

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

DISSERTATION

Charakterisierung von Komponenten des angeborenen
Immunsystems im murinen Colitis-Modell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Otto

aus Cottbus

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. St. Bereswill
 2. Prof. Dr. med. M. Hornef
 3. Priv.-Doz. Dr. med. K. Klugewitz

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	7
1.2	Das Colitis-Modell der IL-10 ^{-/-} Maus.....	8
1.3	Die Darmflora als Motor der Entzündung.....	9
1.4	Aufbau der Darmbarriere	10
1.5	Die Rolle der Toll-like Rezeptoren im intestinalen Immunsystem.....	11
1.6	Genetik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	13
1.7	Pathogene und CED	14
1.8	Die <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion	15
1.9	Ziele dieser Arbeit.....	17
2	Material	18
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	18
2.2	Kommerzielle „Kits“	19
2.3	Oligonukleotidprimer und –sonden.....	19
2.4	DNA-Längenmarker, Enzyme.....	21
2.5	Antikörper	21
2.5.1	Durchflusszytometrie-Antikörper	21
2.5.2	Immunhistochemie-Antikörper	22
2.6	Nährmedien und Seren	22
2.7	Geräte und Plastikwaren.....	22
2.8	Sonstiges.....	24
3	Methoden.....	25
3.1	Versuchstiere	25
3.2	Klinischer Score	25
3.3	Tötung der Tiere und Organentnahme	26
3.4	Histologische Methoden.....	26

3.4.1	Herstellung histologischer Präparate.....	26
3.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
3.4.3	Auswertung der histologischen Präparate.....	27
3.4.4	Herstellung und Beurteilung immunhistochemischer Schnitte.....	27
3.5	Mikrobiologische Methoden.....	28
3.5.1	Bestimmung bakterieller Translokationsraten in Blut, MLN, Milz, Leber und Niere.....	28
3.5.2	Mikrobiologische Differenzierung.....	29
3.5.3	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43431: Anzucht und Herstellung der Infektionssuspension.....	30
3.5.4	<i>C. jejuni</i> -Quantifizierung im Colon.....	31
3.5.5	<i>Escherichia coli</i> -Quantifizierung im Colon.....	32
3.6	Zytokin- und Proteinmessungen.....	32
3.6.1	Organkultur Colon.....	32
3.6.2	Cytometric Bead Array (CBA).....	32
3.6.3	Enzyme-linked Immunabsorbent Assay (ELISA).....	32
3.6.4	Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	33
3.6.5	Bestimmung der Konzentration von Stickstoffmonoxid.....	33
3.7	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.7.1	RNA-Extraktion aus Colongewebe.....	33
3.7.2	Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) für die mRNA-Bestimmung.....	34
3.7.3	DNA-Extraktion aus Mausgewebe.....	34
3.7.4	Genotypisierung der Mäuse.....	35
3.8	Zellisolierung und Durchflusszytometrie.....	36
3.8.1	Isolierung von Immunzellen aus MLN und Milz.....	36
3.8.2	Isolierung von Immunzellen aus der Leber.....	36
3.8.3	Isolierung der Intraepithelialen und Lamina propria-Lymphozyten.....	37
3.8.4	Fluorescence activated cell sorting (FACS) -Analyse der isolierten Zellen.....	38

