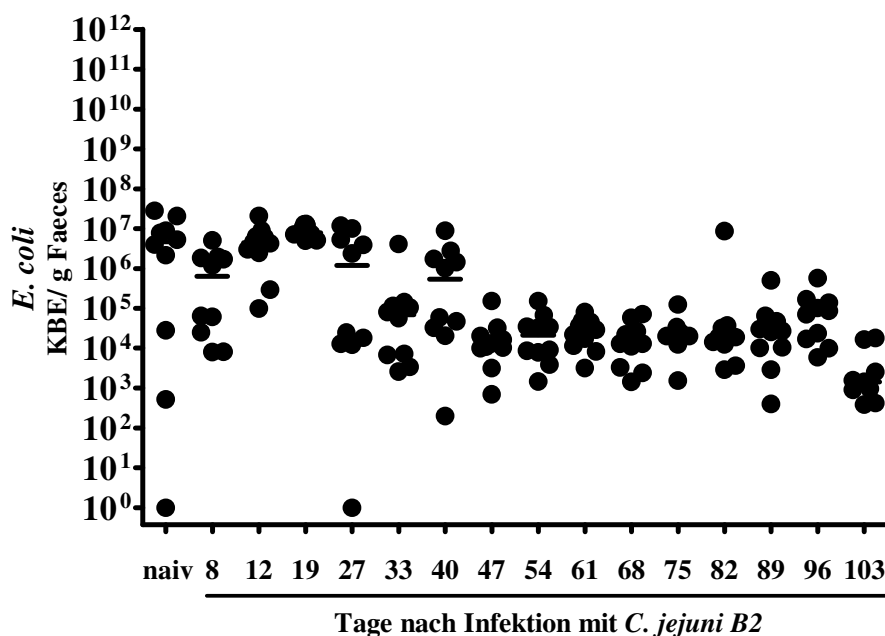


Abb. 30: *C. jejuni* B2-Lasten bei im Alter von 3 Wochen infizierten C57BL/6-Wildtypmieren. Gezeigt sind die *C. jejuni* B2-Lasten im Infektionsverlauf (A) sowie im Gastrointestinaltrakt an Tag 103 p.i. (B). Balken symbolisieren den Median.

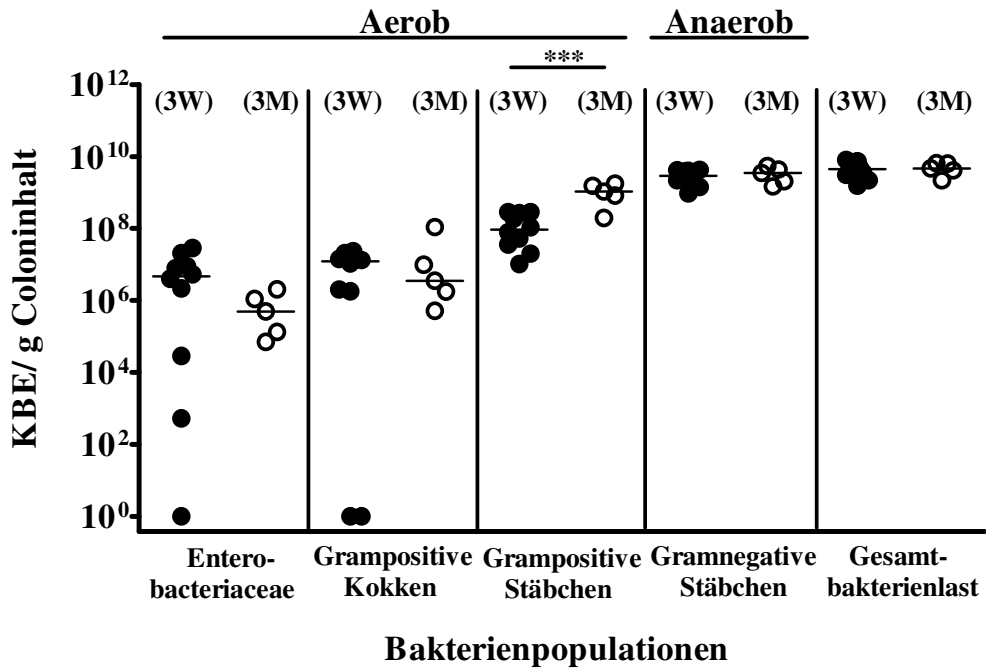
C57BL/6-Wildtypiere hatten im Alter von drei Wochen im Median eine *E. coli*-Last von  $4,7 \times 10^6 \pm 9,6 \times 10^6$  KBE/g. Im Infektionsverlauf konnte ein Abfall der *E. coli*-Last auf  $1,4 \times 10^3 \pm 7,2 \times 10^3$  KBE/g an Tag 103 nach der letzten Infektion beobachtet werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Kinetik der *E. coli*-Lasten bis Tag 103 p.i..** Gezeigt sind die *E. coli*-Lasten von Tieren, die im Alter von 3 Wochen mit *C. jejuni B2* infiziert wurden. Balken symbolisieren den Median.

### 3.4.1.1 Analyse der Darmflora 3-Wochen alter C57BL/6-Wildtypiere

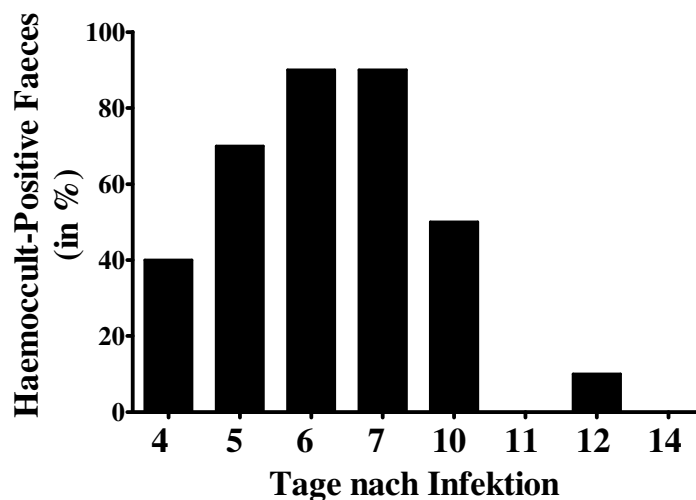
Direkt nach Absetzen von der Mutter und unmittelbar vor Infektion mit *C. jejuni B2* erfolgte eine kulturelle Analyse der kommensalen Darmflora von 3 Wochen alten C57BL/6-Wildtypieren. Im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen desselben Genotyps waren einzig die aeroben grampositiven Stäbchen (v.a. *Lactobacillus* spp.) signifikant niedriger, während die *Enterobacteriaceae*-Population tendenziell (ca. 1 logarithmische Stufe), jedoch nicht signifikant, höher war (Abb. 32).



**Abb. 32: Bakterienpopulationen im Colon von 3 Wochen (3W) und 3 Monate (3M) alten C57BL/6-Wildtypieren.** Dargestellt sind die Bakterienpopulationen im Colon bei 3 Wochen (3W) und 3 Monate (3M) alten C57BL/6-Wildtypieren. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.4.1.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion

Zum Nachweis von (okkultem) Blut im Stuhl wurden im Verlauf der *C. jejuni* B2-Infektion Haemocult-Teste durchgeführt. An Tag 6 und 7 nach der letzten Infektion war bei 90 % (9/10) der Tiere Blut im Faeces nachweisbar, während ab Tag 14 p.i. kein Blut im Faeces der Tiere mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 33).

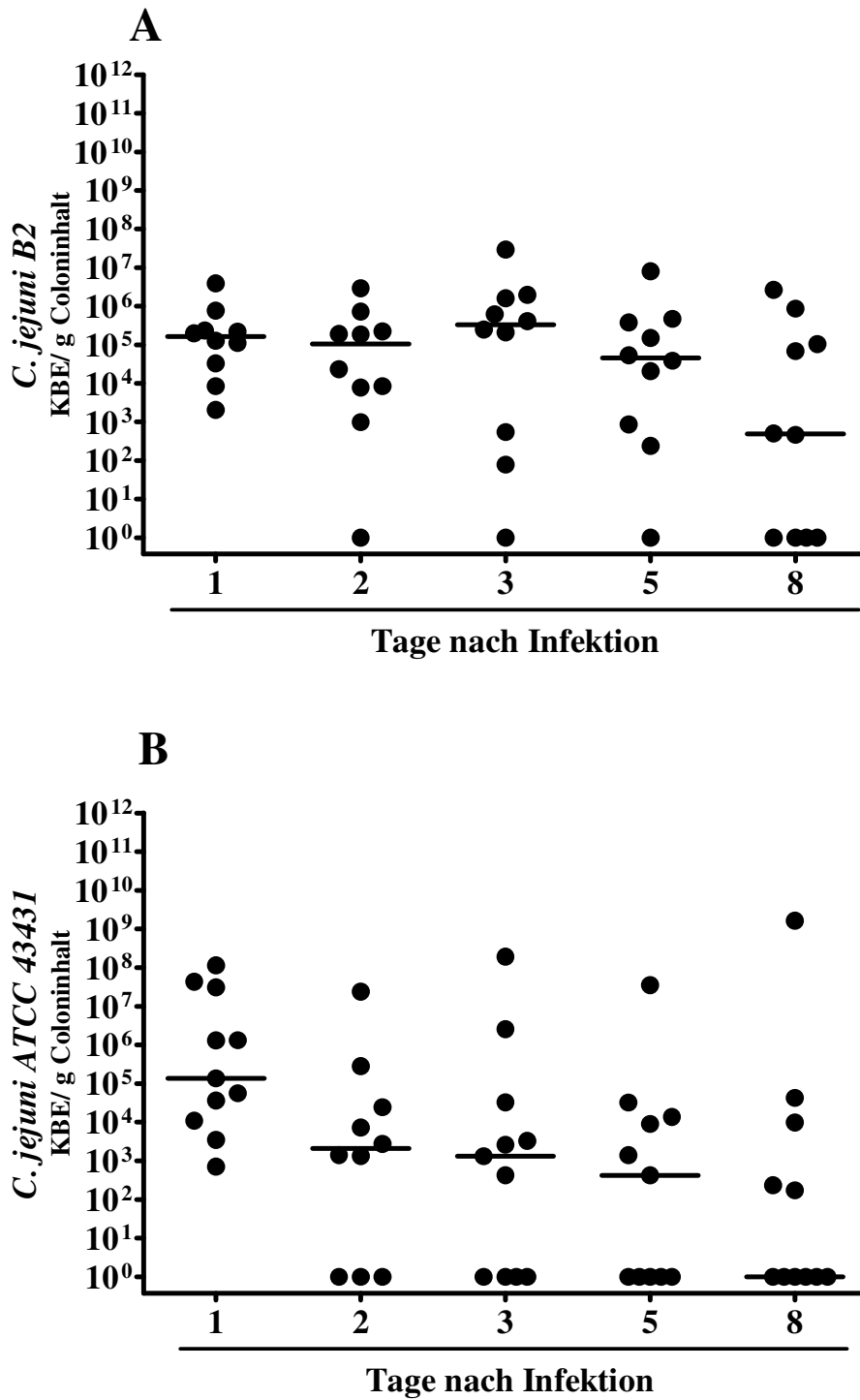


**Abb. 33: Kinetik positiver Haemocult-Nachweise im Verlauf der Infektion mit *C. jejuni* B2.** Gezeigt sind positive Haemocult-Nachweise weiblicher C57BL/6-Wildtypiere, welche im Alter von 3 Wochen mit *C. jejuni* B2 infiziert wurden.

### **3.4.2 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei jungen konventionell besiedelten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren**

Bei jungen, konventionell besiedelten C57BL/6-Wildtyp-Tieren führte die Infektion mit *C. jejuni* B2 zu einem stabilen Ansiedeln des Pathogens. Ähnlich dem klinischen Bild beim Menschen konnte darüberhinaus bei einem Großteil der Tiere im Verlauf der Infektion Blut im Stuhl nachgewiesen werden. Um der menschlichen Entzündungsreaktion nach Infektion mit *C. jejuni* näherzukommen und eine ausgeprägte Immunantwort hervorzurufen, wurden im Folgenden IL10<sup>-/-</sup>-Tiere im C10-Hintergrund direkt nach Absetzen von der Mutter mit *C. jejuni* B2 bzw. *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert.

Unabhängig vom verwendeten *C. jejuni*-Stamm konnte im zeitlichen Verlauf ein Rückgang der *C. jejuni*-Lasten bis zum Sektionszeitpunkt an Tag 8 nach der letzten Infektion beobachtet werden, wobei noch bei 60 % (6/10) der *C. jejuni* B2-infizierten und ca. 45 % (5/11) der *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tiere *C. jejuni* im Faeces nachgewiesen werden konnte (Abb. 34).



**Abb. 34: Kinetik der *C. jejuni*-Lasten bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren.** Dargestellt sind die *C. jejuni*-Lasten von Tieren, welche im Alter von 3 Wochen mit *C. jejuni* B2 (A) bzw. *C. jejuni* ATCC 43431 (B) infiziert wurden. Balken symbolisieren den Median.

### 3.4.2.1 *E. coli*-Lasten junger konventionell besiedelter C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere

Konventionell besiedelte 3 Wochen alte C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten 2 Tage nach der letzten *C. jejuni* B2-Infektion im Vergleich zum naiven Ausgangszustand einen signifikanten Abfall der *E. coli*-Last im Faeces um ca. 3 logarithmische Stufen (Abb. 35;  $p < 0,05$  –  $p < 0,01$ ). Auch in der Gruppe der *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tiere konnte im Infektionsverlauf ein Rückgang der *E. coli*-Last beobachtet werden. Es ergaben sich im Infektionsverlauf jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum naiven Ausgangszustand (nicht dargestellt).

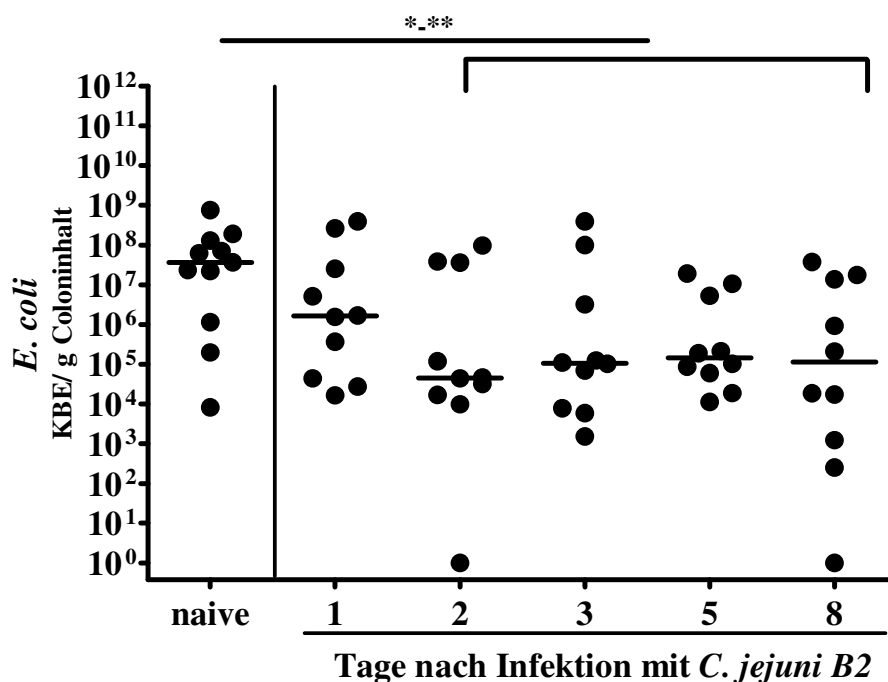
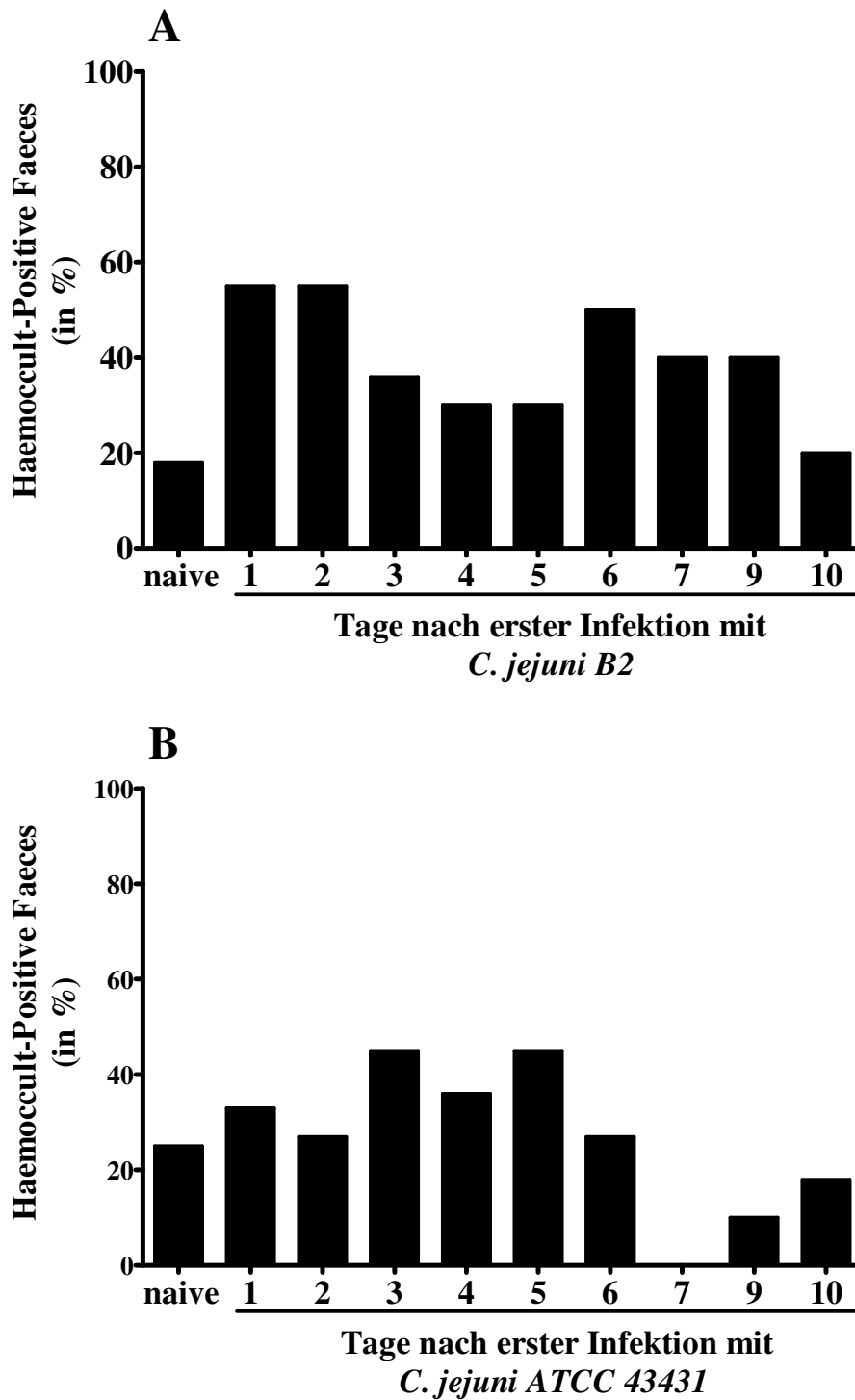


Abb. 35: Kinetik der *E. coli*-Lasten bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Dargestellt sind die *E. coli*-Lasten von Tieren, welche im Alter von 3 Wochen mit *C. jejuni* B2 infiziert wurden. Balken symbolisieren den Median.

### 3.4.2.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion

Nach *C. jejuni* B2-Infektion konnte an Tag 1 und 2 nach der ersten Infektion bei 6 von 11 (55 %) Tieren mikroskopisch Blut im Faeces nachgewiesen werden. Der Nachweis positiver Haemocult-Teste war im weiteren Infektionsverlauf mit 50 % an Tag 6 und 20 % an Tag 10 rückläufig (Abb. 36A). In der Gruppe der *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tiere konnte bis Tag 3 bzw. 5 nach der ersten Infektion ein Anstieg der positiven Nachweise auf 45 % (5/11) beobachtet werden (Abb. 36B). Auch bei nicht infizierten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren wurden an Tag 1, Tag 6 und Tag 9 ca. 20 % der Tiere positiv getestet. An den übrigen Tagen waren sämtliche Hämocult-Teste in der Kontrollgruppe negativ (nicht dargestellt).





**Abb. 36: Kinetik positiver Haemocult-Nachweise im Verlauf der Infektion mit *C. jejuni* B2 (A) und *C. jejuni* ATCC 43431 (B). Gezeigt sind positive Haemocult-Nachweise weiblicher und männlicher C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere, welche im Alter von 3 Wochen mit *C. jejuni* B2 oder *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert wurden.**

### 3.4.2.3 Klinischer „Score“ im Verlauf der Infektion

In Erweiterung zu dem im Vorangegangenen erläuterten Test auf (okkultes) Blut im Faeces wurde im Verlauf der *C. jejuni*-Infektion ein klinischer „Score“ erhoben, in den zusätzlich die Stuhlkonsistenz und der klinische Zustand der Tiere einging.

Ausgehend von einem klinischen „Score“ von  $1,2 \pm 1,3$  im naiven Zustand wurde im *C. jejuni* B2-Infektionsverlauf eine diskrete Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere bis zu einem „Score“ von  $2,7 \pm 1,7$  an Tag 6 nach der ersten Infektion verzeichnet (Abb. 37A). Tiere, welche mit *C. jejuni* ATCC 43431 infiziert wurden, wiesen im naiven Zustand im Mittel einen klinischen „Score“ von  $1,3 \pm 1,2$  auf. Im Infektionsverlauf konnte ein Anstieg auf  $3,1 \pm 2,7$  an Tag 3 verzeichnet werden (Abb. 37B). Die große Standardabweichung verdeutlichte, dass einige Tiere schwer beeinträchtigt waren, andere jedoch kaum eine Verschlechterung des klinischen Zustandes im Verlauf der Infektion mit *C. jejuni* aufwiesen. In der nicht infizierten Kontrollgruppe ergaben sich klinische „Scores“ zwischen  $0,3 \pm 0,5$  und  $1,2 \pm 1,1$  (nicht dargestellt).

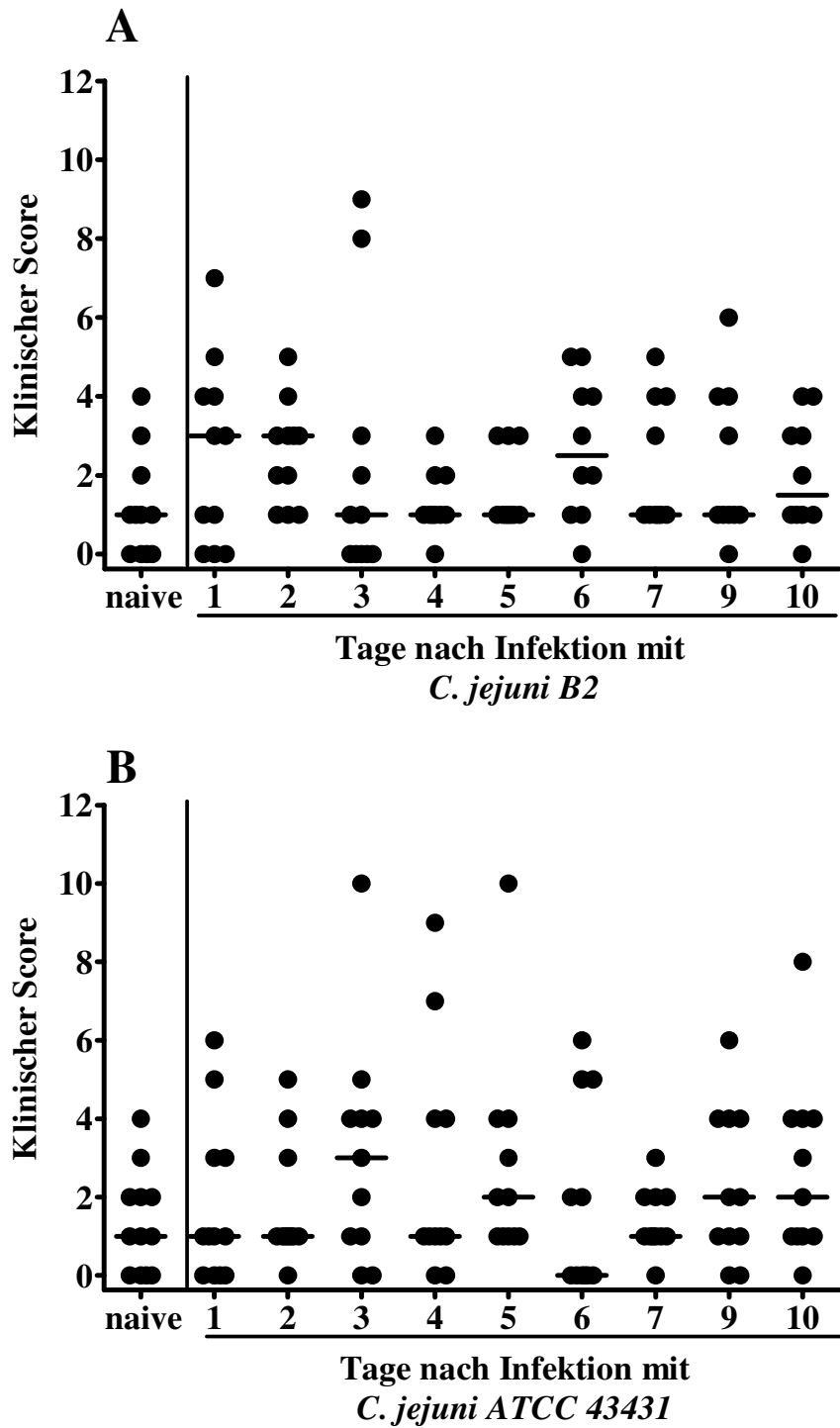


Abb. 37: Klinischer „Score“ 3 Wochen alter C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere im Verlauf der Infektion. Dargestellt sind die klinischen Scores *C. jejuni* B2 (A)- und *C. jejuni* ATCC 43431 (B)- infizierter Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert.

### 3.4.2.4 Analyse immunhistochemischer Parameter bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach *C. jejuni*-Infektion

Zur Untersuchung *Campylobacter jejuni*-vermittelter Immunantworten erfolgten an d8 p.i. *in situ* immunhistochemische Analysen von Colonschnitten. Folgende Zellmerkmale wurden untersucht: Caspase3, CD3, Foxp3, MPO7 und B220.

#### 3.4.2.4.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten

Nach Infektion mit beiden *C. jejuni*-Stämmen konnte im Vergleich zu naiven Tieren im Colon *in situ* ein signifikanter Anstieg von Caspase3-positiven apoptotischen Zellen sowie MPO7-positiven neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (Abb. 38;  $p < 0,05$  –  $p < 0,00005$ ).

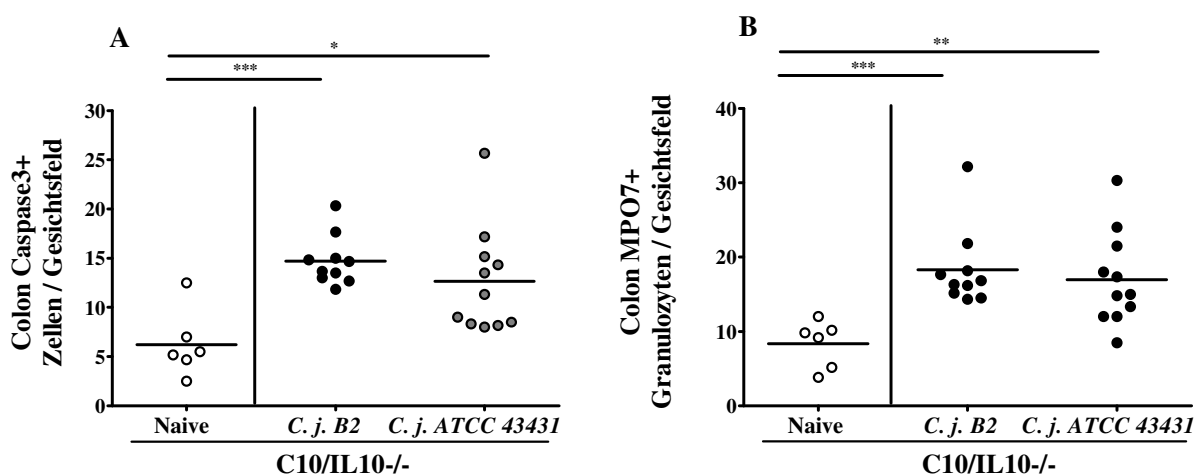


Abb. 38: Apoptotische Zellen (Caspase3-positiv - A) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv - B) bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni* B2 oder *C. jejuni* ATCC 43431. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

#### 3.4.2.4.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen

Hinsichtlich der Population CD3-positiver T-Zellen, Foxp3-positiver regulatorischer T-Zellen sowie B220-positiver B-Zellen führte die Infektion mit *C. jejuni*, unabhängig vom Stamm, zu einem signifikanten Anstieg gegenüber naiven Tieren (Abb. 39;  $p < 0,05$  –  $p < 0,001$ ).

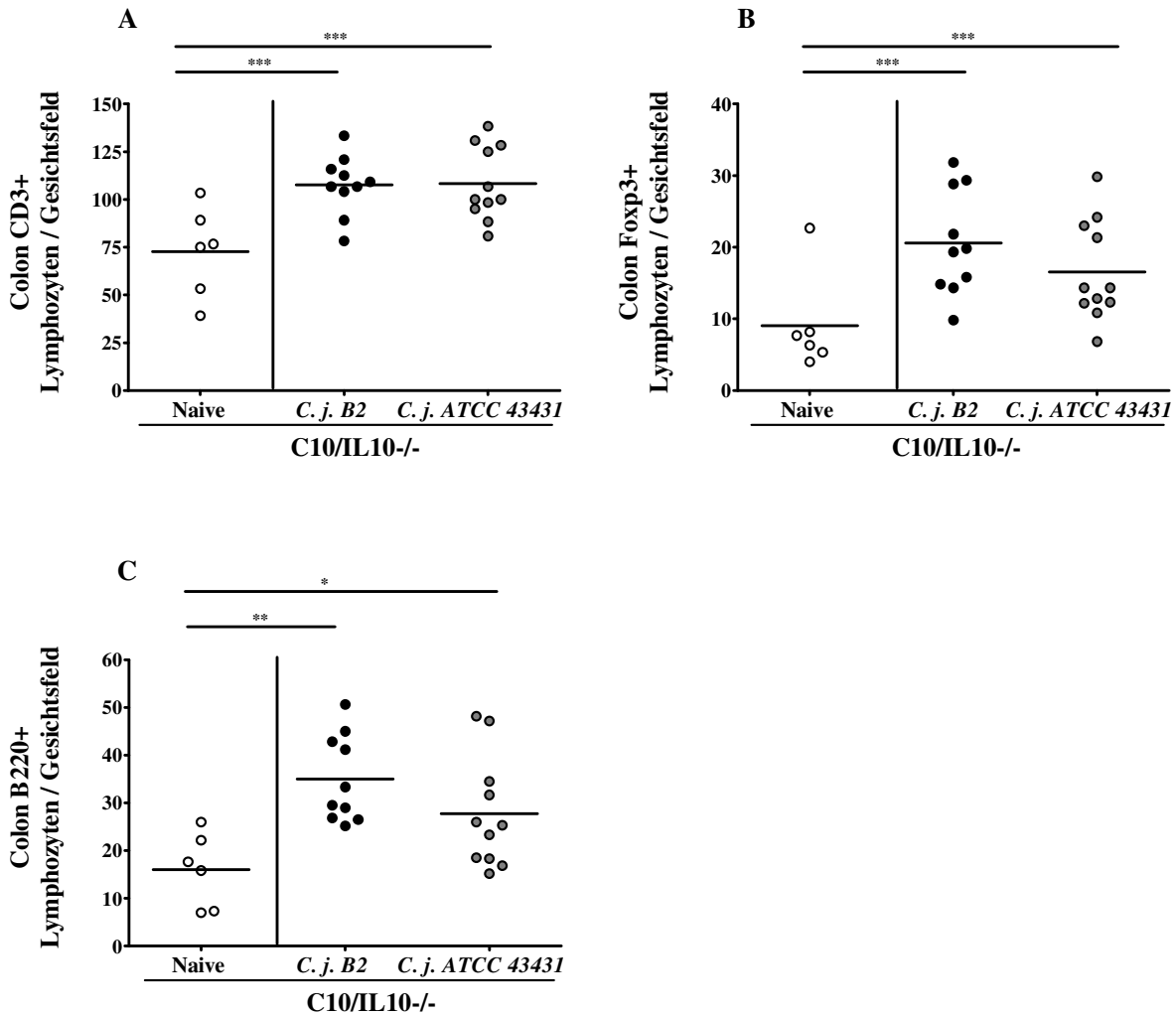


Abb. 39: T-Zellen (CD3-positiv - A), regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) und B-Zellen (B220-positiv - C) bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni* B2 oder *C. jejuni* ATCC 43431. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.4.2.5 Zytokinmessung aus Organkulturüberständen

Mit dem Ziel, die Immunantwort infizierter Tiere näher zu untersuchen, wurden Zytokinbestimmungen aus Organkulturüberständen des Colons durchgeführt.

Nach Infektion mit *C. jejuni* B2 wurde im Vergleich zu naiven Kontrollen eine signifikant höhere IFN- $\gamma$ - und MCP-1-Sekretion aus Colon-Kulturüberständen gemessen, während die Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 nur zu einem signifikanten Anstieg der IFN- $\gamma$ - Sekretion führte und die gemessene MCP-1-Sekretion sich nicht von naiven Kontrolltieren unterschied (Abb. 40;  $p < 0,05$  –  $p < 0,005$ ). Die Infektion mit *C. jejuni* führte zu keinem signifikanten Anstieg von NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12p70 (nicht dargestellt).

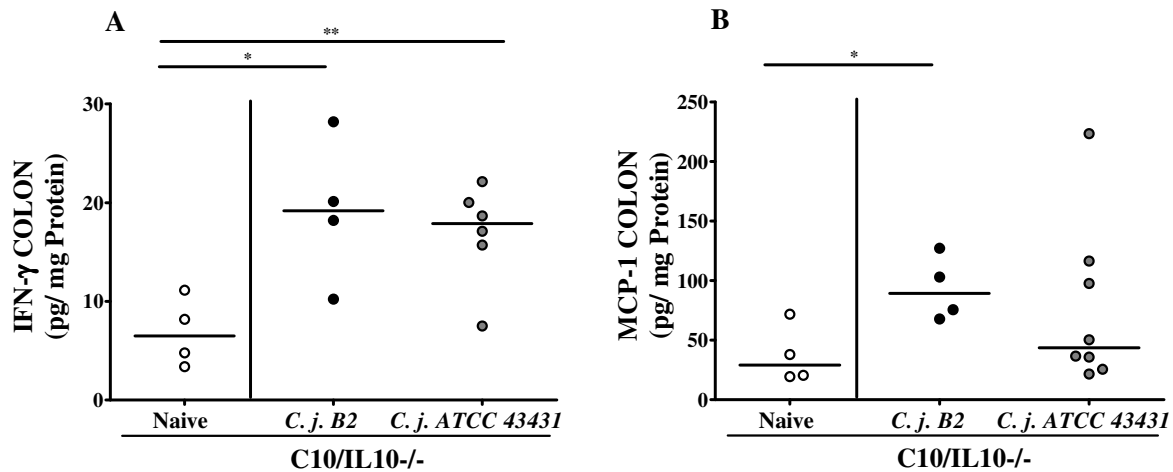


Abb. 40: Zytokin-Konzentrationen im Colon junger C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere nach Infektion mit *C. jejuni* B2 oder *C. jejuni* ATCC 43431. Gezeigt sind die IFN- $\gamma$  Konzentrationen (A) sowie MCP1-Konzentrationen (B) aus Organkulturüberständen des Colons. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für infizierte Tiere. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.5 Gnotobiotische C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere

In dem im Vorangegangenen beschriebenen Modell junger C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere war im Verlauf der Infektion mit *C. jejuni* neben der beschriebenen Immunantwort eine diskrete Verschlechterung des klinischen Zustandes erkennbar. Allerdings konnten auch rückläufige *C. jejuni*-Lasten beobachtet werden.

Im Folgenden entwickelten wir ein Mausmodell, in dem zum einen *C. jejuni* stabil ansiedeln konnte und zum anderen eine dem Menschen vergleichbare Immunpathologie ausgelöst wurde. Hierfür wurden C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere im Alter von 3 Wochen direkt nach Absetzen von der Mutter mit Antibiotika-Cocktail behandelt. Durch die Eradikation der Darmflora wurde der Trigger für die Entwicklung einer chronischen Colitis genommen. Im Alter von 3-4 Monaten, nach vollständiger Eradikation der Darmflora, erfolgte die Infektion mit *C. jejuni* bzw. *E. coli*.

#### 3.5.1 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren

Zum Sektionszeitpunkt an Tag 8 nach der letzten Infektion konnte eine stabile Kolonisierung beider *C. jejuni*-Stämme sowie von *E. coli* nachgewiesen werden. Im Median fanden sich ca. 10<sup>9</sup> KBE/g Coloninhalt (Abb. 41).

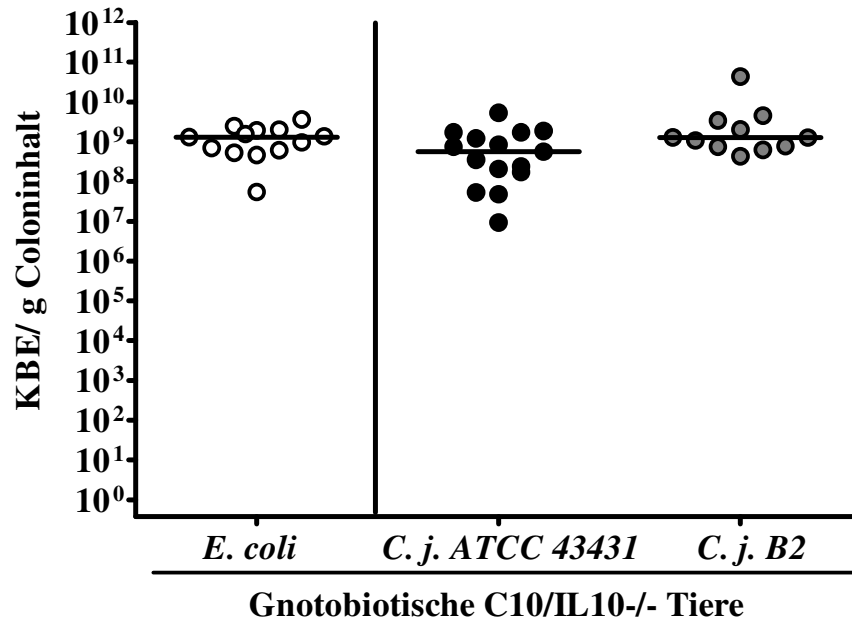


Abb. 41: *C. jejuni*- und *E. coli*-Lasten an Tag 8 nach Infektion gnotobiotischer junger C10/IL10<sup>-/-</sup> Tiere. Geschlossene Symbole zeigen *C. jejuni*-infizierte Tiere, offene Symbole zeigen *E. coli*-infizierte Kontrolltiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Median.

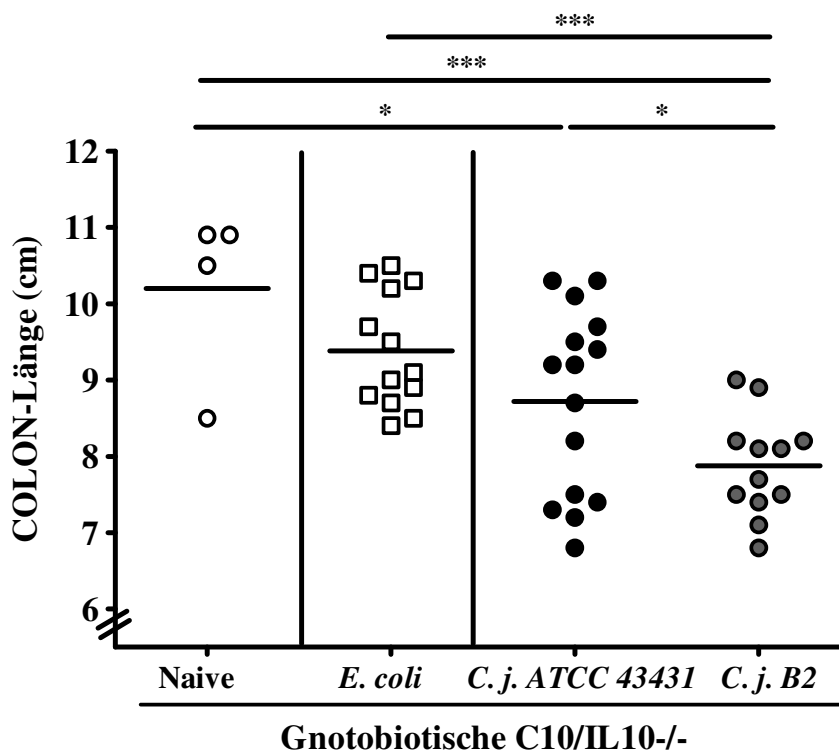
### 3.5.2 Klinisches Bild

Auf Grund der drastischen Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere wurde der Sektionszeitpunkt von Tag 12 nach der letzten Infektion auf Tag 8 vorverlegt.

Bei der Sektion der Tiere konnten bei *C. jejuni*-infizierten Tieren, nicht jedoch bei *E. coli*-infizierten, makroskopisch erkennbare, pathologische Veränderungen des Colons wie livide Verfärbungen des Darmes und eine Verdickung der Darmwand sowie blutiger, breiig flüssiger Stuhl festgestellt werden.

### 3.5.3 Bestimmung der Colonlänge

Im Vergleich zu naiven Tieren führte die Infektion mit *C. jejuni* B2 zu einer Verkürzung der Colonlänge um ca. 23 %, nach Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 kam es zu einer Verkürzung um ca. 15 %. *E. coli*-infizierte Tiere zeigten im Vergleich zu naiven Tieren keine signifikante Verkürzung des Colons (Abb. 42).



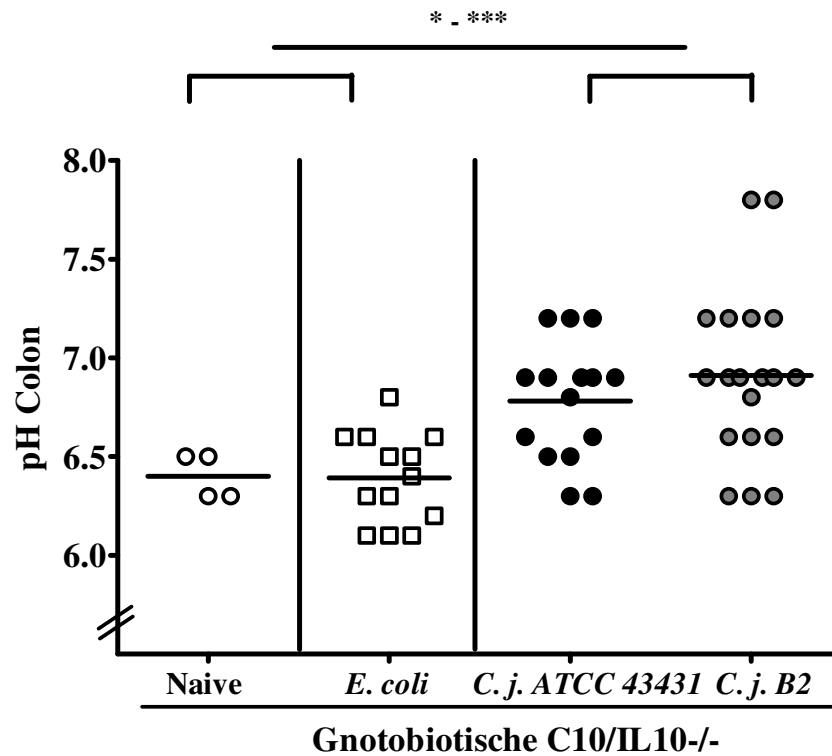
**Abb. 42: Colonlängenveränderung an d8 p.i.** Dargestellt sind die Colonlängen von gnotobiotischen jungen  $C10/IL10^{-/-}$ -Tieren im uninfizierten Zustand (Naive), sowie nach Infektion mit *C. jejuni* oder *E. coli*. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.5.4 Messung des pH-Wertes

*C. jejuni*-infizierte Tiere hatten 8 Tage nach Infektion signifikant alkalischere pH-Werte im Colon als *E. coli*-infizierte oder nicht infizierte Kontrollen (Abb. 43;  $p < 0,05$  –  $p < 0,0005$ ). Der pH-Wert des Colons lag bei *C. jejuni* B2-infizierten Tieren im Mittel bei  $6,91 \pm 0,42$ , *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere wiesen im Mittel einen pH-Wert von  $6,78 \pm 0,29$  auf. Bei *E. coli*-infizierten sowie nicht infizierten Kontrollen wurde im Mittel ein pH-Wert von  $6,39 \pm 0,22$  bzw.  $6,4 \pm 0,1$  gemessen (Abb. 43).

Die im Dünndarm gemessenen pH-Werte unterschieden sich hingegen nicht voneinander (nicht dargestellt).

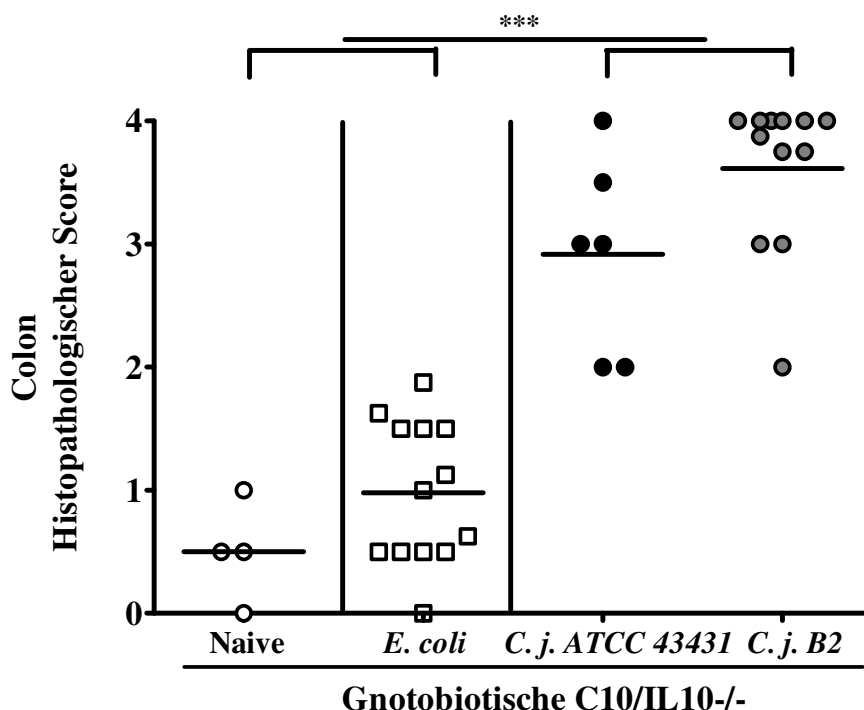




**Abb. 43: pH-Werte des Colons an d8 p.i.** Dargestellt sind die pH-Werte des Colons von gnotobiotischen jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren im uninfizierten Zustand (Naive), sowie nach Infektion mit *C. jejuni* oder *E. coli*. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.5.5 Histopathologie des Colons

Zur Beurteilung histopathologischer Veränderungen im Darm an Tag 8 p.i. wurden HE-gefärbte Colonschnitte anhand des OVA-Colitis-„Score“ bewertet. Hierbei wiesen *C. jejuni*-infizierte Tiere die ausgeprägteste Entzündung im Colon auf und wurden signifikant höher bewertet als *E. coli*-infizierte sowie nicht infizierte Tiere (Abb. 44; p < 0,0005). Des Weiteren wurden *C. jejuni* B2-infizierte Tiere im Mittel mit einem höheren „Score“ bewertet als *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 44).



**Abb. 44: Histopathologischer OVA-„Score“ des Colons junger gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Offene Symbole stehen für uninfizierte Tiere (Naive), sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

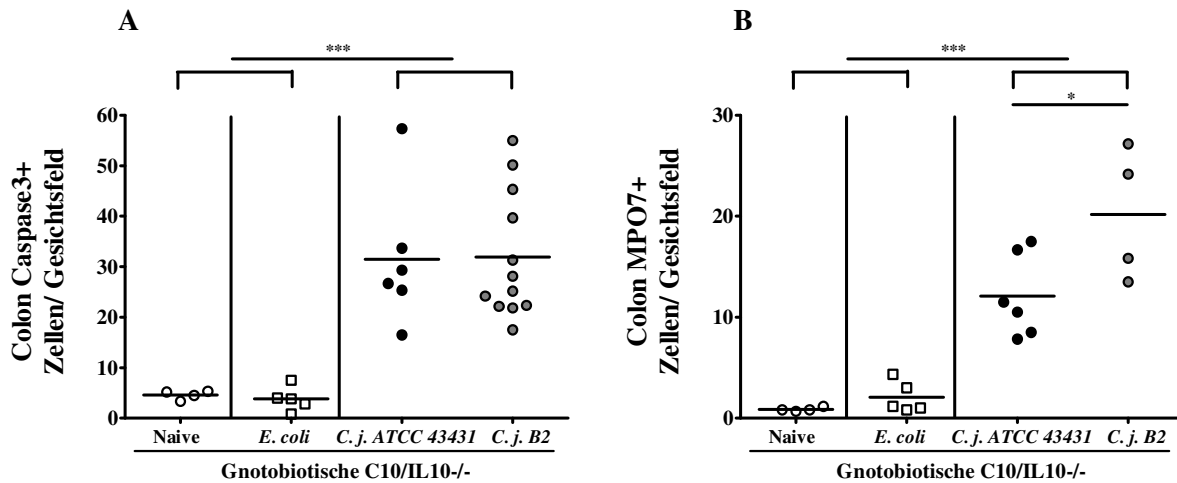
### 3.5.6 Analyse immunhistochemischer Parameter bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren

Die Infektion gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere führte zu makroskopisch sichtbaren Läsionen des Colons sowie blutigem, breiig, flüssigem Stuhlverhalten. Um *C. jejuni*-induzierte Immunreaktionen zu erfassen, erfolgten *in situ* immunhistochemische Analysen des Colons an Tag 8 nach der letzten Infektion. Folgende Zellmerkmale wurden untersucht: Caspase3, CD3, Foxp3, MPO7 und B220.