3.9	Software und Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	TLR2- und TLR4-Defizienz im IL-10 ^{-/-} -Colitis Modell der Maus	39
4.1.1	Klinische Beurteilung der naiven Mäuse	39
4.1.2	Colonlänge und pH-Werte im Colon naiver Mäuse.....	40
4.1.3	Histopathologie des Colons der naiven Mäuse	40
4.1.4	Immunhistochemische Analysen im Colon der naiven Mäuse	42
4.1.5	Zytokinkonzentrationen im Colon naiver Mäuse.....	44
4.1.6	mRNA-Expression im Colon naiver Mäuse.....	47
4.1.7	FACS-Analyse der mesenterialen Lymphknoten naiver Mäuse	49
4.1.8	FACS-Analyse der Milz naiver Mäuse	51
4.1.9	Quantifizierung von <i>E. coli</i> im Coloninhalt	52
4.1.10	Translokation lebender Bakterien in MLN, Leber, Milz, Niere und Blut.....	53
4.2	Auswirkungen von <i>C. jejuni</i> auf die IL-10 ^{-/-} -Colitis und die Rolle der TLR2 und TLR4 im Rahmen der <i>C. jejuni</i> -Infektion.....	56
4.2.1	<i>C. jejuni</i> Konzentrationen im Colon der IL-10 ^{-/-} , IL-10 ^{-/-} /TLR2 ^{-/-} und IL-10 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-} Mäuse.....	56
4.2.2	Verlauf des klinischen Zustandes der Mäuse nach der Infektion mit <i>C. jejuni</i>	57
4.2.3	Colonlänge und pH-Wert im Colon der infizierten Mäuse	58
4.2.4	Histopathologie des Colons infizierter Mäuse	59
4.2.5	Immunhistochemische Analyse des Colons naiver und infizierter Mäuse.....	59
4.2.6	Zytokinanalyse	61
4.2.7	mRNA-Bestimmung im Colon infizierter Mäuse	63
4.2.8	Immunzellpopulationen in den MLN infizierter und naiver Tiere.....	65
4.2.9	Immunzellpopulationen in der Milz naiver und infizierter Tiere.....	67
4.2.10	Durchflusszytometrische Analyse der Leber	69
4.2.11	Durchflusszytometrische Analyse der IEL.....	70
4.2.12	Durchflusszytometrische Analyse der LPL.....	71

4.2.13	Veränderung der <i>E. coli</i> -Konzentration durch die Infektion.....	73
4.2.14	Bakterielle Translokation in MLN, Leber, Milz, Niere und Blut mit <i>C. jejuni</i> infizierter Mäuse.....	73
5	Diskussion	78
5.1	Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 im murinen IL-10 ^{-/-} -Modell.....	78
5.2	Von <i>C. jejuni</i> hervorgerufene Veränderungen im murinen IL10 ^{-/-} -Modell	85
6	Zusammenfassung	92
7	Abkürzungsverzeichnis	93
8	Literatur	95
	Lebenslauf	109
	Publikationen.....	109
	Danksagung	110
	Selbständigkeitserklärung	111

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die beiden Hauptformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Ätiologie ist unbekannt, man geht jedoch von einer überschießenden Immunantwort des mukosalen Immunsystems gegenüber der Darmflora in genetisch prädisponierten Individuen aus.^{1,2} Genetische Faktoren spielen bei Morbus Crohn eine größere Rolle als bei Colitis ulcerosa, deren Auftreten in stärkerem Maße von Umweltfaktoren abhängig ist.³ Die Prävalenz der CED beträgt in Nordamerika und Europa 10-200 Fälle pro 100000 Einwohner. Die Inzidenz stieg in den letzten 50 Jahren an. Die Erkrankungen manifestieren sich in der 2.-4. Lebensdekade und verlaufen bei einem Großteil der Patienten schubweise.⁴

Abdominalschmerzen und Diarrhoe sind die beiden Leitsymptome bei CED-Patienten. An Morbus Crohn-Erkrankte entwickeln ein Malabsorptionssyndrom mit Gewichtsverlust. Kinder leiden aufgrund dessen an Wachstumsstörungen. Zwischen Darm und Haut bzw. anderen Organen können sich Fisteln bilden. Anorektale Abszesse und Darmstenosen sind weitere mögliche Komplikationen. Das Leitsymptom der Colitis ulcerosa sind blutig-schleimige Durchfälle. Abdominalschmerzen treten häufig vor der Defäkation auf (sogenannte Tenesmen). Gewichtsverlust und Wachstumsstörungen im Kindesalter treten seltener als bei Morbus Crohn auf. Es besteht ein erhöhtes Karzinomrisiko, das mit dem Ausmaß der Colonbeteiligung und der Erkrankungsdauer korreliert.⁵ Bei Patienten mit CED kann es zu einer Beteiligung extraintestinaler Organe und Symptomen wie Arthralgien sowie anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der primär sklerosierenden Cholangitis, Morbus Bechterew und Psoriasis kommen.⁶