#### 3.5.6.1 Apoptose und Neutrophile Granulozyten

*C. jejuni*-infizierte Tiere wiesen an Tag 8 p.i. signifikant mehr Caspase3-positive apoptotische Zellen und MPO7-positive neutrophile Granulozyten im Colon *in situ* auf als *E. coli*-infizierte und naive Tiere (Abb. 45; p < 0,005 – p < 0,0005). Tiere, die mit *E. coli* infiziert worden waren unterschieden sich nicht von nicht infizierten Tieren (Abb. 45). Des Weiteren war der Anstieg

neutrophiler Granulozyten bei *C. jejuni* B2 infizierten Tieren signifikant höher als nach Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 (Abb. 45B;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 45: Apoptotische Zellen (Caspase3-positive - A) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv – B) bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren.** Offene Symbole stehen für naive Tiere, sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.5.6.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen

Analog zu den Veränderungen apoptotischer Zellen und neutrophiler Granulozyten kam es nach Infektion mit *C. jejuni*, unabhängig vom verwendeten Stamm, nicht aber nach Infektion mit *E. coli* zu einem signifikanten Anstieg CD3-positiver T-Zellen, Foxp3-positiver regulatorischer T-Zellen sowie B220-positiver B-Zellen (Abb. 46;  $p < 0,005$ ).

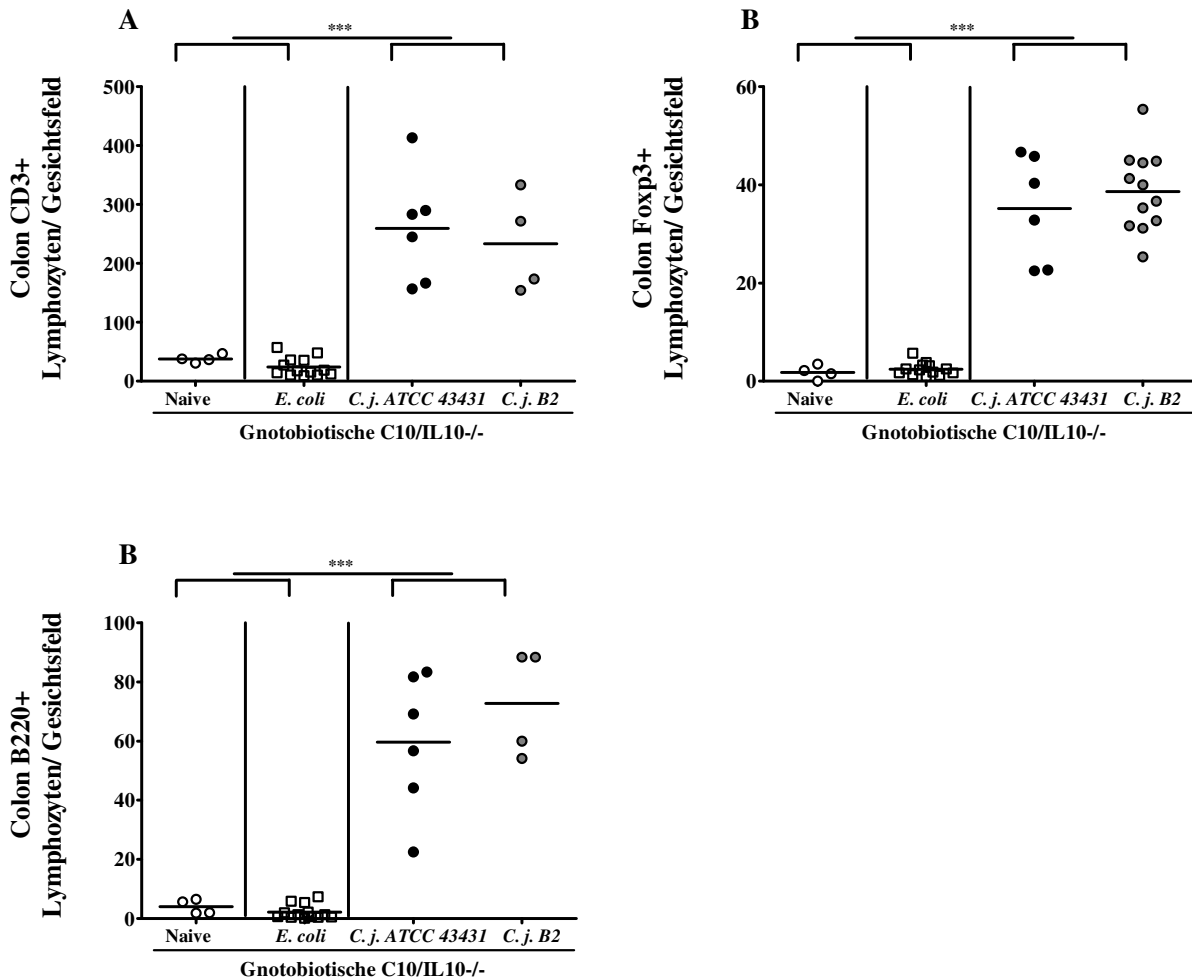
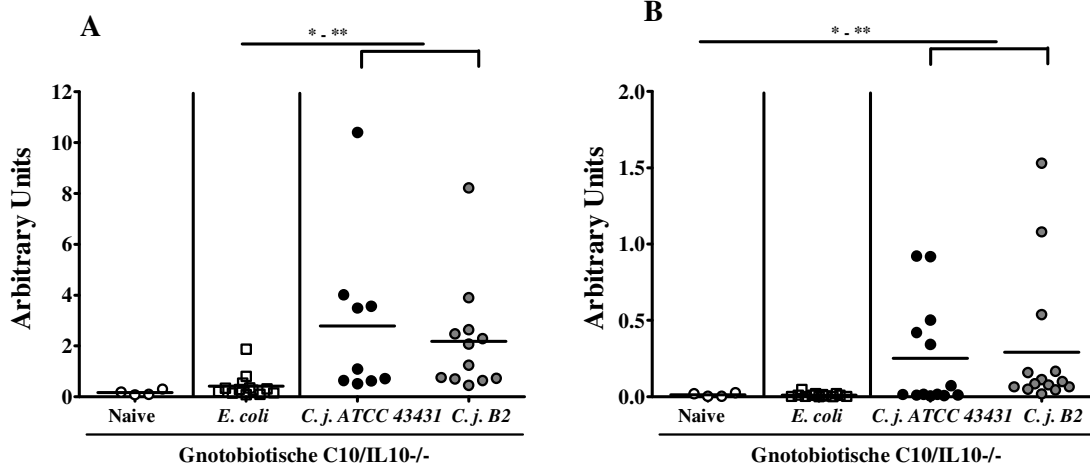


Abb. 46: T-Zellen (CD3-positiv - A), regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) und B-Zellen (B220-positiv - C) bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.5.7 mRNA-Expression im Colon

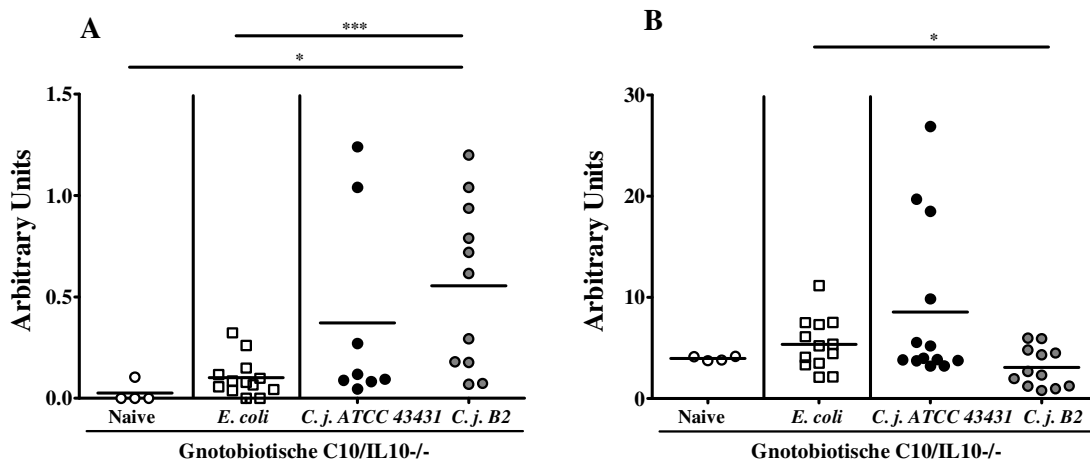
#### 3.5.7.1 Proinflammatorische Zytokine im Colon

Nach Infektion mit *C. jejuni* konnte auf mRNA-Ebene ein Anstieg der Expression von TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Abb. 47;  $p < 0,05$  –  $p < 0,01$ ). Unterschiede zwischen den beiden *C. jejuni*-Gruppen waren nicht signifikant.



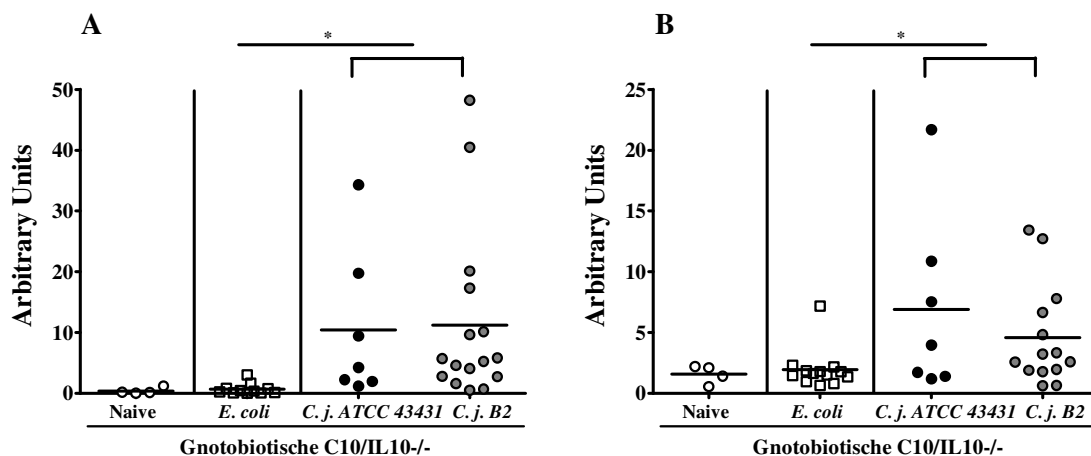
**Abb. 47: TNF- $\alpha$  (A) und IFN- $\gamma$  (B) mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die Ergebnisse der TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ -mRNA-Messungen. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

Mit *C. jejuni* B2 infizierte Tiere wiesen eine im Vergleich zu *E. coli*-infizierten und naiven Tieren signifikant höhere Expression von IL-6 mRNA im Colon auf (Abb. 48A; p < 0,05 – p < 0,005). Auch *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere hatten im Mittel eine höhere IL-6 mRNA-Expression im Colon als *E. coli*-infizierte und naive Tiere, wobei der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 48A). Die Messung der IL-18 mRNA-Expression ergab einen Anstieg nach Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431, welcher jedoch nicht signifikant gegenüber den anderen Gruppen war (Abb. 48B). *C. jejuni* B2 infizierte Tiere zeigten signifikant weniger IL-18 mRNA im Colon als *E. coli* infizierte Tiere (Abb. 48B).



**Abb. 48: IL-6- und IL18-mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-6 (A)- und IL-18 (B)-mRNA-Messungen. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

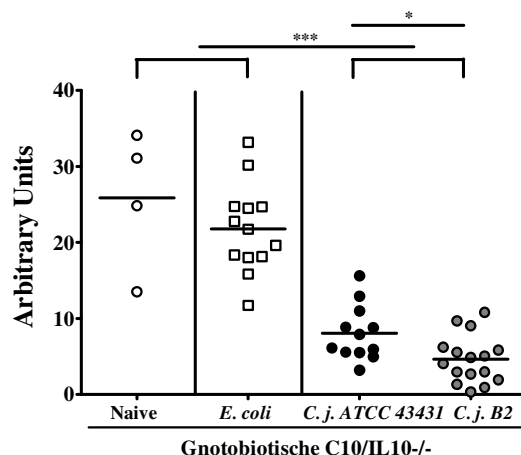
Bei der Untersuchung der mRNA-Expression der Zytokine IL-22 und IL-23p19 konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni*-infizierte Tiere signifikant höhere Werte aufwiesen als *E. coli*-infizierte Tiere, während zwischen den beiden verwendeten *C. jejuni*-Stämmen kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abb. 49;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 49: IL-22- und IL-23p19-mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-22 (A)- und IL-23p19 (B)-mRNA-Messungen. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.5.7.2 MUC2 mRNA-Expression im Colon

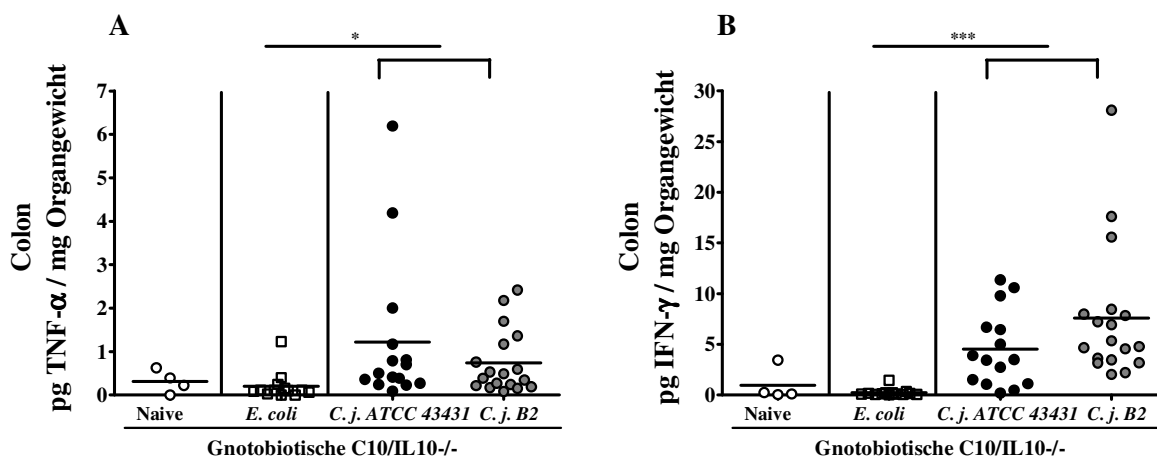
Im Vergleich zu *E. coli*-infizierten sowie naiven Kontrollgruppen wurde bei *C. jejuni*-infizierten Tieren signifikant weniger MUC2 mRNA im Colon gemessen (Abb. 50;  $p < 0,0005$ ). Des Weiteren konnte ein Unterschied hinsichtlich der beiden verwendeten *C. jejuni*-Stämme beobachtet werden. *C. jejuni* B2-infizierte Tiere hatten signifikant weniger MUC2 mRNA im Colon als *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere (Abb. 50;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 50: MUCIN 2 (MUC2) mRNA-Expression im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Muc2-mRNA-Messungen. Offene Symbole stehen für naive Tiere, sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.5.8 Zytokinbestimmung aus Colon-Organkulturüberständen

Hinsichtlich TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$  kam es nach Infektion mit *C. jejuni* nicht nur auf mRNA- sondern auch auf Proteinebene zu einem signifikanten Anstieg gegenüber *E. coli*-infizierten Tieren (Abb. 51;  $p < 0,05 - 0,0005$ ).

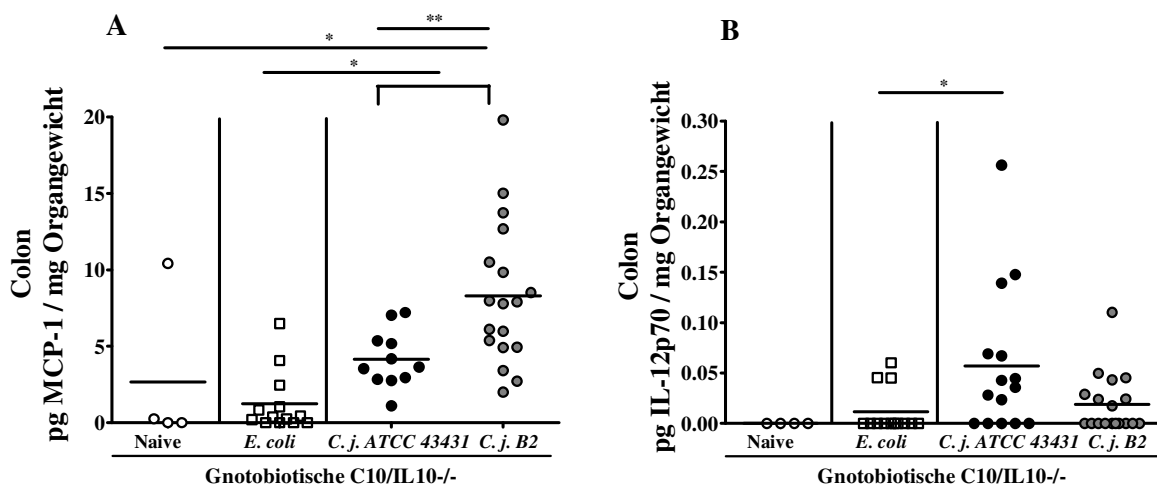


**Abb. 51: TNF- $\alpha$  (A)- und IFN- $\gamma$  (B)- Konzentrationen im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen bezogen auf das Organgewicht. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

Bei der Untersuchung von MCP-1 zeigten *C. jejuni*-infizierte Tiere signifikant höhere Konzentrationen als *E. coli*-infizierte Tiere (Abb. 52A;  $p < 0,005 - p < 0,0005$ ), wobei die höchsten MCP-1-Konzentrationen bei *C. jejuni* B2-infizierten Tieren gemessen wurden. Diese

waren signifikant höher als bei naiven Kontrolltieren sowie bei *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten Tieren (Abb. 52A;  $p < 0,05$  –  $p < 0,01$ ).

Hinsichtlich der Untersuchung der IL-12p70-Konzentration wiesen *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tieren signifikant höhere Konzentrationen auf als *E. coli*-infizierte (Abb. 52B;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 52: MCP-1-(A)- und IL-12p70-(B)-Konzentrationen im Colon gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere.** Dargestellt sind die MCP-1-Konzentrationen (A) und IL-12p70-Konzentrationen (B) bezogen auf das Organgewicht. Offene Symbole stehen für naive Tiere sowie *E. coli*-infizierte Kontrollen, geschlossene für *C. jejuni*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

*C. jejuni*-infizierte Tiere zeigten an Tag 8 nach der letzten Infektion signifikant höhere IL-22-Konzentrationen im Colon als *E. coli*-infizierte Tiere (Abb. 53;  $p < 0,05$  –  $0,01$ ). Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied der IL-22-Konzentrationen *E. coli*-infizierter und naiver Tiere festgestellt werden, wobei die große Standardabweichung unter den naiven Tieren auffiel und nicht erklärbar war (Abb. 53;  $p < 0,05$ ).

Beim Vergleich der IL-6-Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (nicht dargestellt).

Unabhängig von der Art der Normalisierung der Zytokinwerte (auf Protein- oder Organgewicht bezogen) waren die beschriebenen Unterschiede vergleichbar.





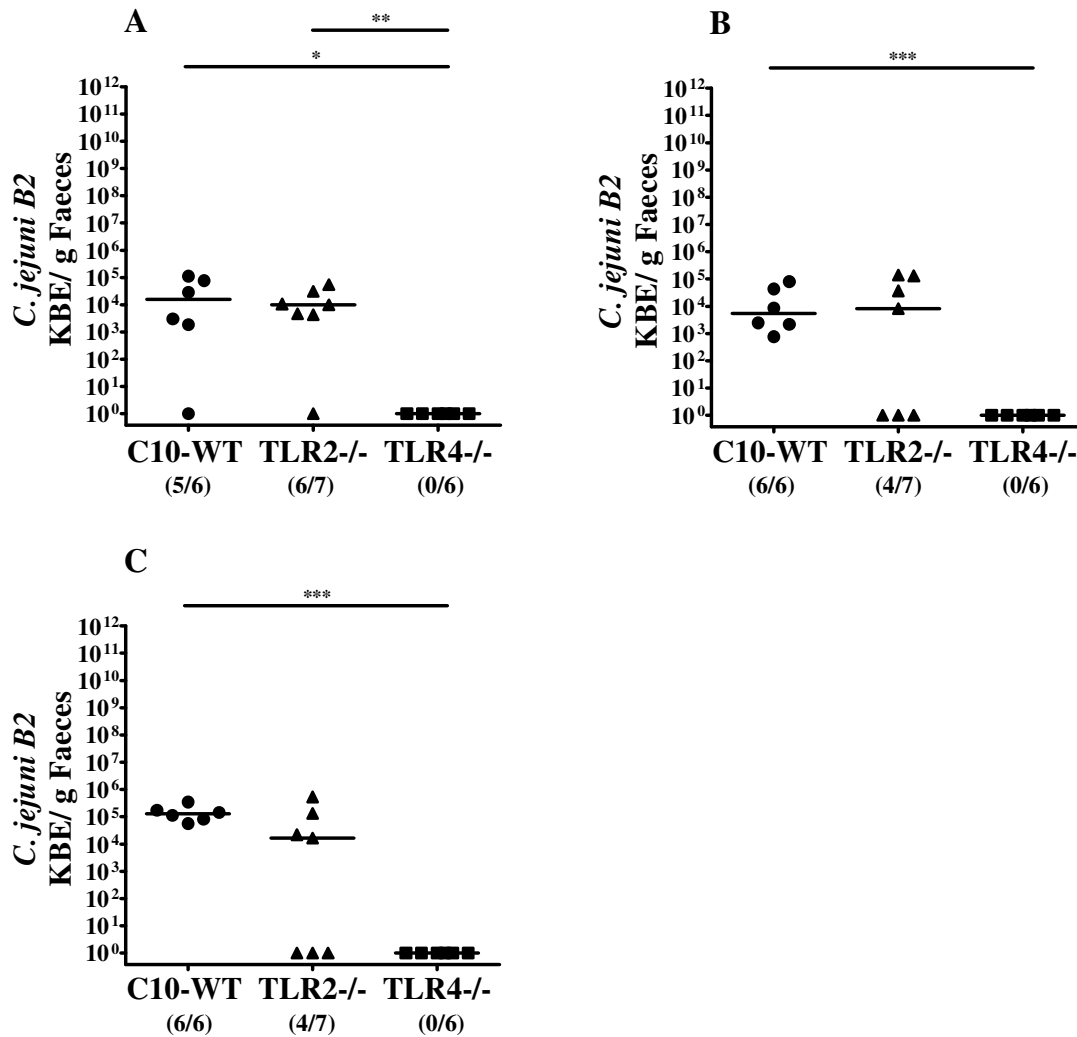
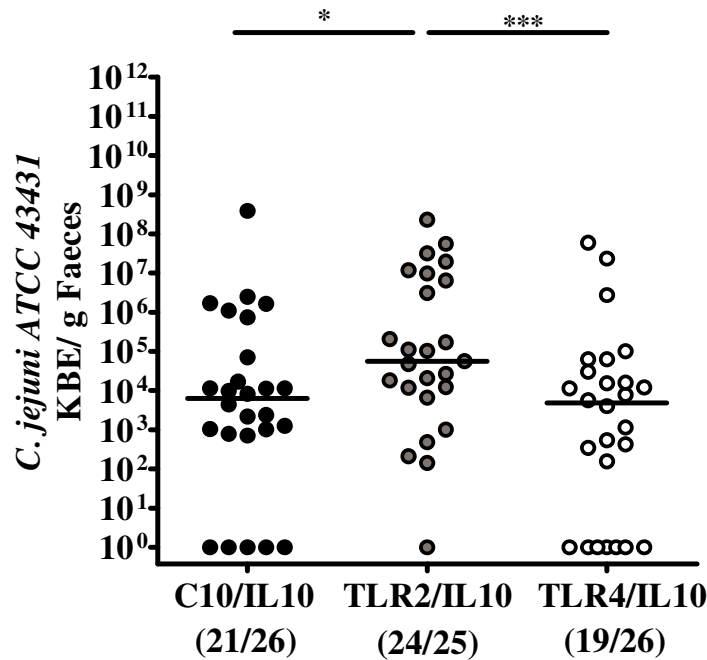


Abb. 54: *C. jejuni* B2-Lasten an Tag 1 (A), Tag 3 (B) und Tag 5 (C) nach Infektion. Dargestellt sind die *C. jejuni* B2-Lasten im Faeces von C57BL/10-Wildtyp-Tieren, TLR2<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>-Tieren. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,005).

### 3.6.2 Auswirkung der TLR/IL10- Doppel-Defizienz auf das Kolonisationsverhalten

Nach Infektion von im C57BL/10-Hintergrund gezüchteten IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren mit *C. jejuni* ATCC 43431 konnten an Tag 5 nach der letzten Infektion bei C10/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren vergleichbare *C. jejuni*-Lasten nachgewiesen werden. TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere hatten mit  $5,7 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^7$  KBE/g eine im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen signifikant höhere (ca. 1 logarithmische Stufe) *C. jejuni* ATCC 43431-Last im Faeces (Abb. 55; p < 0,05 und p < 0,005).



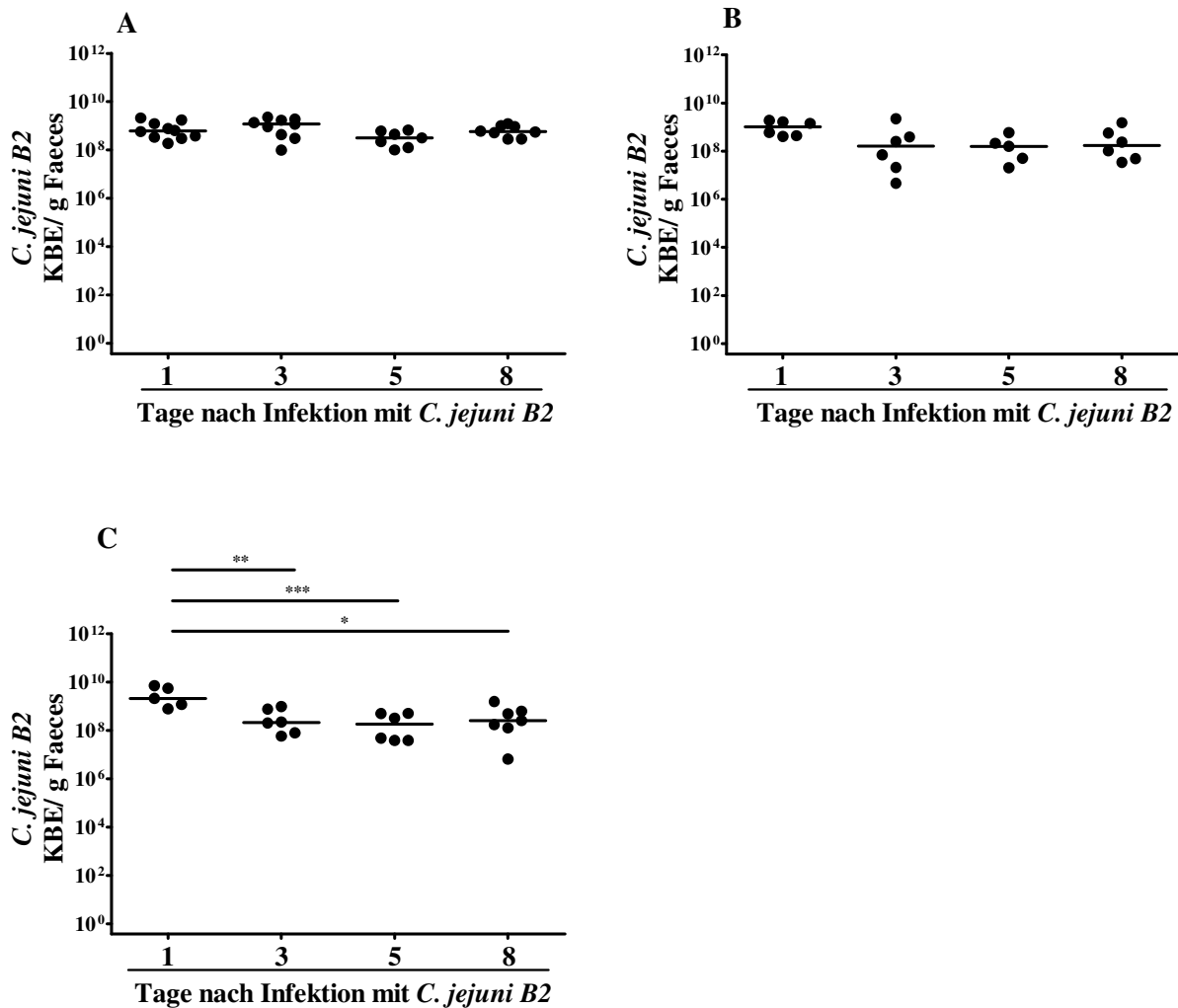
**Abb. 55: *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten an Tag 5 nach Infektion.** Dargestellt sind die *C. jejuni* ATCC 43431-Lasten im Faeces von C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

Die nähere Untersuchung der Bedeutung von TLR2 und TLR4 bei konventionell besiedelten Tieren mit IL10<sup>-/-</sup>-Colitis sowie die Charakterisierung der Immunantwort war Gegenstand einer Promotionsschrift, welche zeitgleich zu der vorliegenden Arbeit in unserer Arbeitsgruppe angefertigt wurde (Promotionsschrift Bettina Otto, unveröffentlicht).

### 3.6.3 Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren

Die Infektion von gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren, die direkt nach Absetzen von der Mutter ab der 3. Lebenswoche mit Antibiotika-Cocktail behandelt wurden, zeigte im Infektionsverlauf ein klinisches Bild, das dem beim Menschen mit *C. jejuni*-Enteritis ähnelte (Kap. 3.5). Im Folgenden sollte die Rolle von TLR2 und TLR4 in diesem akuten, durch *C. jejuni*-induzierten Inflammationsmodell untersucht werden. C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden direkt nach Absetzen von der Mutter im Alter von drei Wochen einer antibiotischen 5-fach Behandlung unterzogen. Nach vollständiger Eradikation der Darmflora wurden die gnotobiotischen Tiere mit *C. jejuni* B2 oder *E. coli* infiziert. Der kulturelle Nachweis der *C. jejuni* B2- bzw. *E. coli*-Last erfolgte an Tag 1, 3 und 5 nach der letzten Infektion sowie zum Sektionszeitpunkt an Tag 8.

In der Gruppe der *C. jejuni* B2-infizierten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum eine konstante, stabile *C. jejuni* B2-Besiedlung ( $3,2 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^8$  KBE/g bis  $1,2 \times 10^9 \pm 7,1 \times 10^8$  KBE/g) nachgewiesen werden (Abb. 56A). Bei *C. jejuni* B2-infizierten Tieren mit TLR2/IL10-Doppeldefizienz wurde ebenfalls eine stabile Besiedlung nachgewiesen (Abb. 56B). *C. jejuni* B2-infizierte TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten an Tag 3 p.i. einen diskreten Abfall der *C. jejuni* B2-Last um ca. 1 logarithmische Stufe, im weiteren Infektionsverlauf jedoch eine stabile Besiedlung (Abb. 56C;  $p < 0,05$  –  $p < 0,005$ )



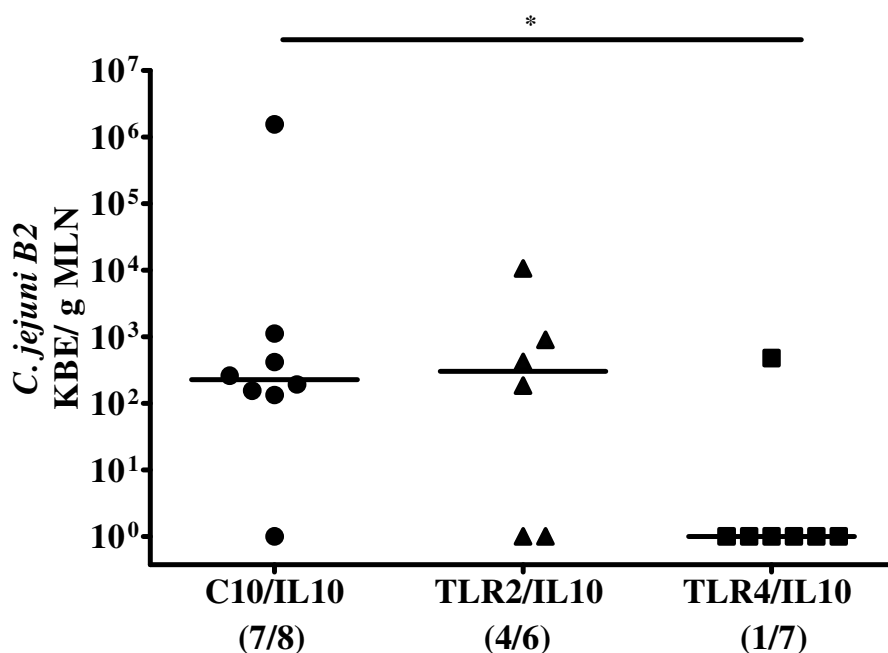
**Abb. 56:** Kinetik der *C. jejuni* B2-Lasten bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup> (A)-, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (B)- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (C)-Tieren. Dargestellt sind die *C. jejuni* B2-Lasten im Faeces an Tag 1, 3, 5 und 8 nach der letzten Infektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

Parallel zu den Kontrollen der *C. jejuni* B2-Lasten erfolgte bei den Kontrollgruppen der Nachweis der *E. coli*-Lasten. Alle Genotypen wiesen eine stabile *E. coli*-Besiedlung auf

( $1,1 \times 10^9 \pm 4,5 \times 10^8$  KBE/g bis  $3,6 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$  KBE/g). Zwischen den drei Genotypen bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der *E. coli*-Lasten (nicht dargestellt).

### 3.6.3.1 Translokation von *C. jejuni B2*

Mittels Anreicherungs- und Kultivierungsmethoden von mesenterialen Lymphknoten (MLN), Milz, Leber, Nieren und Vollblutproben wurde das Translokationsverhalten von *C. jejuni B2* analysiert. Bei ca. 88 % der C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere und ca. 67 % der TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere konnten lebende *C. jejuni B2* in MLNs nachgewiesen werden (Abb. 57). Unter den *C. jejuni B2*-infizierten TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren konnte dagegen lediglich bei einem von sieben Tieren (ca. 14 %) eine Translokation in MLNs nachgewiesen werden, wobei dieses Ergebnis im Vergleich zur Translokationsrate bei C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren statistisch signifikant geringer war (Abb. 57;  $p < 0,05$ ). In den übrigen untersuchten Organen bzw. im Blut konnte kein *C. jejuni B2* angezüchtet werden.



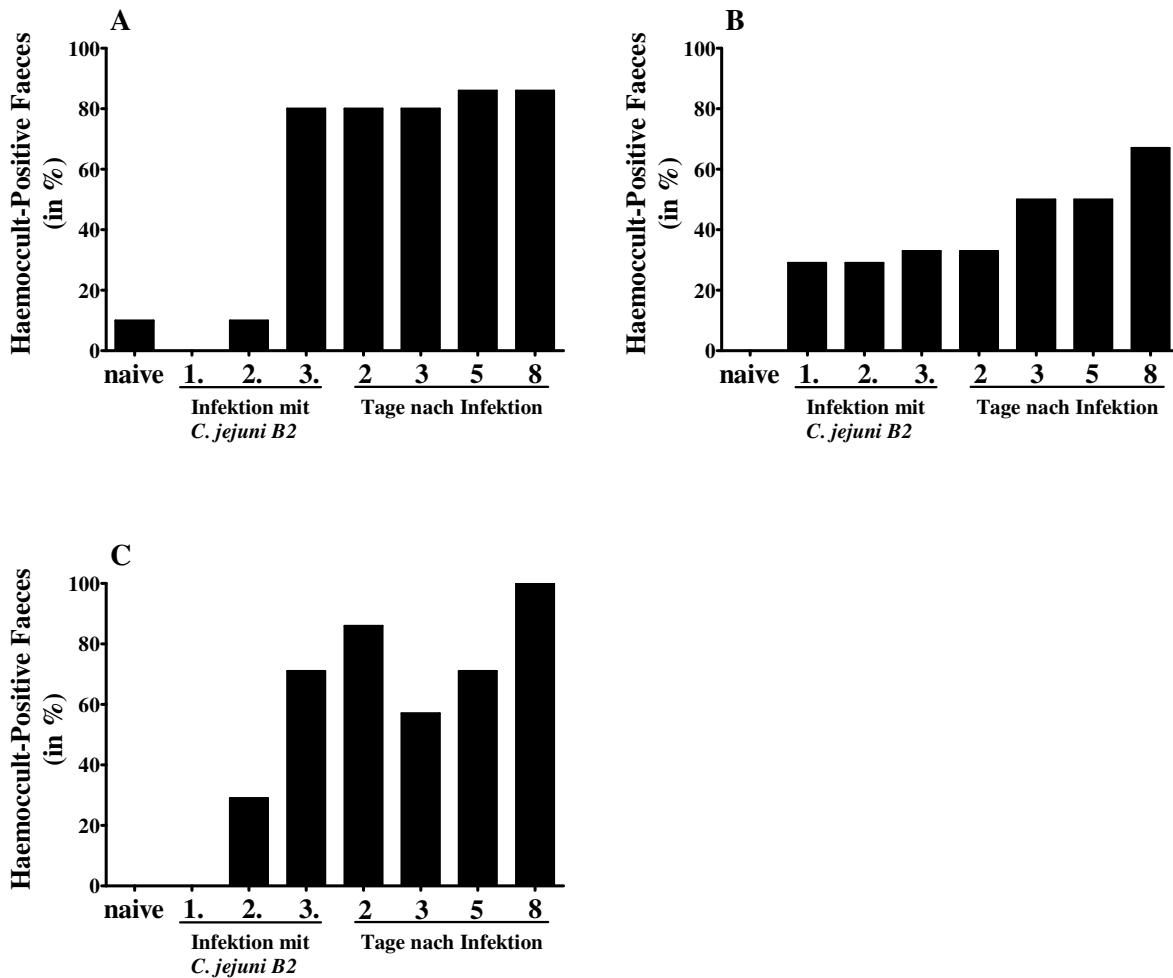
**Abb. 57:** *C. jejuni B2*-Translokation in mesenteriale Lymphknoten (MLN) an Tag 8 p.i.. Dargestellt ist die Translokation von *C. jejuni B2* in mesenteriale Lymphknoten von C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Anzahl der positiven Nachweise sowie die Anzahl der untersuchten Tiere sind in Klammern angegeben. Balken symbolisieren den Median. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

### 3.6.3.2 Haemocult-Test im Verlauf der Infektion

Im naiven Zustand wurde bei einer von zehn C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen okkultes Blut im Stuhl nachgewiesen. 48 Stunden nach der ersten der *C. jejuni* B2-Infektion waren 80 % der Tiere Haemocult positiv. Zum Sektionszeitpunkt konnte bei 86 % der Tiere Blut im Faeces nachgewiesen werden (Abb. 58A). Die Infektion der C10/IL10<sup>-/-</sup> mit *E. coli* führte nicht zu positiven Haemocult-Nachweisen (nicht dargestellt).

Auch in der Gruppe der *C. jejuni* B2-infizierten TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere konnten im Infektionsverlauf gehäuft positive Haemocult-Teste nachgewiesen werden. Zum Sektionszeitpunkt waren ca. 67 % der Tiere Haemocult positiv (Abb. 58B). Unter den *E. coli*-infizierten TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden 24 Stunden nach der ersten Infektion bei zwei von fünf Tieren ein positiver Haemocult-Test nachgewiesen. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu keinem positiven Nachweis mehr (nicht dargestellt).

Bei *C. jejuni* B2-infizierten TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden 24 Stunden nach der ersten Infektion ca. 29 % der Tiere positiv auf Blut im Faeces getestet. Im weiteren Verlauf war die Anzahl positiver Nachweise ansteigend und fiel nicht unter ca. 57 %. Zum Sektionszeitpunkt wurde bei allen Tieren Blut im Faeces nachgewiesen (Abb. 58C). *E. coli*-infizierte TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen zu keinem Zeitpunkt positive Haemocult-Teste auf (nicht dargestellt).



**Abb. 58: Kinetik positiver Haemocult-Nachweise im Verlauf der Infektion mit *C. jejuni* B2.** Dargestellt sind die positiven Haemocult-Nachweise nach Infektion mit *C. jejuni* B2 bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup> (A)-, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (B)- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (C)-Tieren.

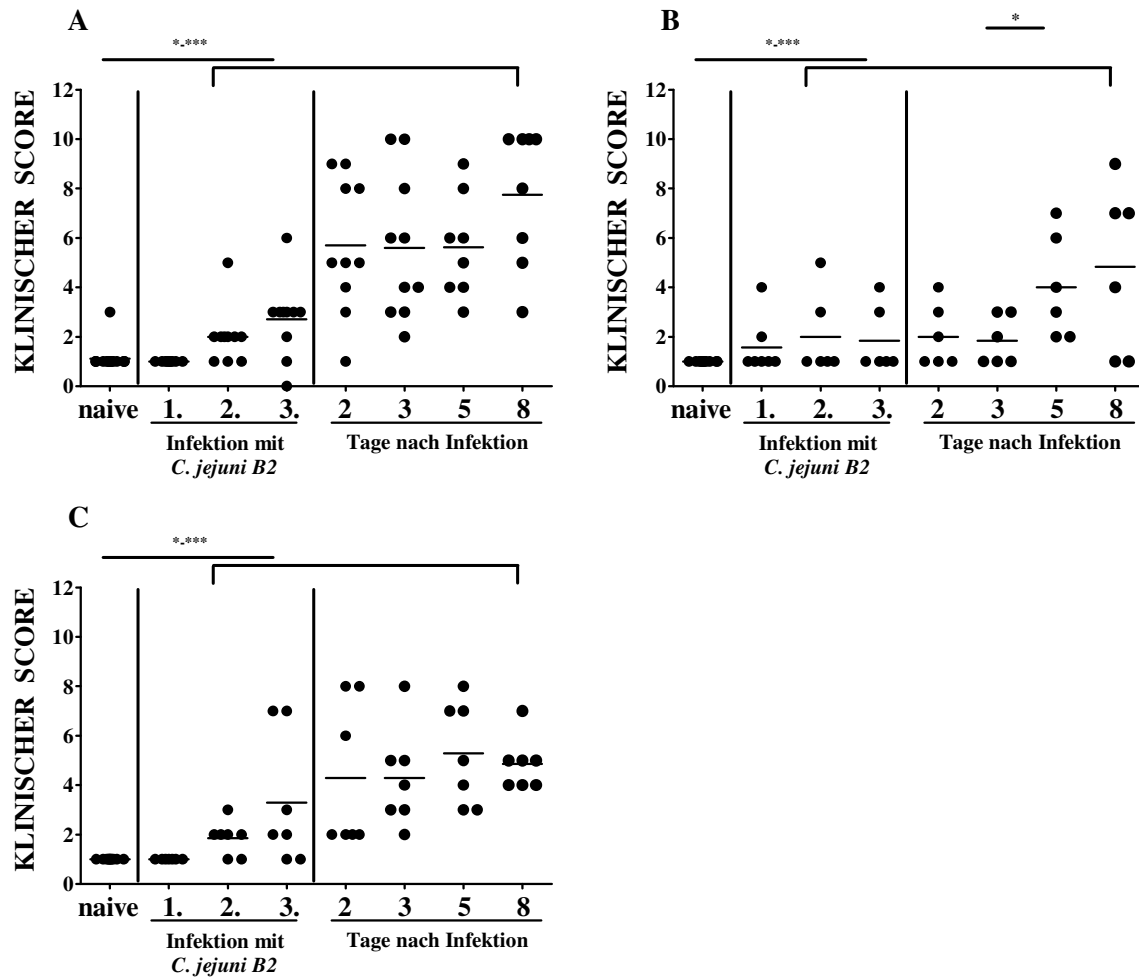
### 3.6.3.3 Klinischer „Score“ im Infektionsverlauf

Bis zum Sektionszeitpunkt an Tag 8 nach der letzten *C. jejuni* B2-Infektion wurde der Zustand der Tiere mittels eines klinischen „Scores“ täglich bestimmt. C10/IL10<sup>-/-</sup>- Tiere wiesen bereits 24 Stunden nach der ersten *C. jejuni* B2-Infektion einen, verglichen mit dem naiven Ausgangszustand, signifikant höheren klinischen „Score“ auf. Im weiteren Infektionsverlauf konnte im Mittel ein progredienter Anstieg bis zu einem Score von  $7,75 \pm 2,59$  zum Sektionszeitpunkt beobachtet werden (Abb. 59A;  $p < 0,05$  –  $p < 0,0005$ ). Der klinische Zustand der *E. coli*-infizierten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde mit Werten zwischen  $0,63 \pm 0,48$  und  $1,0 \pm 0,0$  beurteilt. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (nicht dargestellt).

*C. jejuni* B2-infizierte Tiere des Genotyps TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> wurden mit „Scores“ zwischen  $1,0 \pm 0,0$  und  $4,83 \pm 3,11$  bewertet. Wie auch bei C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren war der klinische „Score“ bereits 24 Stunden nach der ersten Infektion signifikant höher als im naiven Zustand. Im weiteren Verlauf war der klinische „Score“ bis Tag 3 nach der letzten Infektion zunächst stabil. Ab Tag 3 konnte eine signifikante Verschlechterung beobachtet werden (Ab. 59B;  $p < 0,05 - 0,0005$ ). In der Gruppe *E. coli*-infizierter TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere ergab die Beurteilung des klinischen Zustandes Werte zwischen  $0,8 \pm 0,4$  und  $2,0 \pm 1,11$ . Allerdings war zu keinem Zeitpunkt eine eindeutige Tendenz in Richtung einer Verschlechterung des klinischen Zustandes zu erkennen (nicht dargestellt).

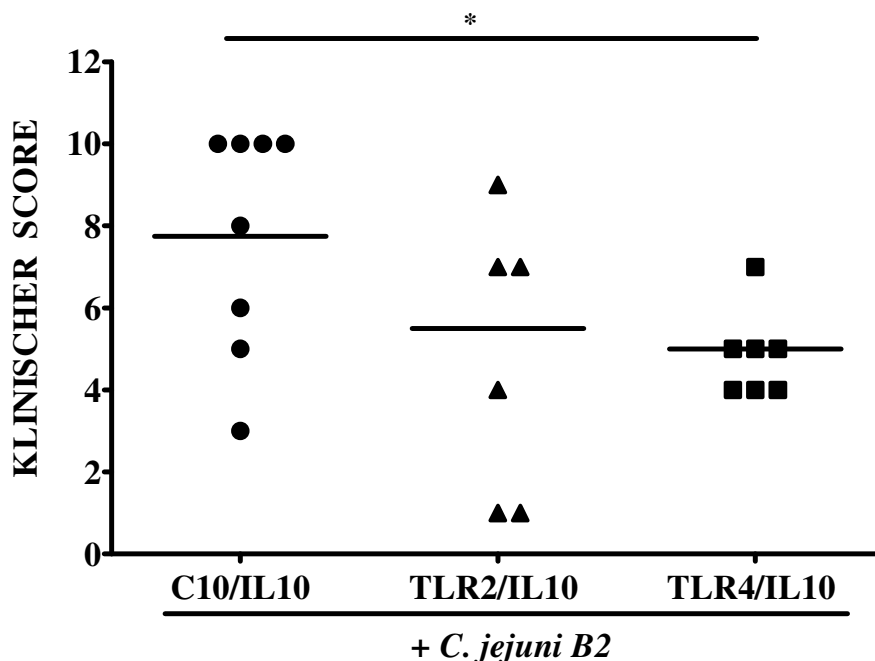
Die Beurteilung des klinischen Zustandes *C. jejuni* B2-infizierter Tiere des Genotyps TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> ergab Werte zwischen  $1,0 \pm 0,0$  und  $5,29 \pm 1,91$ . Wie bei den anderen beiden Genotypen, war der Zustand dieser Tiere ab dem Zeitpunkt 24 Stunden nach der ersten Infektion signifikant schlechter als vor Infektion mit *C. jejuni* B2 (Abb. 59C;  $p < 0,01 - p < 0,0005$ ). Mit *E. coli* infizierte TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Kontrolltiere hatten im Beobachtungszeitraum klinische „Scores“ zwischen  $0,75 \pm 0,43$  und  $1,75 \pm 0,43$ . Signifikante Unterschiede zum naiven Ausgangswert ergaben sich bei der Beurteilung des klinischen Zustandes an Tag 5 nach der letzten Infektion ( $p < 0,05$ ; nicht dargestellt).





**Abb. 59: Kinetik des klinischen „Score“ gnotobiotischer Tiere im Verlauf der *C. jejuni B2*-Infektion.** Dargestellt ist der klinische Score nach Infektion mit *C. jejuni B2* bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup> (A)-, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (B)- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (C)-Tieren. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,005).