Die Therapie zielt darauf ab, eine Remission zu induzieren und zu erhalten. Dazu werden neben einer Ernährungstherapie verschiedene anti-inflammatorische Medikamente wie Mesalazin, Azathioprin, Kortikosteroide, Antibiotika, Immunsuppressiva, und Biologicals wie Tumornekrose-Faktor α (TNF α)-Blocker eingesetzt.^{7,8} Diese Therapieansätze sind rein symptomatisch. Eine kurative Therapie existiert derzeit nicht.

Beim Morbus Crohn kann die Entzündung den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen. Am häufigsten tritt sie jedoch im terminalen Ileum und im Colon auf. Der Entzündungsprozess verläuft diskontinuierlich unter Einbindung aller Wandabschnitte des Darms von der Mukosa zur Serosa (transmurale Entzündung), wodurch Fistelbildungen möglich sind. Die ersten Läsionen treten häufig über den Peyer'schen Plaques auf.¹ Histopathologisch ist eine massive

Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen in die Darmwand kennzeichnend. Bis zu 60% der Patienten entwickeln Granulome.⁴ Im Gegensatz dazu betreffen die entzündlichen Veränderungen bei der Colitis ulcerosa nur die Mukosa und Submukosa der Darmwand. Die Entzündung breitet sich kontinuierlich vom Rektum beginnend aus und bleibt fast immer auf das Colon beschränkt.^{5,9,10} Es kommt zur Einwanderung von Lymphozyten und Granulozyten und dem Verlust von Becherzellen sowie zu Ulzerationen und Kryptenabszessen.⁴

An der Immunpathologie der CED sind verschiedene T-Zellantworten beteiligt.¹⁰ Es wurde beschrieben, dass Morbus Crohn vor allem auf einer T-Helferzell 1 (Th1)-vermittelten Immunreaktion beruht. Die Zytokine Interleukin (IL-)12 und Interferon γ (IFN γ) dominieren in der Immunantwort.^{11,12} Neuere Studien sehen eine ebenso bedeutende, wenn nicht weitaus bedeutendere Rolle der Th17-Zellen und IL-23 bei der Pathogenese des Morbus Crohn.^{13,14} Die Pathologie der Colitis ulcerosa hingegen wird über Th2-Zellen, Natürliche Killer T (NKT)-Zellen und IL-13 vermittelt, die zu einer Störung der Darmbarriere führen.^{15,16} Die chronische Colitis in der hier als Modell verwendeten IL-10-defizienten (-/-) Maus verläuft über Th1-vermittelte Entzündungsprozesse.^{17,18}

1.2 Das Colitis-Modell der IL-10^{-/-} Maus

Die Colitis, die sich spontan in der IL-10^{-/-} Maus entwickelt, ist ein gut etabliertes Modell für Entzündungsprozesse im distalen Gastrointestinaltrakt. Viele immunologische Mechanismen ähneln denen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.¹⁷ Interleukin 10 ist ein wichtiger Modulator im intestinalen Immunsystem. Die Hauptfunktionen dieses anti-inflammatorischen Zytokins liegen in der Begrenzung und Beendigung von Entzündungsreaktionen. Es unterdrückt die Aktivierung und die Effektorfunktion von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen und induziert die Differenzierung und Funktion regulatorischer T-Zellen. Weiterhin beeinflusst es Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, natürlichen Killerzellen, T-Effektor- und T-Helferzellen sowie weiteren Zelltypen.¹⁹ IL-10 wird von T-Zellen, Epithelzellen, Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) gebildet.²⁰