Zum Sektionszeitpunkt war der klinische Zustand der C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere mit  $7,75 \pm 2,59$  signifikant schlechter als der der TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere, welche einen klinischen „Score“ von  $4,86 \pm 0,99$  aufwiesen (Abb. 60; p < 0,05). Bei TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren betrug der klinische „Score“ zu diesem Zeitpunkt im Mittel  $4,83 \pm 3,08$ , am ehesten auf Grund der großen Standardabweichung nicht signifikant gegenüber C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren.



**Abb. 60: Klinischer „Score“ an Tag 8 p.i..** Dargestellt ist der Klinische „Score“ bei C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni B2*. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

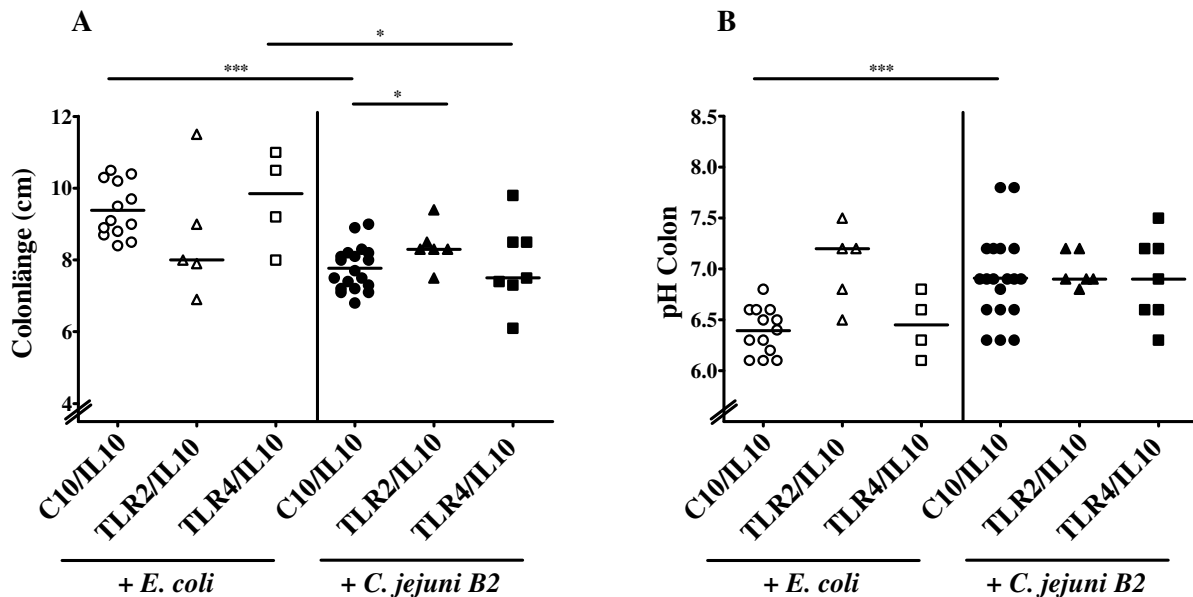
### 3.6.3.4 Darmlängenveränderung und pH-Werte

Hinsichtlich der absoluten Dünndarmlängen konnten weder zwischen *C. jejuni B2*-infizierten Gruppen noch im Vergleich *C. jejuni B2*-infizierter und *E. coli*-infizierter Tiere signifikante Unterschiede festgestellt werden (nicht dargestellt). Die Bestimmung der Colonlänge ergab unter den *C. jejuni B2*-infizierten Gruppen bei C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant kürzere Dickdärme als bei Tieren des Genotyps TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> (7,77 ± 0,61 gegenüber 8,38 ± 0,56; p < 0,05; Abb. 61A).

Der Vergleich *C. jejuni B2*-infizierter Tiere mit *E. coli*-infizierten Kontrollen des entsprechenden Genotyps ergab signifikante Unterschiede bei C10/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. So wiesen *C. jejuni B2*-infizierte C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu *E. coli*-infizierten um ca. 17 % verkürzte Dickdärme auf (7,77 ± 0,61 gegenüber 9,38 ± 0,73; p < 0,0005; Abb. 61A). *C. jejuni B2*-infizierte TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere hatten im Vergleich zu *E. coli*-infizierten um ca. 19 % kürzere Dickdärme (7,87 ± 1,09 gegenüber 9,68 ± 1,17; p < 0,05; Abb. 61A).

Als weiterer Parameter erfolgte die Bestimmung des intraluminalen pH-Wertes entlang des Gastrointestinaltraktes. Hierbei ergaben sich im Colon signifikante Unterschiede. *C. jejuni B2*-

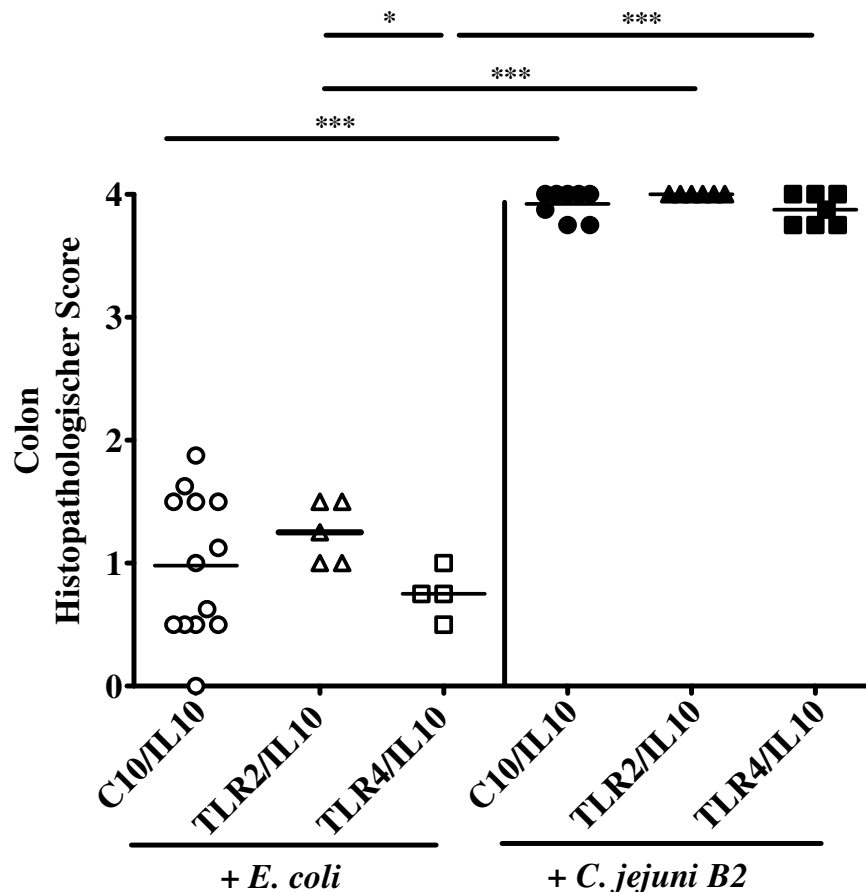
infizierte C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere hatten signifikant alkalischere pH-Werte als die entsprechenden *E. coli*-infizierten Kontrollen (6,91 ± 0,42 gegenüber 6,39 ± 0,22; p < 0,0005; Abb. 61B).



**Abb. 61: Colonlängen und pH-Werte im Colon an Tag 8 p.i.** Dargestellt sind die Colonlängen (A) und pH-Werte im Colon (B) bei C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni B2* oder *E. coli*. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Geschlossene Symbole stehen für *C. jejuni B2*-, offene Symbole für *E. coli*-infizierte Tiere. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.6.3.5 Histopathologie des Colons

Die Beurteilung der Histopathologie an HE-gefärbten Colonschnitten erfolgte mittels des OVA-Colitis-„Score“. Nach *C. jejuni B2*-Infektion zeigte sich bei allen Genotypen verglichen mit den korrespondierenden *E. coli*-infizierten Tieren ein signifikant höherer Colitis-„Score“ (Abb. 62; p < 0,0005). Die histologischen „Scores“ der *C. jejuni B2*-infizierten Tiere unterschieden sich nicht nennenswert voneinander (Abb. 62). Desweiteren wiesen unter den *E. coli*-infizierten Tieren TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse einen signifikant höheren histopathologischen „Score“ auf als TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb. 62; p < 0,05).

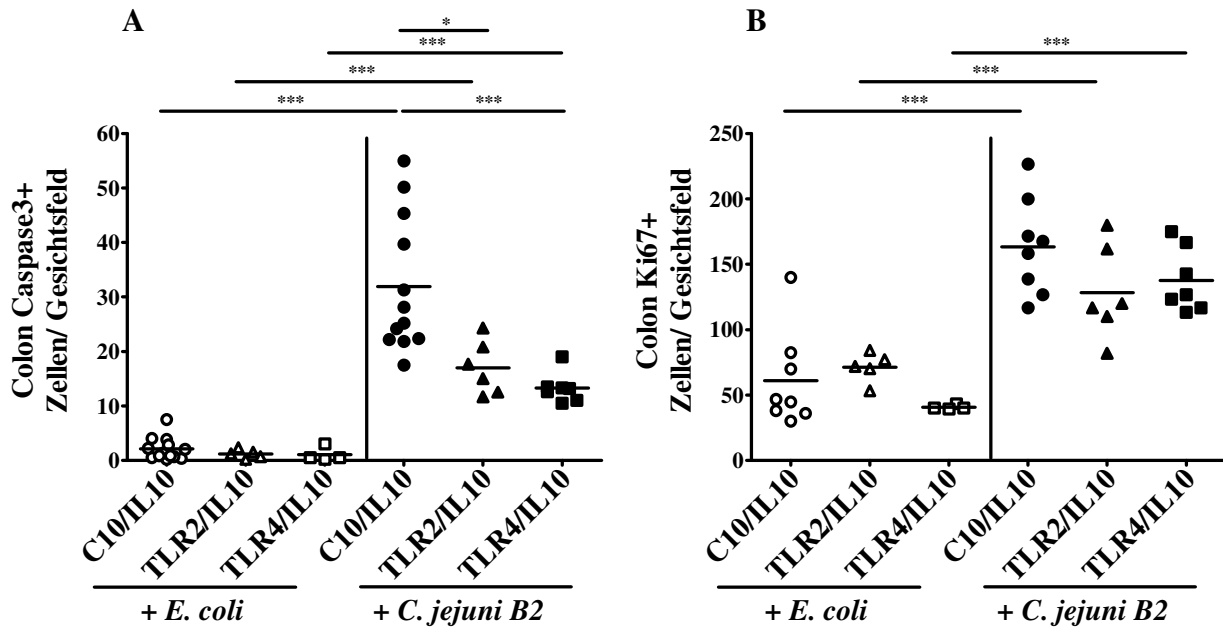


**Abb. 62: Histopathologischer „Score“ des Colons an Tag 8 p.i.** Gezeigt ist der histopathologische „Score“ *C. jejuni B2*- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.6.3.6 Analyse immunhistochemischer Parameter

#### 3.6.3.6.1 Apoptose und Proliferation

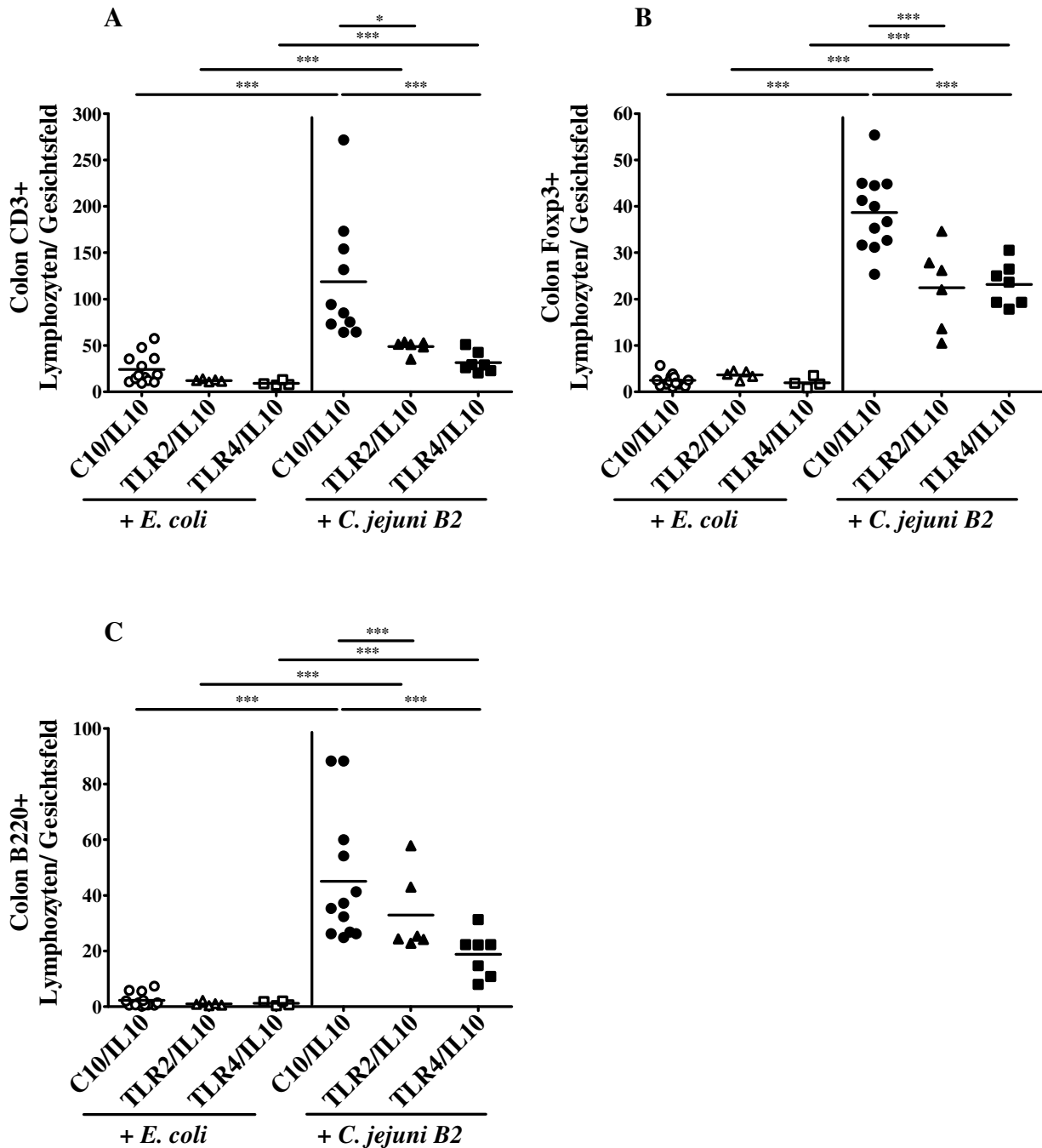
Die Infektion mit *C. jejuni B2* führte bei allen Genotypen, verglichen mit den entsprechenden *E. coli*-infizierten Gruppen, zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Caspase3-positiver apoptotischer Zellen und Ki67-positiver proliferativer Zellen im Colon *in situ* (Abb. 63; p < 0,01 – p < 0,005). Unter den *C. jejuni B2*-infizierten Tieren wiesen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere gegenüber TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant mehr apoptotische Zellen auf (Abb. 63A; p < 0,05 und p < 0,005).



**Abb. 63: Apoptotische (Caspase3-positiv - A) und proliferierende (Ki67-positiv - B) Zellen im Colon an Tag 8 p.i.** Gezeigt sind apoptotische (A) und proliferierende (B) Zellen im Colon *C. jejuni B2*- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Geschlossene Symbole stehen für *C. jejuni B2*-, offene Symbole für *E. coli*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.6.3.6.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen

*C. jejuni B2*-infizierte Tiere aller drei Genotypen hatten eine signifikant höhere Anzahl CD3-positiver T-Zellen, Foxp3-positiver regulatorischer T-Zellen sowie B220-positiver B-Zellen im Colon als die entsprechenden *E. coli*-infizierten Kontrollen (Abb. 64; p < 0.005 - p < 0.0005). Unter den *C. jejuni B2*-infizierten Tieren zeigten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse bei allen drei Zellpopulationen den stärksten Anstieg und unterschieden sich signifikant von TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 64; p < 0,05 – p < 0,005).



**Abb. 64:** T-Zellen (CD3-positiv - A), regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv - B) und B-Zellen (B220-positiv - C) im Colon an Tag 8 p.i.. Gezeigt sind T-Zellen (A) und regulatorische T-Zellen (B) und B-Zellen (C) im Colon *C. jejuni B2*- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Geschlossene Symbole stehen für *C. jejuni B2*-, offene Symbole für *E. coli*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

### 3.6.3.7 mRNA-Expression im Colon

Für die Zytokine IL-6, IL-22, IL-23 und TNF- $\alpha$  konnten signifikante Unterschiede zwischen *C. jejuni B2*-infizierten Tieren des Genotyps C10/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> nachgewiesen

werden (Abb. 65). Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Messungen der jeweiligen mRNA-Expression sowie die zugehörigen Signifikanzniveaus.

**Tab. 17: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i.**

mRNA	+ <i>C. jejuni</i> B2		Signifikanzniveau
	C10/IL10 <sup>-/-</sup>	TLR4 <sup>-/-</sup> /IL10 <sup>-/-</sup>	
<b>IL-6</b>	0,56 ± 0,39	0,08 ± 0,07	p < 0,01
<b>IL-22</b>	7,51 ± 5,61	1,62 ± 0,84	p < 0,05
<b>IL-23</b>	3,58 ± 2,98	0,68 ± 0,3	p < 0,05
<b>TNF-α</b>	1,7 ± 1,15	0,65 ± 0,24	p < 0,05

Des Weiteren wiesen unter den *C. jejuni* B2-infizierten Tieren TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- Mäuse eine signifikant höhere IL-23 mRNA-Expression im Colon auf als TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse (4,82 ± 2,19 gegenüber 0,68 ± 0,3; Abb. 65C; p < 0,005).

Hinsichtlich der mRNA-Expression von IL-18 und IFN-γ konnten unter den *C. jejuni* B2-infizierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 66).

Die Messung der MUCIN-2 mRNA ergab signifikant geringere Werte bei *C. jejuni* B2-infizierten TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren (2,13 ± 1,21) im Vergleich zu C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren (3,52 ± 1,12) und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren (5,04 ± 2,06; Abb. 67; beide p < 0,05).

Der Vergleich *C. jejuni* B2- und *E. coli*-infizierter Gruppen eines Genotyps ergab unter C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren signifikante Unterschiede in der mRNA Expression von IL-6, IL-22, IL-23, TNF-α und MUCIN-2 (Abb. 65, Abb. 67) Tabelle 18 zeigt die entsprechenden Messwerte sowie Signifikanzniveaus.

**Tab. 18: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i.**

mRNA	C10/IL10 <sup>-/-</sup>		Signifikanzniveau
	+ <i>C. jejuni</i> B2	+ <i>E. coli</i>	
<b>IL-6</b>	0,56 ± 0,39	0,1 ± 0,09	p < 0,001
<b>IL-22</b>	7,51 ± 5,61	0,9 ± 1,19	p < 0,001
<b>IL-23</b>	3,58 ± 2,98	1,61 ± 0,44	p < 0,05
<b>TNF-α</b>	1,7 ± 1,15	0,42 ± 0,46	p < 0,005
<b>MUCIN2</b>	3,51 ± 1,12	21,8 ± 5,59	p < 0,0005

Bei Tieren des Genotyps TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> konnten hinsichtlich der mRNA-Expression von IL-23 signifikante höhere Werte nach *C. jejuni* B2- als nach *E. coli*-Infektion nachgewiesen werden. Die mRNA-Expressionen von IL-18 und MUC-2 waren nach Infektion mit *C. jejuni* B2 signifikant niedriger als nach *E. coli*-Infektion (Abb. 65-67). Tabelle 19 zeigt die jeweiligen Ergebnisse sowie zugehörige Signifikanzniveaus.

**Tab. 19: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i.**

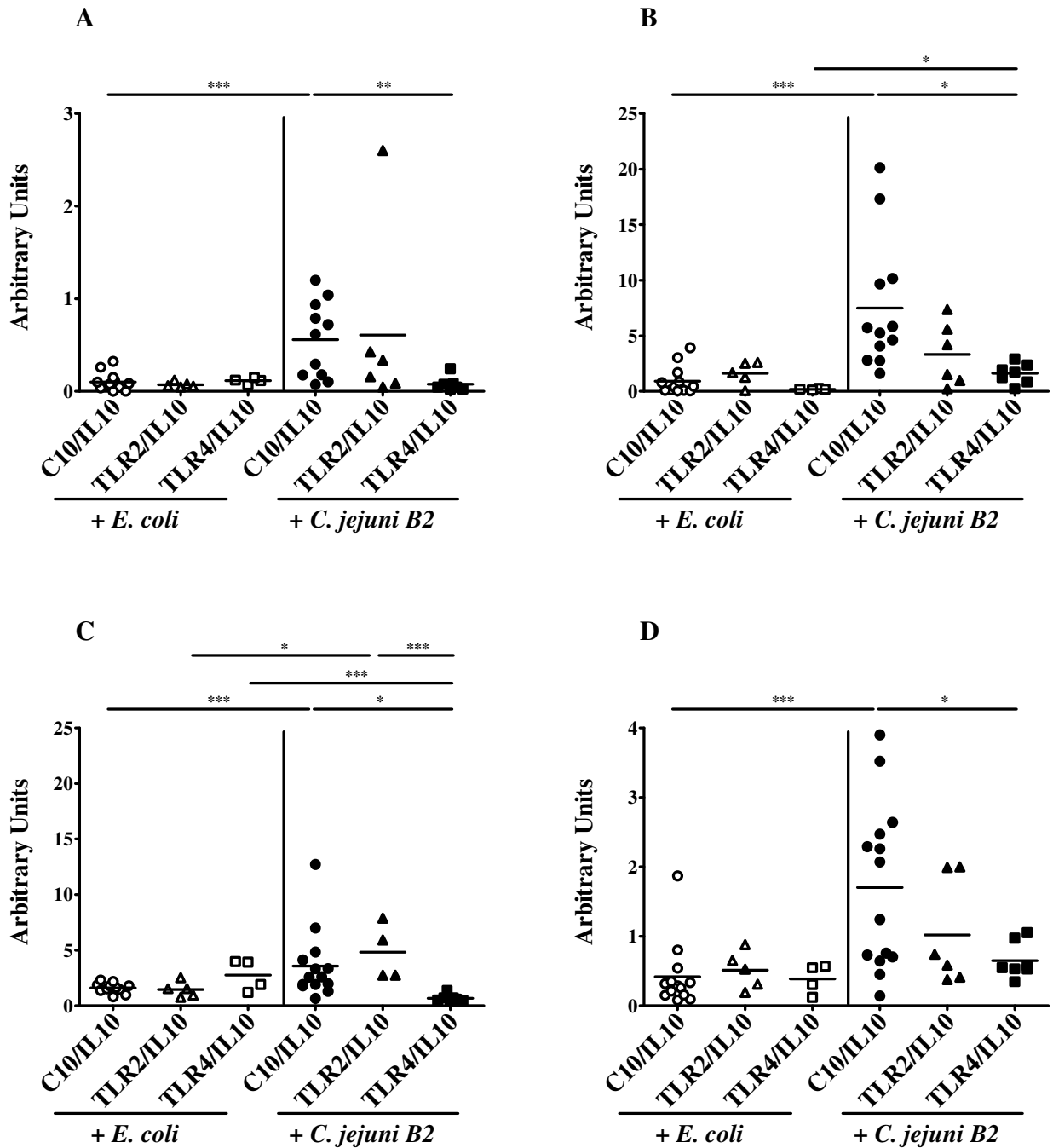
TLR2 <sup>-/-</sup> /IL10 <sup>-/-</sup>			
mRNA	+ <i>C. jejuni</i> B2	+ <i>E. coli</i>	Signifikanzniveau
<b>IL-18</b>	1,73 ± 1,11	4,12 ± 1,76	p < 0,05
<b>IL-23</b>	4,82 ± 2,19	1,46 ± 0,62	p < 0,05
<b>MUCIN2</b>	2,13 ± 1,21	58,45 ± 54,13	p < 0,05

Bei TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren wiesen *C. jejuni*-infizierte signifikant geringere IL-18- und IL-23-mRNA-Expressionen auf als *E. coli*-infizierte. Hinsichtlich der mRNA-Expression von IL-22 und IFN- $\gamma$  zeigten sich nach Infektion mit *C. jejuni* B2 signifikant höhere Messwerte als nach Infektion mit *E. coli* (Abb. 65, Abb. 66). Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Messungen.

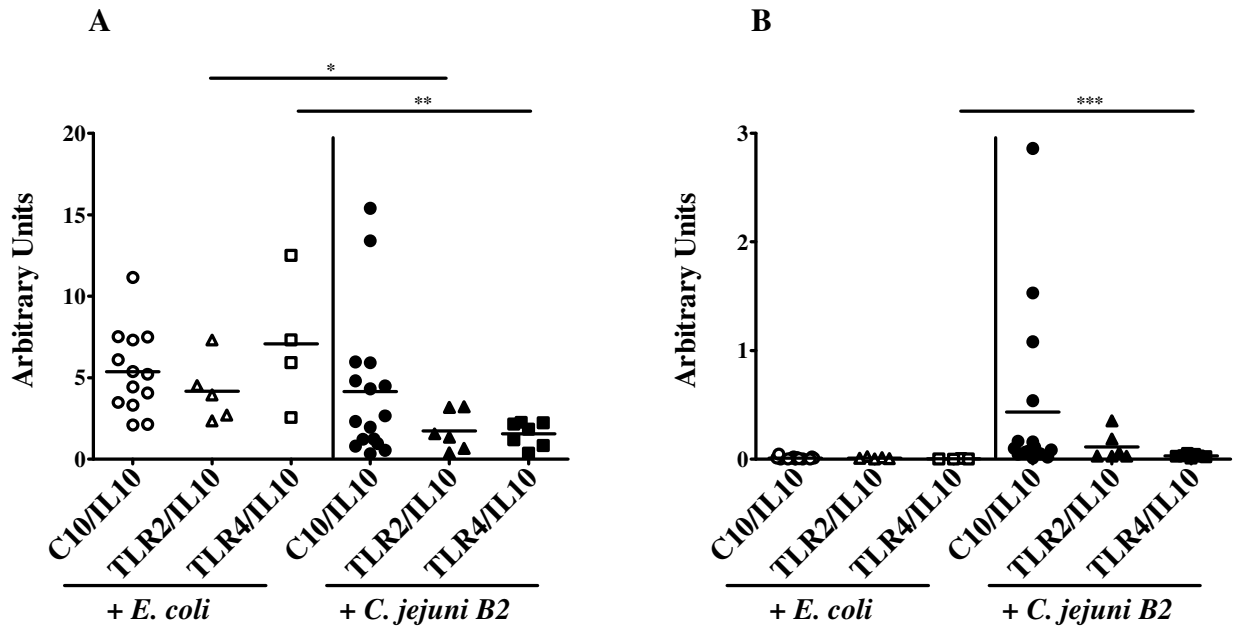
**Tab. 20: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i.**

TLR4 <sup>-/-</sup> /IL10 <sup>-/-</sup>			
mRNA	+ <i>C. jejuni</i> B2	+ <i>E. coli</i>	Signifikanzniveau
<b>IL-18</b>	1,56 ± 0,7	7,08 ± 3,58	p < 0,01
<b>IL-22</b>	1,62 ± 0,84	0,19 ± 0,05	p < 0,05
<b>IL-23</b>	0,68 ± 0,3	2,75 ± 1,22	p < 0,005
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,03 ± 0,01	0,003 ± 0,002	p < 0,005

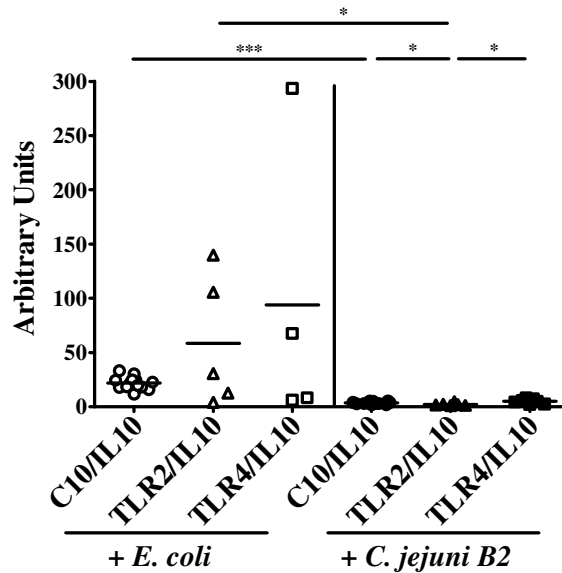




**Abb. 65: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i..** Gezeigt sind die mRNA-Expressionen der Zytokine IL-6 (A), IL-22 (B), IL-23 (C) und TNF- $\alpha$  (D) bei *C. jejuni* B2-infizierten C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni* B2-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).



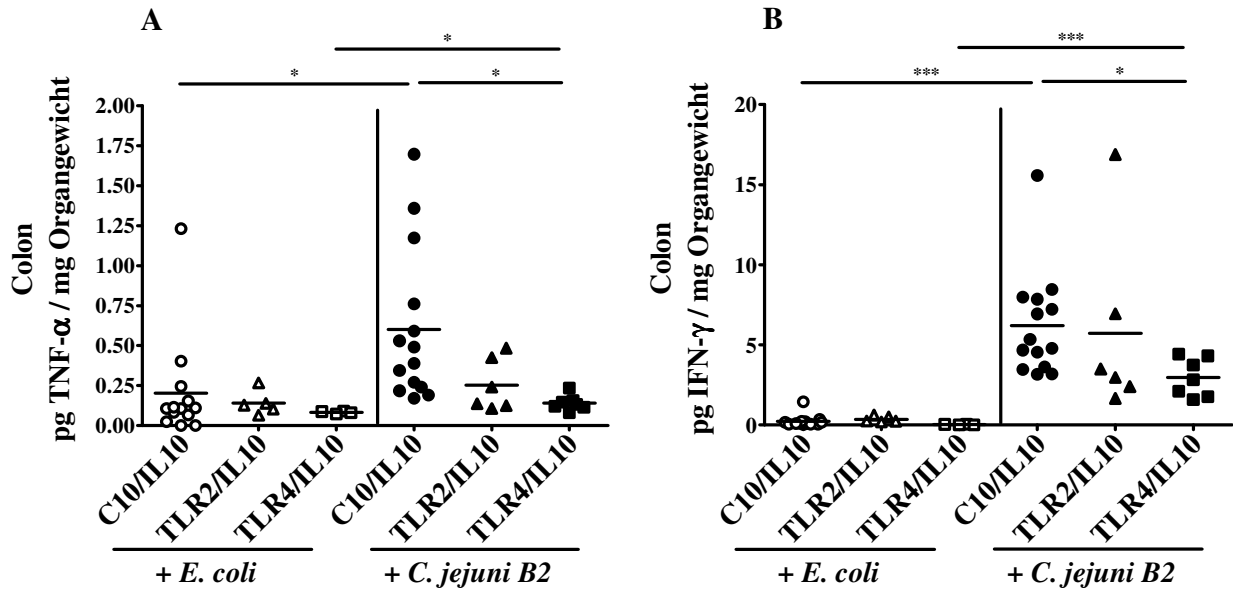
**Abb. 66: mRNA-Expression im Colon an Tag 8 p.i.** Gezeigt sind die mRNA-Expressionen der Zytokine IL-18 (A) und IFN- $\gamma$  (B) bei *C. jejuni B2*-infizierten C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni B2*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).



**Abb. 67: MUCIN-2-mRNA-Expression an Tag 8 p.i.** Gezeigt sind die mRNA-Expressionen von MUCIN-2 im Colon *C. jejuni B2*-infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni B2*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

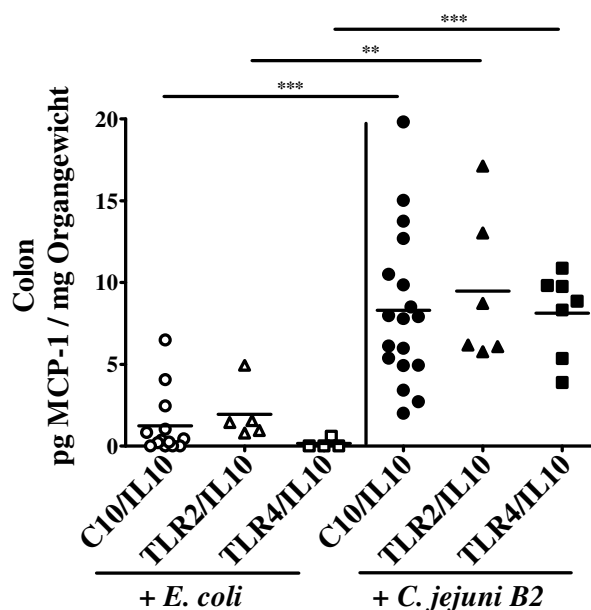
### 3.6.3.8 Zytokinbestimmung aus Colon-Kulturüberständen

Nach Infektion mit *C. jejuni* B2 wiesen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere signifikant höhere TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen auf als TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere (Abb. 68; beide  $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigten Tiere beider Genotypen auch verglichen mit den entsprechenden *E. coli*-infizierten Tieren signifikant höhere TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Abb. 68;  $p < 0,05$  –  $p < 0,0005$ ).



**Abb. 68: TNF- $\alpha$  (A)- und IFN- $\gamma$  (B)- Konzentrationen an Tag 8 p.i..** Gezeigt sind die TNF- $\alpha$  (A)- und IFN- $\gamma$  (B)-Konzentrationen im Colon *C. jejuni* B2- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni* B2-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

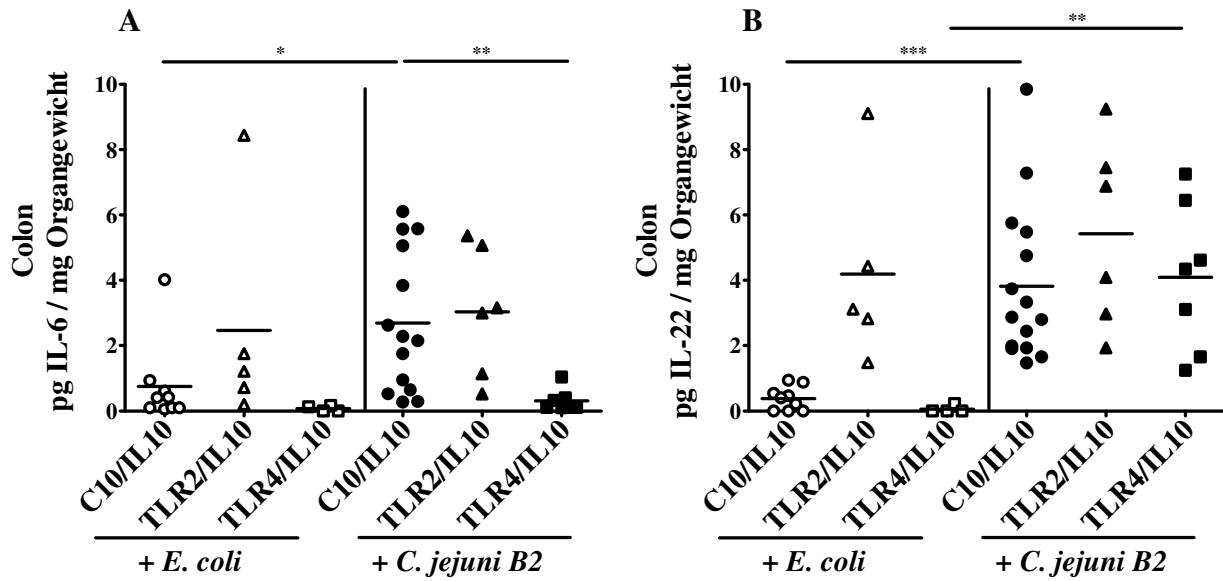
*C. jejuni* B2-infizierte Tiere aller drei Genotypen wiesen signifikant höhere MCP-1-Konzentrationen im Colon auf als die korrespondierenden *E. coli*-infizierten Tiere (Abb. 69;  $p < 0,05$  –  $p < 0,01$ ). Bei der Bestimmung der MCP-1-Konzentration ergaben sich unter den *C. jejuni* B2-infizierten Gruppen keine genotypischen Unterschiede.



**Abb. 69: MCP-1 - Konzentrationen an Tag 8 p.i.** Gezeigt sind die MCP-1-Konzentrationen im Colon *C. jejuni B2*- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni B2*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

Hinsichtlich der Konzentrationen des Zytokins IL-6 wiesen unter den *C. jejuni B2*-infizierten Tieren C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant höhere Konzentrationen auf als TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb. 70A; p < 0,01). Weiterhin war die IL-6-Konzentration bei den C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni B2* signifikant höher als nach *E. coli*-Infektion (Abb. 70A; p < 0,05).

Die Messung von IL-22 ergab bei C10/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni B2* im Vergleich zu den entsprechenden *E. coli* infizierten Tieren signifikant höhere Konzentrationen im Colon (Abb. 70B; p < 0,01 – p < 0,005). Genotypische Unterschiede zwischen den *C. jejuni B2*-infizierten Tieren konnten nicht festgestellt werden.



**Abb. 70: IL-6 (A)- und IL-22 (B)- Konzentrationen an Tag 8 p.i..** Gezeigt sind die IL-6 (A)- und IL-22 (B)-Konzentrationen im Colon *C. jejuni B2*- und *E. coli*- infizierter C10/IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Offene Symbole stehen für *E. coli*-infizierte, geschlossene Symbole für *C. jejuni B2*-infizierte Tiere. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Balken symbolisieren den Mittelwert. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,005).

Unabhängig von der Art der Normalisierung der Zytokinwerte (auf Protein- oder Organgewicht bezogen) waren die beschriebenen Unterschiede vergleichbar.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einführung

*C. jejuni* stellt weltweit einen der häufigsten Verursacher bakteriell bedingter akuter Gastroenteritiden beim Menschen dar. In Deutschland ist *C. jejuni* seit 2007 der häufigste Erreger gemeldeter bakterieller Durchfallerkrankungen (RKI 2007, 2008, 2009). Das Verständnis der Pathogenese der *C. jejuni*-Enteritis wird zum einen durch die genetische Variabilität des Erregers und das Fehlen typischer Virulenzfaktoren, zum anderen durch das Fehlen von geeigneten Säugetiermodellen, welche einen Inflammationszustand nachahmen, wie er beim Menschen beobachtet wird, erschwert (Janssen *et al.* 2008). Verwendete Tiermodelle stellen meist Kolonisationsmodelle dar, welche durch das Fehlen akuter Inflammationsreaktionen gekennzeichnet sind.

Entzündliche Prozesse infolge einer *C. jejuni*-Infektion manifestieren sich am häufigsten im Colon. Dies ist zugleich der Abschnitt des Gastrointestinaltraktes, welcher am dichtesten von kommensalen Darmbakterien besiedelt ist.

### 4.2 Untersuchung der Kolonisationsresistenz gegen *C. jejuni* in murinen Modellen

In den von uns durchgeführten Kolonisationsexperimenten mit drei verschiedenen *C. jejuni*-Stämmen, welche sich hinsichtlich Herkunft und Virulenz unterschieden, konnte gezeigt werden, dass C57BL/6-Wildtypmäuse mit konventioneller Darmflora eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* aufwiesen. Im Infektionsverlauf wurde bei allen verwendeten Stämmen eine deutliche Abnahme der *C. jejuni*-Last beobachtet. Innerhalb von Stunden waren nahezu keine lebenden *Campylobacter* spp. im Faeces mehr nachweisbar. Dieses sporadische Kolonisieren von *C. jejuni* ging zu keinem Zeitpunkt mit erkennbaren Krankheitszeichen einher. Dieser Befund wird durch Untersuchungen in BALB/c-, C3H- sowie Swiss Webster-Mäusen mit komplexer kommensaler Darmflora, welche ebenfalls eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz gegenüber dem oral applizierten Pathogen *C. jejuni* aufwiesen bestätigt (Field *et al.* 1984, Chang & Miller 2006).

Das Unvermögen von *C. jejuni* bei Mäusen stabil zu kolonisieren wirft die Frage auf, welche Rolle die Darmflora bei der beobachteten Kolonisationsresistenz spielt. Die Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *C. jejuni* bei gnotobiotischen C57BL/6- sowie C57BL/10-Wildtyptieren untermauert den kausalen Zusammenhang zwischen der kommensalen Darmflora und der Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* im Mausmodell. Im Gegensatz zu Tieren mit

konventioneller Darmflora konnte bei gnotobiotischen Mäusen ein dauerhaftes Ansiedeln von *C. jejuni* festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Kolonisations- und Invasivitätsstudien, in denen bei keimfreien Mäusen, nicht aber bei Tieren mit Darmflora, eine dauerhafte Kolonisierung sowie Translokationen von lebenden *C. jejuni* in mesenteriale Lymphknoten festgestellt werden konnte (Fauchère *et al.* 1985, Yrios & Balish 1986). Yrios & Balish konnten weiterhin zeigen, dass die *C. jejuni*-Last der stabil besiedelten gnotobiotischen Tiere stark rückläufig war, wenn die Tiere aus der Isolator-Haltung in SPF-Haltungsbedingungen überführt wurden und im Zuge dessen eine kommensale Flora erwarben (Yrios & Balish 1986).

Die in mehreren experimentellen Mausmodellen beobachtete fehlende Suszeptibilität gegenüber *C. jejuni* sowie die Tatsache, dass *C. jejuni* beim Menschen trotz komplexer Darmflora Enteritiden verursacht, führte zu der Hypothese, dass speziell die murine Flora ein Ansiedeln des Pathogens und folgende inflammatorische Prozesse verhindert. Dieser Hypothese folgend wurden gnotobiotische C57BL/6-Wildtypiere mit humaner bzw. muriner Flora assoziiert. Untersuchungen zu *C. jejuni* in mit humaner Flora assoziierten Mäusen sind derzeit in der Literatur nicht bekannt. Der Befund, dass mit humaner Flora, nicht jedoch mit muriner Flora assoziierte Tiere stabil mit *C. jejuni* besiedelbar waren macht deutlich, dass die spezifische murine Darmflora ein Ansiedeln des Pathogens verhinderte. In einer Arbeit von Field *et al.* konnte gezeigt werden, dass das stabile Kolonisieren von *C. jejuni* wie es bei keimfreien Tieren zu beobachten war unterbunden wurde, wenn den Tieren vor der *C. jejuni*-Infektion eine Faeces-Suspension von Tieren mit komplexer Flora peroral verabreicht wurde (Field *et al.* 1984). In der kulturellen Analyse der Floren unmittelbar vor Infektion mit *C. jejuni* wiesen mit humaner Flora assoziierte Gnotobioten im Vergleich zu mit muriner Flora assoziierten Tieren signifikant mehr *Enterobacteriaceae*, anaerobe gramnegative Stäbchen (vor allem *Bacteroides* / *Prevotella* spp.) sowie signifikant weniger aerobe grampositive Stäbchen (vor allem *Lactobacillus* spp.) im Faeces auf. Die Gesamtbakterienlast der mit humaner Flora assoziierten Tiere war signifikant höher als die der mit muriner Flora assoziierten Tiere. Immunhistochemische Untersuchungen von Colonschnitten gnotobiotischer sowie mit humaner bzw. muriner Flora assoziierter Tiere ergaben, dass das stabile Kolonisieren von *C. jejuni* mit einem Anstieg verschiedener Immunzellpopulationen einherging. So wiesen gnotobiotische und mit humaner Flora assoziierte Tiere nach Infektion mit *C. jejuni* einen Anstieg von T-Lymphozyten sowie regulatorischen T-Zellen auf. Des Weiteren waren vermehrt apoptotische Zellen, neutrophile Granulozyten und B-Zellen nachweisbar. Untersuchungen der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon gnotobiotischer Tiere konnten zeigen, dass das stabile Ansiedeln von *C. jejuni* mit einem

Anstieg von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18 und IL-23p19 einherging. Trotz der zellulären Reaktion nach Infektion mit *C. jejuni* waren keinerlei makroskopische Anzeichen einer Enteritis zu verzeichnen, was die Aussagekraft der Modelle hinsichtlich der Immunantwort limitiert.

### **4.3 Auswirkungen eines Inflammationszustandes auf die Kolonisationsresistenz**

Die von uns durchgeführten Kolonisationsexperimente bei konventionell besiedelten Tieren mit vorbestehender akuter bzw. chronischer Darmentzündung konnten auf Grund eines stabilen Ansiedelns von *C. jejuni* das Überkommen der Kolonisationsresistenz deutlich machen. Diese Ergebnisse werden durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen mit IL10<sup>-/-</sup>-Tieren bestätigt. So konnten Mansfield *et al.* zeigen, dass *C. jejuni* 11168 bei C57BL/6/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen stabil kolonisieren konnte. Neben dem stabilen Ansiedeln des Pathogens, konnten Mansfield *et al.* bei Tieren mit IL-10-Deletion im Infektionsverlauf ausgeprägte makroskopische Krankheitszeichen sowie *C. jejuni*-induzierte histopathologische Veränderungen des Colons feststellen (Mansfield *et al.* 2007). Die Verschlechterung des klinischen Zustandes nach Infektion mit *C. jejuni* ATCC 43431 war in unserem IL10<sup>-/-</sup>-Modell nicht zu beobachten. Diese Diskrepanz ist am ehesten in den unterschiedlichen *C. jejuni*-Stämmen begründet.

Die Auswirkungen eines inflammatorischen Geschehens auf die Kolonisationsresistenz gegenüber Pathogenen wird weiterhin durch ein murines *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Modell deutlich. Stecher *et al.* konnten zeigen, dass das Vorhandensein einer Inflammation zum Überkommen der Kolonisationsresistenz durch das Pathogen führte (Stecher *et al.* 2007). Als ursächlich für dieses Zusammenbrechen der Kolonisationsresistenz im Zuge einer Inflammation kommen mehrere Faktoren in Frage.

Die Tatsache, dass sowohl in der von uns untersuchten akuten als auch in der chronischen Entzündungssituation verglichen mit der entsprechenden gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der intraluminalen *E. coli*-Dichte zu verzeichnen war, deutet darauf hin, dass die Zusammensetzung der kommensalen Darmflora für die Aufrechterhaltung protektiver Mechanismen, wie der Kolonisationsresistenz gegenüber Pathogenen, eine wichtige Rolle spielt. Die von uns beobachteten Veränderungen der Zusammensetzung der Darmflora stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer experimenteller Inflammationsmodelle, welche einen Anstieg von Mitgliedern der Familie der *Enterobacteriaceae* nachweisen konnten (Heimesaat *et al.* 2006, Lupp *et al.* 2007, Stecher *et al.* 2007, Heimesaat *et al.* 2007). Als Mechanismus für den Anstieg der *Enterobacteriaceae* bei Darmentzündungen wird unter anderem eine erhöhte Verfügbarkeit von Sauerstoff, welche das Wachstum aerober



Bakterienpopulationen begünstigt, diskutiert (Lupp *et al.* 2007). Eine weitere Ursache für die Kumulation der *Enterobacteriaceae* scheint in den Folgen der inflammatorisch bedingten Mukosaschädigung und nachfolgenden Resorptionsstörungen zu liegen. Diese führen zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Glucose im Lumen, was das Wachstum bestimmter bakterieller Spezies begünstigt. Dies sind hervorragende Voraussetzungen für das schnelle Wachstum von *E. coli*, denn *Enterobacteriaceae* zeichnen sich durch hoch entwickelte und effiziente Eigenschaften zur Zucker-Fermentation und sehr hohe Teilungsraten aus, welche andere kommensale Spezies nicht aufweisen. Zudem ist *E. coli* in der Lage direkt und indirekt eine erhöhte Expression des Rezeptors CEACAM-6 durch intestinale Epithelzellen zu induzieren (Barnich & Darfeuille-Michaud 2007). Dieser Rezeptor erleichtert die Adhärenz und Invasion von *E. coli*, was dieser Spezies einen weiteren Vorteil im Rahmen der Entzündung verschafft.

Neben der veränderten Zusammensetzung der kommensalen Darmflora wird die im Entzündungsverlauf auftretende gesteigerte Sekretion antimikrobieller Peptide und Lectine als Ursache des Zusammenbruchs der Kolonisationsresistenz diskutiert. Des Weiteren geht eine Inflammation mit Veränderungen des luminalen Milieus, gesteigerter Sauerstoffverfügbarkeit und verändertem Substratangebot einher, was Pathogenen möglicherweise Überlebensvorteile gegenüber Mitgliedern der kommensalen Flora bietet (Dann & Eckmann 2007, Cash *et al.* 2006, Stecher *et al.* 2007).

Mit dem Ziel, den Effekt einer intraluminalen Erhöhung der Dichte an *Enterobacteriaceae*, wie sie im Inflammationszustand zu beobachten ist, losgelöst von inflammatorisch bedingten, multifaktoriellen Veränderungen zu untersuchen, erhöhten wir die intraluminale *E. coli*-Dichte bei C57BL/6-Wildtyp-Tieren mit konventioneller Darmflora. Wir konnten zeigen, dass bei dauerhaft erhöhter *E. coli*-Dichte der Stamm *C. jejuni* B2 in der Lage war, die Kolonisationsresistenz zu überwinden und stabil anzusiedeln. Ein zweiter von uns untersuchter Stamm, *C. jejuni* ATCC 43431, siedelte hingegen nicht dauerhaft an und konnte nach 12 Tagen im Faeces der infizierten Tiere nicht mehr nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass eine Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte Auswirkungen auf das Kolonisationsverhalten von manchen, aber nicht allen *C. jejuni*-Stämmen haben kann. Im Zusammenhang mit der intraluminalen *E. coli*-Erhöhung stellen Unterschiede des Eisenstoffwechsels eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Besiedlungsverhalten der beiden untersuchten *C. jejuni*-Stämme dar. Ein ausgeglichener Eisenhaushalt ist eine Voraussetzung für das erfolgreiche Kolonisieren von *C. jejuni* im Wirtsorganismus. So ist

Eisenmangel ein unspezifischer Abwehrmechanismus gegenüber Infektionserregern (Holmes *et al.* 2005, Miller *et al.* 2009). Als ein Schlüsselmechanismus in der Bereitstellung von Eisen ist die Produktion sogenannter Siderophore anzusehen. Diese binden Eisenionen des umliegenden Gewebes und wirken somit als Eisenchelatoren (Carswell *et al.* 2008). Unter den Siderophoren kommt Enterobactin eine besondere Rolle zu, da es sich zum einen durch eine hohe Affinität für Eisenionen auszeichnet, zum anderen von kommensalen Darmbakterien wie *E. coli* gebildet wird. *C. jejuni* ist in der Lage, Enterobactin-gebundenes Eisen zu verwerten. Dies setzt jedoch die Expression des Enterobactinrezeptors CfrA voraus (Field *et al.* 1986, Zeng *et al.* 2009). Möglicherweise unterschieden sich die beiden von uns untersuchten *C. jejuni*-Stämme in der Expression des Enterobactinrezeptors. PCR-Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass beide untersuchten Stämme das Gen für den Enterobactinrezeptor besitzen. Unklar ist jedoch, ob der Rezeptor von beiden Stämmen exprimiert wird.

Immunhistochemische Untersuchungen von Colonbiopтатаen ließen, wie schon im keimfreien sowie mit humaner Flora assoziierten Modell, nach Infektion mit *C. jejuni* eine Aktivierung des Immunsystems erkennen. Auf Grund des unterschiedlichen Besiedlungsverhaltens der beiden untersuchten *C. jejuni*-Stämme wären ebenso in den Populationen der Immunzellen diskrepante Ergebnisse zu erwarten gewesen. Dies konnte nur hinsichtlich der Caspase3+-Zellen beobachtet werden und erschwert die Interpretation der Befunde. Weiterhin verdeutlicht dieses Ergebnis die Notwendigkeit eines akuten Modells zum Studium der Immunantwort gegenüber dem Pathogen *C. jejuni*.

#### **4.4 Altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz**

Die mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltraktes beginnt mit der Geburt. Um eine mögliche altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* zu untersuchen, infizierten wir C57BL/6-Wildtypiere im Alter von 3 Wochen direkt nach Absetzen von der Mutter. Im Gegensatz zu erwachsenen Tieren, bei welchen ein stabiles Ansiedeln des Pathogens durch eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz verhindert wurde, war bei 3 Wochen alten Tieren eine stabile Kolonisierung von *C. jejuni* B2 zu beobachten. Weiterhin konnten wir im Infektionsverlauf an Tag 6 und Tag 7 bei 90 % der jungen Tiere okkultes Blut im Stuhl nachweisen, was auf ein inflammatorisches Geschehen im Colon hindeutet. Die von uns beobachtete Suszeptibilität junger Mäuse wird durch Ergebnisse von Field *et al.* bekräftigt, die ein stabiles Ansiedeln von *C. jejuni* bei neugeborenen Tieren feststellen konnten (Field *et al.* 1981).

Eine mögliche Ursache für die Suszeptibilität junger Wildtyptiere besteht in einer, auf Grund des jungen Alters noch nicht vollständig ausgebildeten Kolonisationsresistenz. Die von uns durchgeführte kulturelle Analyse der kommensalen Flora 3 Wochen alter Tiere unterstützt diese Hypothese. So konnten wir zeigen, dass besonders unter den aeroben Bakterienpopulationen deutliche quantitative Unterschiede im Vergleich zu erwachsenen Tieren bestanden. Des Weiteren lagen die *E. coli*-Lasten im Faeces von Mäusen direkt nach Absetzen von der Mutter um ca. 2 logarithmische Stufen höher als bei erwachsenen Tieren, was möglicherweise einen Beitrag zu der gesteigerten Suszeptibilität leistet. Die Tatsache, dass die Tiere im Alter von ca. 8 Wochen, dem Alter einer erwachsenen Maus entsprechend, ein physiologisches *E. coli*-Niveau aufwiesen bestätigte, dass die kommensale Darmflora 3 Wochen alter Tiere noch Veränderungen unterworfen ist und stützt somit die Hypothese einer sich altersabhängig entwickelnden Kolonisationsresistenz.

Die von uns im Folgenden durchgeführten Kolonisationsversuche bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten im Vergleich zu erwachsenen Tieren desselben Genotyps deutlich niedrigere *C. jejuni*-Lasten im Faeces. Dieser Befund ist durch die Tatsache erklärbar, dass sich bei 3 Wochen alten C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren die durch die IL10-Deletion bedingte chronische Colitis noch nicht entwickelt hat. Weiterhin ist der Befund eine Bestätigung dafür, dass das Überwinden der Kolonisationsresistenz, wie wir es im Modell der chronischen IL10-Colitis beobachten konnten, auf inflammatorisch bedingte, multifaktorielle Veränderungen des intraluminalen Milieus zurückzuführen ist. Auf Grund der bei jungen Wildtyptieren erhobenen Befunde wäre jedoch auch bei jungen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren ein deutliches Überkommen der Kolonisationsresistenz zu erwarten gewesen. Bei der Interpretation der Befunde ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren um einen Mausstamm mit einem anderem genetischen Hintergrund handelt als bei C57BL/10-Wildtyptieren.

Die immunhistochemischen Untersuchungen von Colonschnitten zeigten im Vergleich zu den bisher untersuchten Modellen, bei denen ein Ansiedeln von *C. jejuni* bzw. das Überkommen der Kolonisationsresistenz zu Grunde lag, hinsichtlich der CD3+ T-Zell-Population eine stärkere Infiltration. Dieser Befund legt nahe, dass *C. jejuni*-Infektionen zu einer T-Zell-vermittelten Aktivierung des Immunsystems führen.

#### **4.5 Akutes murines Inflammationsmodell zur Untersuchung der Immunantwort**

Eine Überwindung der Kolonisationsresistenz nach *C. jejuni*-Infektion konnte von uns in verschiedenen murinen Modellen gezeigt werden. Allerdings kann bei diesen Modellen nur von

Kolonisationsmodellen gesprochen werden, da das stabile Ansiedeln von *C. jejuni* nicht mit einer akuten Inflammation, wie sie beim Menschen zu beobachten ist, vergesellschaftet war.

Nach Infektion gnotobiotischer *C10/IL10<sup>-/-</sup>*-Mäuse, bei welchen die Eradikation der Darmflora direkt nach Absetzen von der Mutter im Alter von drei Wochen begonnen wurde, konnten wir ein durch *C. jejuni* induzierbares akutes Inflammationsmodell etablieren, welches der beim Menschen beobachteten Schwere der Entzündung nahekommt und im Unterschied zu den reinen Kolonisationsmodellen eine nähere Untersuchung der Immunantwort gegenüber *C. jejuni* ermöglichte.

Nach Eradikation der kommensalen Darmflora führte die Infektion der Tiere bei beiden verwendeten *C. jejuni*-Stämmen erwartungsgemäß zu einem stabilen Ansiedeln im Gastrointestinaltrakt. Die Besiedlungsdichte des Colons der *C. jejuni* B2-infizierten Tiere war zum Sektionszeitpunkt nur geringfügig höher als die der *C. jejuni* ATCC 43431-infizierten.

#### **4.5.1 Klinisches Bild und Histopathologie**

Im zeitlichen Verlauf nach Infektion mit *C. jejuni* wiesen die Mäuse klinische Zeichen einer Darmentzündung auf. Neben struppigem Fell, buckeliger Haltung und Isolation setzten die Tiere blutig schleimigen Stuhl ab, was die Verschlechterung des klinischen Zustandes deutlich macht. Bemerkenswerterweise zeigten *E. coli*-infizierte Kontrolltiere diese klinischen Veränderungen nicht, so dass die Krankheitszeichen als Folge der *C. jejuni*-Infektion zu werten sind.

Entzündungen des Darmes können mit einer Verkürzung des betroffenen Darmabschnittes und somit einer Reduktion der Resorptionsfläche bzw. -kapazität einhergehen. Die bei *C. jejuni*-infizierten Tieren signifikant kürzeren Colonlängen deuten auf ein ausgeprägtes entzündliches Geschehen im Vergleich zu *E. coli*-infizierten und naiven Kontrolltieren hin. Des Weiteren deuten die alkalischeren pH-Werte im Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere im Vergleich zu *E. coli*-infizierten Tieren auf Veränderungen des luminalen Milieus im Verlauf der Darmentzündung hin.

Die anhand des sog. OVA-„Scores“ ermittelten ausgeprägten histopathologischen Veränderungen im Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere, die bei *E. coli*-infizierten und naiven Kontrolltieren fehlten, machen das akute inflammatorische Geschehen deutlich. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Arbeit von Lippert *et al.*, in der gezeigt wurde, dass die Infektion von gnotobiotischen *IL10<sup>-/-</sup>;NF-κB<sup>EGFP</sup>*-Mäusen mit *C. jejuni* 81-176 zu einer schweren ulzerativen Veränderung des Colons führte, welche mit blutigen Durchfällen und histopathologischen Veränderungen einherging (Lippert *et al.* 2009).

#### 4.5.2 Immunhistochemische Untersuchungen des Colons

Das massive Infiltrat CD3+ Lymphozyten im Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere macht deutlich, dass es sich bei der Entzündung um ein T-Zell-vermitteltes Geschehen handelt. Ebenso konnten wir bei *C. jejuni*-infizierten Tieren einen signifikanten Anstieg neutrophiler Granulozyten im Colon *in situ* nachweisen. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von Colon-Biopsien beim Menschen, welche ein massives Infiltrat des Epithels und der Lamina propria mit Neutrophilen zeigten (Wassenaar & Blaser 1999).

Die Induktion von Apoptosen stellt einen verbreiteten Virulenzmechanismus bakterieller Pathogene dar. In unserem Modell konnte ein signifikanter Anstieg Caspase3+ apoptotischer Zellen im Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht den massiven Zelluntergang im Zuge der akuten Inflammation und findet Bestätigung in *in vitro* Studien, in denen *C. jejuni* die Apoptose von THP-1 Zellen induzierte (Siegesmund *et al.* 2004). Foxp3+ regulatorische T-Zellen kontrollieren pathologische Immunreaktionen und sind an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt (Siddiqui & Powrie 2008). Nach Infektion mit *C. jejuni* konnten wir einen signifikanten Anstieg der Population Foxp3+ regulatorischer T-Zellen feststellen. Die Foxp3-Expression in T-Zellen wird hauptsächlich durch IL-10 aufrechterhalten (Murai *et al.* 2009). Da die von uns untersuchten Tiere kein IL-10 produzieren können, muss der Induktion von Foxp3 ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen. Coombes *et al.* konnten zeigen, dass naive T-Zellen nach Antigen-Stimulation im Darm unter Beteiligung CD103+ dendritischer Zellen der mesenterialen Lymphknoten Foxp3 exprimieren (Coombes *et al.* 2007). Dies stellt einen möglichen Mechanismus der Foxp3-Induktion in unserem akuten Inflammationsmodell dar und würde die Rolle der dendritischen Zellen in der Immunpathogenese der *Campylobacter*-Enteritis bekräftigen.

Der Nachweis *C. jejuni*-spezifischer Antikörper im Serum von Patienten mit *Campylobacter*-Enteritis macht die Beteiligung des adaptiven Immunsystems an der Bekämpfung der *C. jejuni*-Infektion deutlich (Kaldor *et al.* 1983). Der von uns beobachtete signifikante Anstieg B220+ Zellen im Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere spricht für eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems. Dieser Befund wird durch ein murines Modell von Mansfield *et al.* gestützt, in dem bei C57BL/6- sowie C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 28 p.i. Th1-assoziierte anti-*C. jejuni* Antikörper nachgewiesen werden konnten (Mansfield *et al.* 2007).

### 4.5.3 Zytokinbestimmungen auf Protein- und mRNA-Ebene

Wir konnten zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* im Colon zu einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-12p70 auf Proteinebene sowie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf Protein- und mRNA-Ebene führte, was auf eine Th1-Polarisierung der Immunantwort hindeutet. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen bei gnotobiotischen IL10<sup>-/-</sup>;NF- $\kappa$ B<sup>EGFP</sup>-Mäusen, welche nach Infektion mit *C. jejuni* einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und IL-12p40 im Colon zeigten (Lippert *et al.* 2009). Die *C. jejuni*-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  konnte ebenso im Rahmen von *in vitro* Arbeiten mit THP-1- und INT407-Zelllinien gezeigt werden (Jones *et al.* 2003, Al-Salloom *et al.* 2003).

Studien mit dendritischen Zellen (DC) geben Hinweise auf deren Beteiligung an der Wirtsabwehr gegenüber einer *C. jejuni*-Infektion, die mit einer von DCs produzierten IL-12-, TNF- $\alpha$ - und IL-6-Sekretion einhergeht (Hu *et al.* 2006, Rathinam *et al.* 2008). In unserem akuten Entzündungsmodell zeigten *C. jejuni*-infizierte Tiere im Vergleich zu *E. coli*-infizierten und naiven Kontrolltieren einen Anstieg der IL-6 mRNA im Colon. IL-6 wird neben DCs auch von Makrophagen, B-Zellen, CD4+ T-Zellen sowie von Epithelzellen und Myofibroblasten gebildet. IL-6 induziert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und fördert gemeinsam mit TNF- $\alpha$  die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe. Die erhöhte Expression dieser Zytokine spricht für eine starke granulozytäre Infiltration des entzündeten Gewebes und bestätigt unsere immunhistologischen Befunde.

Eine erhöhte Zahl an Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in der Colonmukosa weist auf gesteigerten oxidativen Stress sowie eine im Zuge dessen herabgesetzte Epithelbarriere hin. Im Einklang damit stehen die bei *C. jejuni*-infizierten Tieren signifikant erhöhten Konzentrationen des Chemokins MCP-1. Dieses wird nach Verletzung der Epithelbarriere von Epithelzellen gebildet und führt zur vermehrten Rekrutierung von Makrophagen in das entzündete Gewebe, was wiederum in einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine resultiert. Im Zuge einer Epithelschädigung ist ein Verlust der schützenden Mukusschicht zu erwarten. Die signifikant verminderte mRNA-Expression von MUC2, dem strukturgebenden Element der Mukusschicht, konnte in unserem Modell nach Infektion mit *C. jejuni* nachgewiesen werden. Weiterhin stellte der Verlust von Becherzellen, welche MUC2 produzieren, einen Parameter unserer histopathologischen Bewertung dar. Die verringerte

MUC2-mRNA-Expression steht somit auch im Einklang mit dem histopathologischen Befund *C. jejuni*-infizierter Tiere.

IL-23 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das im Colon von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) gebildet wird und Th1- sowie Th17-Zellen stimuliert, die daraufhin weitere proinflammatorische Zytokine freisetzen. Weiterhin hemmt IL-23 regulatorische T-Zellen, was mit dem Rückgang der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  einhergeht (Ahern *et al.* 2008). Nach Infektion mit *C. jejuni* kam es in unserem Modell zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IL-23p19, was eine Beteiligung dieses Zytokins bei der Immunpathologie vermuten lässt.

*C. jejuni*-infizierte Tiere zeigten eine signifikant stärkere Expression der IL-22 mRNA als Kontrolltiere. IL-22 wird von DCs, natürlichen Killerzellen sowie von Th17-Zellen gebildet (Sanos *et al.* 2009). Der Wirkmechanismus dieses Zytokins wird kontrovers diskutiert. Zum einen fördert IL-22 die Entzündung, indem es Darmepithelzellen und subepitheliale Myofibroblasten des Colons zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 veranlasst. Zum anderen wirkt es bei Vorherrschen eines inflammatorischen Geschehens protektiv auf die Epithelbarriere, indem es die Migration und Proliferation der Darmepithelzellen anregt und Mucine aus Gobletzellen freisetzt (Brand *et al.* 2006, Sugimoto *et al.* 2008, Zenewicz *et al.* 2008). Die unterschiedlichen Wirkweisen hängen möglicherweise damit zusammen, dass die Epithelzellen des Ileums auf IL-22 anders reagieren als die Epithelzellen des Colons. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in einem Ileitismodell die proinflammatorische Rolle von IL-22 bei akuter Inflammation bestätigen (Muñoz *et al.* 2009). Angesichts der erhöhten Expression der IL-22 mRNA im entzündeten Colon *C. jejuni*-infizierter Tiere und auf Grund des akuten Charakters der Inflammation sowie im Kontext des vorherrschenden Zytokinprofils in unserem akuten Colitis-Modell, erscheint die proinflammatorische Wirkung von IL-22 auf die Epithelzellen des Colons hier eher wahrscheinlich.

IL-18 wurde in experimentellen Colitismodellen zunächst als proinflammatorisches Zytokin beschrieben und stellt gemeinsam mit IL-12 einen Induktor von IFN- $\gamma$  dar (Siegmond *et al.* 2001, Kanai *et al.* 2001). Neuere Studien zeigen, dass IL-18 ebenso eine protektive Rolle zukommt. So aktiviert IL-18 die Proliferation von Epithelzellen und ist am Erhalt der Epithelintegrität beteiligt (Zaki *et al.* 2010, Dupaul-Chicoine *et al.* 2010). Entscheidend für den Wirkmechanismus von IL-18 könnte der Ort der Aktivierung sein (Siegmond 2010). In unserem

Modell der akuten Inflammation zeigte sich nach Infektion mit *C. jejuni* hinsichtlich der mRNA-Expression von IL-18 kein einheitliches Bild, was Aussagen zur Rolle dieses Zytokins in unserem Modell erschwert. Nach Infektion mit dem Stamm *C. jejuni* B2 zeigte sich im Vergleich zu *E. coli*-infizierten und naiven Kontrolltieren ein Rückgang der IL-18 mRNA. *C. jejuni* ATCC 43431-infizierte Tiere wiesen tendenziell eine höhere Expression an IL-18 mRNA auf als *E. coli*-infizierte und naive Kontrolltiere, wobei der Unterschied auf Grund der sehr hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Zu bedenken ist desweiteren, dass die mRNA vieler proinflammatorischer Mediatoren kurzlebig ist.

#### **4.6 Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 bei der *Campylobacter*-Enteritis im Mausmodell**

Toll-like-Rezeptoren (TLR) spielen für die Detektion von Mikroorganismen und die Koordination von Immunantworten der angeborenen Abwehr gegenüber Pathogenen eine entscheidende Rolle (Kopp & Medzhitov 2003). Bei Mäusen, denen das TLR-Adapterprotein MyD88 fehlt, konnte ein stabiles Ansiedeln von *C. jejuni* beobachtet werden (Watson *et al.* 2007). Dies deutet darauf hin, dass TLR-Signalwege nach *C. jejuni*-Infektionen bedeutsam sind.

*C. jejuni* exprimiert Liganden für TLR2 und TLR4, wie das Lipoprotein JlpA und LOS (Moran 1997, Jin *et al.* 2003). Die Datenlage zu *C. jejuni* und TLRs ist uneinheitlich (Rathinam *et al.* 2009, de Zoete *et al.* 2010, Al-Sayeqh *et al.* 2010). Dies ist möglicherweise damit begründet, dass ausgeprägte Strukturunterschiede z.B. der LOS zwischen verschiedenen *C. jejuni*-Stämmen sowie innerhalb eines Stammes bestehen können (Karlyshev *et al.* 2005, de Zoete *et al.* 2010). Das Bakterium nutzt Veränderungen der exprimierten Oberflächenstruktur, um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen und sich seiner Umwelt anzupassen. Dies erklärt, dass nicht alle *C. jejuni*-Stämme in gleichem Maße als TLR-Agonisten fungieren.

Um die Funktion von TLR2 und TLR4 bei *C. jejuni*-Infektionen zu untersuchen, wurde zunächst das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei konventionell besiedelten Mäusen mit TLR2- und TLR4-Defizienz untersucht. Während sich TLR2<sup>-/-</sup>- Tiere hinsichtlich der Besiedlungsdichte nicht signifikant von WT-Tieren unterschieden, konnte bei TLR4<sup>-/-</sup>- kein stabiles Ansiedeln von *C. jejuni* nachgewiesen werden. Im Verlauf konnte jedoch auch bei TLR2<sup>-/-</sup>-Tieren ein tendenzieller Rückgang der Besiedlungsdichte verzeichnet werden. Somit konnte ein geringeres Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* bei TLR-Defizienz gezeigt werden, was zu den von Watson *et al.* im MyD88<sup>-/-</sup>-Modell erhobenen Befunden im Widerspruch steht. Vor dem Hintergrund



unserer Ergebnisse ist bei der Interpretation der Ergebnisse von Watson *et al.* zu berücksichtigen, dass die Signalkaskade von TLR4 auch MyD88-unabhängig, über TRIF vermittelt, verlaufen kann. Aus diesem Grund ist eine TLR4-Signalvermittlung auch in einem MyD88<sup>-/-</sup>-Modell möglich (Yamamoto *et al.* 2003). Nicht zuletzt können auch Unterschiede der Oberflächenstrukturen der verwendeten *C. jejuni*-Stämme zu diskrepanten Ergebnissen führen. Der von uns beobachtete fehlende *C. jejuni*-Nachweis bei Tieren mit TLR4-Defizienz deutet darauf hin, dass die Aktivierung von TLR4 für ein stabiles Kolonisieren von *C. jejuni* bei Tieren mit kommensaler Darmflora notwendig ist.

Zur Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *C. jejuni* bei Tieren mit chronischer IL10-Colitis wurden IL10<sup>-/-</sup>-, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse infiziert. *C. jejuni* konnte bei allen drei Genotypen bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 5 p.i. nachgewiesen werden. Die bessere Besiedelbarkeit der Doppel-KO-Tiere ist in Verbindung zu setzen mit der bestehenden chronischen Inflammation des Colons. Bei 4-6 Monate alten Tieren zeigten TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- Tiere mit C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren vergleichbare *C. jejuni*-Lasten im Faeces, während im Vergleich dazu TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere signifikant höhere *C. jejuni*-Lasten aufwiesen. Die tatsächliche biologische Relevanz des statistisch signifikanten Unterschiedes darf jedoch bezweifelt werden, da der Unterschied lediglich etwa 1 logarithmische Stufe betrug. Die nähere Untersuchung der Immunantwort und der Rolle von TLR2 und TLR4 bei *C. jejuni*-infizierten Tieren mit chronischer IL10-Colitis war Gegenstand einer in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Promotionsschrift (Promotionsschrift Bettina Otto, unveröffentlicht).

#### **4.6.1 Die Rolle von TLR2 und TLR4 im akuten Inflammationsmodell**

Bei gnotobiotischen C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren, welche direkt nach Absetzen von der Mutter im Alter von 3 Wochen antibiotisch behandelt wurden und nach vollständiger Eradikation der Darmflora im Alter von 3-4 Monaten mit *C. jejuni* infiziert wurden, induzierte *C. jejuni* eine akute Inflammation des Colons. Dieses *in vivo* Modell ist der klinischen Situation der *Campylobacter*-Enteritis beim Menschen sehr ähnlich. Um die Rolle von TLR2 und TLR4 in diesem akuten Infektionsmodell zu untersuchen, wurde die Darmflora 3 Wochen alter C10/IL10<sup>-/-</sup>-, TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse eradiziert und die Tiere im keimfreien Zustand nach ca. 8-12 Wochen mit *C. jejuni* bzw. *E. coli* infiziert. Hinsichtlich des Besiedlungsverhaltens konnten keine Unterschiede zwischen den verwendeten Genotypen festgestellt werden.

#### 4.6.1.1 Klinisches Bild, Translokationen und Histopathologie

Zur Beurteilung des klinischen Zustandes der Tiere, wurde ein klinischer „Score“ erhoben. Hierbei zeigte sich bei allen drei Genotypen im Infektionsverlauf eine signifikante Verschlechterung des klinischen Zustandes. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Zustand der TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant besser war, was die Bedeutung der TLR4-Signalvermittlung im Rahmen von *C. jejuni*-Infektionen untermauert. Die Verkürzung der Colonlänge stellte einen weiteren Parameter zur Einschätzung der Schwere der Inflammation dar. C10/IL10<sup>-/-</sup>- sowie TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten, verglichen mit *E. coli*-infizierten Kontrolltieren, im Zuge der *C. jejuni*-Infektion eine in etwa vergleichbare Verkürzung des Colons, was für ausgeprägte retraktive Vorgänge im Zuge der Inflammation spricht. Dies konnte bei TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren nicht gezeigt werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den pH-Werten des Colons. Während C10/IL10<sup>-/-</sup>- und TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere nach Infektion mit *C. jejuni* einen deutlich alkalischeren pH-Wert im Colon aufwiesen, konnte bei TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren, im Vergleich zu *E. coli*-infizierten Kontrolltieren, ein Rückgang des pH-Wertes nachgewiesen werden.

Mesenteriale Lymphknoten (MLN) stellen die ersten Lymphknotenstation außerhalb des Darmes dar und formen damit die Grenze zwischen mukosalem und systemischem Immunsystem. Man geht davon aus, dass Bakterien, die in die MLN transloziert sind, eine starke lokale Immunreaktion in Gang setzen, vom systemischen Immunsystem jedoch ignoriert werden (MacPherson & Uhr 2004). Wir konnten zeigen, dass *C. jejuni* bei TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren in signifikant geringerem Maße in die MLN translozierte als bei C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Die TLR2-Defizienz hingegen hatte keine Auswirkungen auf das Translokationsverhalten von *C. jejuni*. Die geringere Translokationsrate bei Tieren mit TLR4-Defizienz deutet auf eine weniger ausgeprägte Störung der Darmbarriere bei diesen Tieren hin. Betrachtet man als einen protektiven Parameter der Darmschleimhaut die mRNA-Expression von MUC2, so könnte man auf Grund des differenten Translokationsverhaltens bei den drei Genotypen auch hier Unterschiede erwarten. Dies bestätigte sich jedoch nicht, so dass möglicherweise andere Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere, wie z.B. Defensin- und IgA-Produktion die entscheidende Rolle spielen.

Bei der histopathologischen Bewertung des Colons zeigten sich bei allen 3 Genotypen ausgeprägte Veränderungen. TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere stellten sich gegenüber TLR2<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren zwar statistisch signifikant besser dar, dieser Unterschied ist jedoch in biologischem Kontext zu

vernachlässigen. Darüberhinaus muss hier beachtet werden, dass auch bei den *E. coli*-infizierten Mäusen die Tiere mit TLR4/IL10-Defizienz einen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen niedrigeren histopathologischen Score aufwiesen.

#### **4.6.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen des Colons**

Immunhistochemische Untersuchungen des Colons zeigten bei TLR2/IL10- und TLR4/IL10-defizienten Tieren eine signifikant geringere Infiltration des Gewebes mit CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Betrachtung der Caspase3<sup>+</sup> apoptotischen Zellen. Auch hier wiesen *C. jejuni*-infizierte TLR2/IL10- und TLR4/IL10-defiziente Tiere signifikant weniger apoptotische Zellen auf, was für einen geringeren Zelluntergang im Colon dieser Tiere spricht. Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei allen drei Genotypen zu einem signifikanten Anstieg Ki67<sup>+</sup> proliferativer Zellen. Der Befund, dass TLR2/IL10- und TLR4/IL10-defiziente Tiere nach Infektion mit *C. jejuni* weniger Ki67<sup>+</sup> proliferative Zellen aufwiesen als C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere lässt sich am ehesten durch die homöostatische Funktion von TLRs erklären. Ligandenbindung der TLR führt in intestinalen Epithelzellen zu deren vermehrter Proliferation (Abreu 2010). Dieser Effekt entfällt bei den von uns untersuchten Tieren mit TLR-Defizienz.

Des Weiteren konnten nach *C. jejuni*-Infektion im Colon von TLR2/IL10- und TLR4/IL10-defizienten Tieren signifikant weniger Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden. Zusammen mit den bereits erläuterten immunhistochemischen Befunden spricht auch dies für eine weniger stark ausgeprägte Immunantwort auf eine *C. jejuni*-Infektion bei vorliegender TLR-Defizienz. Der bei TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen niedrigere Anteil B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten im Colon könnte für eine TLR4-abhängige Aktivierung der B-Zellen sprechen und lässt auf eine im Vergleich zu C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren geringere Beteiligung der adaptiven Immunabwehr schließen.

#### **4.6.1.3 Zytokinbestimmungen auf Protein- und mRNA-Ebene**

Bei TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren konnte im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen nach Infektion mit *C. jejuni* signifikant weniger TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Dies zeigte sich für TNF- $\alpha$  nicht nur auf Protein- sondern auch auf mRNA-Ebene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei TLR4-Defizienz zu einer weniger starken Immunreaktion nach Infektion mit *C. jejuni* kommt. Diese Ergebnisse werden durch Daten von Rathinam *et al.* bestätigt, die durch *in vitro* Analysen von dendritischen Zellen zeigen konnten, dass die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bei Vorliegen einer TLR4-Defizienz signifikant reduziert war (Rathinam *et al.* 2009).

Hinsichtlich des Chemokins MCP-1 wiesen Tiere mit TLR-Defizienz und C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere vergleichbare Konzentrationen auf.

Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren zu einem signifikanten Anstieg von IL-6, während eine TLR4/IL10-Defizienz mit einer signifikant geringeren IL-6-Induktion auf Protein- sowie mRNA-Ebene einherging. Diese Ergebnisse deuten auf einen TLR4-abhängigen Mechanismus der Induktion von IL-6 hin und stehen im Einklang mit einer milderen Immunantwort auf *C. jejuni* bei TLR4-Defizienz. Unser Ergebnis steht in gewissem Widerspruch zu den von Friis *et al.* erhobenen Daten, die in *in vitro* Arbeiten mit Caco-2 Zellen zeigen konnten, dass die IL-6-Freisetzung nach Infektion mit *C. jejuni* TLR2-abhängig verläuft (Friis *et al.* 2009).

Nach Infektion mit *C. jejuni* zeigte sich im Vergleich zu Tieren, welche mit *E. coli* rekolonisiert worden waren bei allen drei Genotypen auf Proteinebene ein Anstieg der IL-22-Expression. Die Betrachtung der IL-22-mRNA-Expression bestätigte den Anstieg nach Infektion mit *C. jejuni*. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant geringere IL-22 mRNA-Expression zeigten als C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere. Auf Grund dieser Ergebnisse ist die Funktion von IL-22 in unserem Modell sowohl über seine entzündungsfördernden Mechanismen als auch über reaktive, protektive Mechanismen denkbar. Auch die Untersuchungen der IL-23-mRNA-Expression lassen auf Grund der signifikant geringeren Expression bei TLR4/IL10-Defizienz eine weniger starke Inflammation des Colons bei diesem Genotyp vermuten.

*C. jejuni*-infizierte Tiere zeigten eine niedrigere IL-18 mRNA-Expressionen als *E. coli*-infizierte Tiere des entsprechenden Genotyps, was gegen eine proinflammatorische Rolle dieses Zytokins in unserem Modell spricht. IL-18 ist ebenfalls am Erhalt der Epithelintegrität beteiligt. Ausgehend von diesem Wirkmechanismus wären nach Infektion mit *C. jejuni* ebenfalls höhere Konzentrationen zu erwarten als nach Infektion mit *E. coli*.

Besonders die Rolle von IL-18 und den Wirkmechanismus von IL-22 betreffend, sind zum momentanen Zeitpunkt keine eindeutigen Aussagen möglich. Das von uns etablierte akute Inflammationsmodell eröffnet die Möglichkeit, beispielsweise durch die gezielte Verwendung von Knockout-Mäusen, die Rolle von ausgewählten Zytokinen näher zu untersuchen und damit die Immunantwort des Wirts bei *C. jejuni*-Enteritis weiter zu charakterisieren.

## 5. Zusammenfassung

*C. jejuni* stellt weltweit einen der häufigsten Verursacher bakteriell bedingter akuter Gastroenteritiden beim Menschen dar. In Deutschland ist *C. jejuni* seit 2007 der häufigste Erreger gemeldeter bakterieller Durchfallerkrankungen. Das Fehlen geeigneter Säugetiermodelle, welche einen Entzündungszustand nachahmen wie er beim Menschen beobachtet wird, hat bislang das Verständnis der Pathogenese der *C. jejuni*-Enteritis erschwert. Konventionell besiedelte Mäuse weisen eine ausgeprägte Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* auf. Um die Rolle der kommensalen Darmflora hinsichtlich der Kolonisationsresistenz zu untersuchen haben wir neue murine Infektionsmodelle entwickelt. Durch die Verwendung gnotobiotischer Mäuse konnte der kausale Zusammenhang zwischen der murinen Darmflora und der Kolonisationsresistenz gegenüber *C. jejuni* bestätigt werden. *C. jejuni* besiedelte den gesamten Gastrointestinaltrakt mit humaner nicht jedoch mit muriner Flora assoziierter gnotobiotischer Wildtypmäuse. Das stabile Ansiedeln von *C. jejuni* im gnotobiotischen und mit humaner Flora assoziierten Modell war mit einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen, T-Zellen, regulatorischer T-Zellen, neutrophiler Granulozyten und B-Zellen im Colon *in situ* verbunden. Analysen der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon gnotobiotischer Mäuse zeigten nach Infektion mit *C. jejuni* einen Anstieg von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18 und IL-23p19. Das Überkommen der Kolonisationsresistenz konnte ebenso in einem akuten bzw. chronischen Inflammationsmodell beobachtet werden. Dem Modell der mit humaner Flora assoziierten Maus sowie den akuten bzw. chronischen Inflammationsmodellen war die höhere Last an *Enterobacteriaceae* gemeinsam. Wir konnten zeigen, dass die sekundäre, dauerhafte Erhöhung der intraluminalen *E. coli*-Dichte zu stabilen *C. jejuni* B2-Lasten im Faeces der Tiere führte. Um eine altersabhängige Entwicklung der Kolonisationsresistenz zu untersuchen, wurden 3 Wochen alte C57BL/10-Wildtypmäuse mit *C. jejuni* infiziert. Über einen Untersuchungszeitraum von ca. 3 Monaten konnten ein stabiles Ansiedeln des Pathogens sowie positive Haemocult-Teste nachgewiesen werden.

Mit der Infektion gnotobiotischer C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tiere, bei welchen die Eradikation der Darmflora direkt nach Absetzen von der Mutter im Alter von 3 Wochen begonnen wurde, konnten wir ein durch *C. jejuni* induzierbares akutes Inflammationsmodell etablieren, welches der beim Menschen beobachteten Schwere der Entzündung nahekommt. *C. jejuni*- nicht aber *E. coli*-infizierte Tiere entwickelten eine schwere ulzerative Colitis und blutige Durchfälle. Die starke Inflammation des Colons ging mit einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen, neutrophiler Granulozyten, T-Zellen, regulatorischer T-Zellen und B-Zellen im Colon *in situ* einher. Zytokinmessungen aus Colon-Organkulturüberständen ergaben einen signifikanten

Anstieg von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-22 und MCP-1. Analysen der mRNA-Expression im Colon konnten den auf Proteinebene beobachteten Anstieg von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-22 bestätigen und zeigten weiterhin signifikant höhere Expressionen von IL-6 und IL-23 im Vergleich zu *E. coli*-infizierten Tieren. Die Untersuchung der Rolle von TLR4 in diesem Modell akuter Inflammation gab Hinweise auf eine milder verlaufende Entzündung nach *C. jejuni*-Infektion bei TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu C10/IL10<sup>-/-</sup>-Tieren. Dieser Befund fand Bestätigung in der gegenüber C10/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringeren Anzahl apoptotischer Zellen, T-Zellen und regulatorischer T-Zellen im Colon sowie signifikant niedrigeren TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ - und IL-6-Konzentrationen auf Proteinebene und einer ebenfalls signifikant geringeren mRNA-Expression von IL-22 und IL-23 im Colon bei *C. jejuni*-infizierten TLR4<sup>-/-</sup>/IL10<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Befunde bestätigen die Rolle von TLR4-Signalwegen bei *C. jejuni*-Infektionen im Mausmodell. Diese Ergebnisse erlauben wertvolle Einblicke in die Immunantwort bei der *C. jejuni*-Enteritis und ermöglichen zukünftig deren weitere Charakterisierung.

## Literaturverzeichnis

- Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-144.
- Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ, Powrie F. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2008;226:147-159.
- Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-1206.
- Al-Salloom FS, Mahmeed AA, Ismaeel A et al. *Campylobacter*-stimulated INT407 cells produce dissociated cytokine profiles. *J Infect* 2003;47:217-224.
- Al-Sayeqh AF, Loughlin MF, Dillon E, Mellits KH, Connerton IF. *Campylobacter jejuni* activates NF- $\kappa$ B independently of TLR2, TLR4, Nod1 and Nod2. *Microb Pathog* 2010;49:294-304.
- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8:411-420.
- Baqar S, Applebee LA, Gilliland TC, Lee LH, Porter CK, Guerry P. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellum-secreted proteins in mice. *Infect Immun* 2008;76:3170-3175.
- Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:5571-5576.
- Blaser MJ, Black RE, Duncan DJ, Amer J. *Campylobacter jejuni*-specific serum antibodies are elevated in healthy Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 1985;21:164-167.
- Brand S, Beigel F, Olszak T et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G827-38.
- Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:868-876.
- Carswell CL, Rigden MD, Baenziger JE. Expression, Purification, and Structural Characterization of CfrA, a Putative Iron Transporter from *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 2008;190:5650-5662.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313:1126-1130.
- Centers for disease control and prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States 2009. *MMWR* 2010;59:418-422.
- Chang C, Miller JF. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect Immun* 2006;74:5261-5271.
- Chaturvedi A, Pierce SK. How location governs toll like receptor signalling. *Traffic* 2009;10:621-628.
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757-1764.
- Crushell E, Harty S, Sharif F, Bourke B. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? *Pediatr Res* 2004;55:3-12.
- Dann SM, Eckmann L. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:115-120.
- De Zoete MR, Keestra AM, Roszczenko P, van Putten JP. Activation of human and chicken toll-like receptors by *Campylobacter* spp.. *Infect Immun* 2010;78:1229-1238.
- Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 2009;31:368-376.
- Dupaul-Chicoine J, Yeretsian G, Doiron K et al. Control of Intestinal Homeostasis, Colitis, and Colitis-Associated Colorectal Cancer by the Inflammatory Caspases. *Immunity* 2010;32:367-378.
- EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 2009;223.
- Everest PH, Goossens H, Butzler JP et al. Differentiated caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Med Microbiol* 1992;37:319-325.
- Fauchère JL, Véron M, Lellouch-Tubiana A, Pfister A. Experimental infection of gnotobiotic mice with *Campylobacter jejuni*: colonisation of intestine and spread to lymphoid and reticulo-endothelial organs. *J Med Microbiol* 1985;20:215-224.
- Field LH, Underwood JL, Pope LM, Berry LJ. Intestinal Colonization of Neonatal Animals by *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Infect Immun* 1981;33:884-892.
- Field LH, Underwood JL, Berry LJ. The role of gut flora and animal passage in the colonisation of adult mice with *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol* 1984;17:59-66.
- Field LH, Headley VL, Payne SM, Berry LJ. Influence of Iron on Growth, Morphology, Outer Membrane Protein Composition, and Synthesis of Siderophores in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1986;54:126-132.
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT et al. Gastroenteritis in NF- $\kappa$ B-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. *Infect Immun* 2004;72:1116-1125.
- Friis LM, Keelan M, Taylor DE. *Campylobacter jejuni* Drives MyD88-Independent Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun* 2009;77:1553-1560.
- Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 2010;140:859-870.
- Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 2008;10:1599-1607.
- Gilbert M, Godschalk PC, Karwaski MF et al. Evidence for acquisition of the lipooligosaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni* GB11, a strain isolated from a patient with Guillain-Barré syndrome, by horizontal exchange. *Infect Immun* 2004;72:1162-1165.
- Godschalk PC, Kuijff ML, Li J et al. Structural characterization of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide outer cores associated with Guillain-Barré and Miller Fisher syndrome. *Infect Immun* 2007;75:1245-1254.
- Grant CC, Konkel ME, Cieplak W Jr, Tompkins LS. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun* 1993;61:1764-1771.

- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
- Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2005;366:1653-1666.
- Haghjoo E, Galán JE. Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4614-4619.
- Harvey P, Battle T, Leach S. Different invasion phenotypes of campylobacter isolates in caco-2 cell monolayers. *J Med Microbiol* 1999;48:461-469.
- 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;177:8785-8795.
- 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:e662.
- Holmes K, Mulholland F, Pearson BM et al. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* 2005;151:243-257.
- Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol* 2009;7:367-374.
- Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010;10:159-169.
- Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002;22:283-307.
- Hu L, Bray MD, Osorio M, Kopecko DJ. *Campylobacter jejuni* Induces Maturation and Cytokine Production in Human Dendritic Cells. *Infect Immun* 2006;74:2697-2705.
- Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ. Host-pathogen interactions in campylobacter infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:505-518.
- Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2003;5:165-174.
- Jones MA, Töttemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA. Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2003;71:2626-2633.
- Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15064-15069.
- Kaldor J, Pritchard H, Serpell A et al. Serum antibodies in *Campylobacter* enteritis. *J Clin Microbiol* 1983;18:1-4.
- Kanai T, Watanabe M, Okazawa A et al. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121:875-888.
- Karlyshev AV, Ketley JM, Wren BW. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:377-390.
- Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by campylobacter. *Microbiology* 1997;143:5-21.
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V et al. Secretion of virulence proteins from campylobacter jejuni is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 2004;186:3296-3303.
- Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:396-401.
- Krause-Gruszczynska M, van Alphen LB, Oyarzabal OA et al. Expression patterns and role of the CadF protein in campylobacter jejuni and campylobacter coli. *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:9-16.
- Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ et al. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun* 2003;71:6058-6062.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320:1647-1651.
- Lippert E, Karrasch T, Sun X et al. Gnotobiotic IL-10<sup>-/-</sup>;NF-κB<sup>EGFP</sup> Mice Develop Rapid and Severe Colitis Following *Campylobacter jejuni* Infection. *PLoS ONE* 2009;4:e7413.
- Lupp C, Robertson ML, Wickham ME et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007;2:119-129.
- Macpherson AJ, Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:36-43.
- Magalhaes JG, Tattoli I, Giardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 2007;19:106-115.
- Mahler M, Leiter EH. Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:347-355.
- Mansfield LS, Bell JA, Wilson DL et al. C57BL/6 and congenic interleukin-10-deficient mice can serve as models of campylobacter jejuni colonization and enteritis. *Infect Immun* 2007;75:1099-1115.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-826.
- Merlin T, Sing A, Nielsen PJ, Galanos C, Freudenberg MA. Inherited IL-12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the Lps(d) C57BL/10ScCr mouse. *J Immunol* 2001;166:566-573.
- Miller CE, Williams PH, Ketley JM. Pumping iron: mechanisms for iron uptake by *Campylobacter*. *Microbiology* 2009;153:157-3165.
- Moran AP. Structure and conserved characteristics of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *J Infect Dis* 1997;176:S115-121.
- Morooka T, Umeda A, Amako K. Motility as an intestinal colonization factor for campylobacter jejuni. *J Gen Microbiol* 1985;131:1973-1980.
- Muñoz 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;206:3047-3059.
- Murai M, Turovskaya O, Kim G et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;10:1178-1184.



- Murphy C, Carroll C, Jordan KN. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen campylobacter jejuni. *J Appl Microbiol* 2006;100:623-632.
- Nachamkin I, Yang XH. Human antibody response to campylobacter jejuni flagellin protein and a synthetic n terminal flagellin peptide. *J Clin Microbiol* 1989;27:2195-2198.
- Nachamkin I, Allos BM, Ho T. Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:555-567.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688-693.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5:e177.
- Pei Z, Burucoa C, Grignon B et al. Mutation in the peb1A locus of campylobacter jejuni reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun* 1998;66:938-943.
- Poly F, Guerry P. Pathogenesis of campylobacter. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:27-31.
- Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I, Leach SA. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of Campylobacter jejuni. *J Med Microbiol* 2000;49:473-479.
- 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;118:29-241.
- Rao MR, Naficy AB, Savarino SJ et al. Pathogenicity and convalescent excretion of Campylobacter in rural Egyptian children. *Am J Epidemiol* 2001;154:166-173.
- Rathinam VA, Hoag KA, Mansfield LS. Dendritic cells from C57BL/6 mice undergo activation and induce Th1-effector cell responses against *Campylobacter jejuni*. *Microbes Infect* 2008;10:1316-1324.
- Rathinam VA, Appledorn DM, Hoag KA, Amalfitano A, Mansfield LS. *Campylobacter jejuni*-Induced Activation of Dendritic Cells Involves Cooperative Signaling through Toll-like Receptor 4 (TLR4)-MyD88 and TLR4-TRIF Axes. *Infect Immun* 2009;77:2499-2507.
- Robert-Koch-Institut 2007; Infektionsepidemiologisches Jahrbuch, Jahresstatistik nach Bundesland.
- Robert-Koch-Institut 2008; Infektionsepidemiologisches Jahrbuch, Jahresstatistik nach Bundesland.
- Robert-Koch-Institut 2009; Infektionsepidemiologisches Jahrbuch, Jahresstatistik nach Bundesland.
- Sahin O, Morishita TY, Zhang Q. Campylobacter colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim Health Res Rev* 2002;3:95-105.
- Sanos SL, Bui VL, Mortha A et al. ROR $\gamma$  and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009;10:83-91.
- Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007;19:70-83.
- Samuel MC, Vugia DJ, Shallow S et al. Epidemiology of sporadic campylobacter infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999 *Clin Infect Dis* 2004;38:165-174.
- Siddiqui KR, Powrie F. CD103<sup>+</sup> GALT DCs promote Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Mucosal Immunol* 2008;1:S34-38.
- Siegesmund AM, Konkel ME, Klens JD et al. *Campylobacter jejuni* infection of differentiated THP-1 macrophages results in interleukin 1 $\beta$  release and caspase-1-independent apoptosis. *Microbiology* 2004;150:561-569.
- Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F et al. Neutralisation 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:R1264-1273.
- Siegmund B. Interleukin-18 in Intestinal Inflammation: Friend and Foe? *Immunity* 2010;32:300-302.
- Smith JL, Bayles DO. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 2006;32:227-248.
- Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 2007;19:59-69.
- Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JS. Campylobacter jejuni. *Lett Appl Microbiol* 2005;41:297-302.
- Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 2008;16:107-114.
- Stecher B, Chaffron S, Käppli 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:e1000711.
- Stecher B, Robbani R, Walker AW et al. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5:e244.
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534-544.
- Taylor DN, Perlman DM, Echeverria PD, Lecomboon U, Blaser MJ. Campylobacter immunity and quantitative excretion rates in Thai children. *J Infect Dis* 1993;168:754-758.
- Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that muc2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;113:117-129.
- Van Spreeuwel JP, Duursma GC, Meijer CJ et al. Campylobacter colitis: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut* 1985;26:945-951.
- Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of campylobacter jejuni infection of humans. *Microbes Infect* 1999;1:1023-1033.
- Wassenaar TM, Bleumink-Pluym MC, van der Zeijst BA. Inactivation of campylobacter jejuni flagellin genes by homologous recombination demonstrates that flaA but not flaB is required for invasion. *EMBO J* 1991;10:2055-2061.
- Watson RO, Novik V, Hofreuter D, Lara-Tejero M, Galán JE. A MyD88-Deficient Mouse Model Reveals a Role for Nramp1 in *Campylobacter jejuni* Infection. *Infect Immun* 2007;75:1994-2003.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346-352.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signalling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-1150.

- Young KT, Davis LM, DiRita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:665-679.
- Yrios JW, Balish E. Colonization and Infection of Athymic and Euthymic Germfree Mice by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Infect Immun* 1986;53:378-383.
- Zaki MH, Boyd KL, Vogel P et al. The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis. *Immunity* 2010;32:379-391.
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29:947-957.
- Zeng X, Xu F, Lin J. Molecular, Antigenic, and Functional Characteristics of Ferric Enterobactin Receptor CfrA in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2009;77:5437-5448.
- Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, Bajaj-Elliott M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:123-129.

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

## **Publikationen**

Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM et al. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. PLoS ONE 2010; 5(12): e15099.

Alter T, Bereswill S, Glünder G, Haag LM, Hänel I, Heimesaat MM, Lugert R, Rautenschlein S, Weber RM, Zautner AE, Groß U. Welche Rolle spielen Tiere für die Campylobacteriose des Menschen? (Im Druck; Bundesgesundheitsblatt)

Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM et al. Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the „Ménage à Trois" of Campylobacter jejuni, Microbiota and Host Innate Immunity. (Manuskript eingereicht, PLoS ONE)

### **Danksagungen**

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Mein Dank richtet sich an Prof. Dr. Stefan Bereswill für die freundliche Überlassung des Themas sowie alle theoretische und praktische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus M. Heimesaat für seine geduldige und engagierte Ausbildung, seine Hilfe bei Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente sowie seine Unterstützung beim Verfassen der Arbeit.

Dr. André Fischer und Melba Muñoz möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Gernot Reifenberger, Ursula Rüschenndorf, Michaela Wattrodt, Uwe Lohmann und Solvy Wolke für die freundliche Zusammenarbeit.

Den Tierpflegekräften des FEM danke ich für die Zusammenarbeit, praktische Anleitung und Unterstützung.

Dr. Anja Kühl und Simone Spieckermann gilt mein Dank für die praktische Arbeit bei der Herstellung der histologischen Schnitte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Bettina Otto für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Rita Plickert danke ich für die geduldige und intensive Einführung in die mikrobiologischen Methoden.

Herzlich danke ich Dr. Janine Zweigner für die konstruktiven Diskussionen und die wertvolle Unterstützung.

Stellvertretend für das Graduiertenkolleg „Immuco“ des Sonderforschungsbereiches 633 der Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. danke ich PD Dr. Katja Klugewitz und Dr. Tina Kornprobst für das umfassende Lehrangebot sowie die finanzielle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Claudio, Claudia Heesch und Katia Bouscarrut.

## Selbständigkeitserklärung

„Ich, Lea-Maxie Haag, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle der kommensalen Darmflora und der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der *Campylobacter jejuni*-Enteritis im Mausmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift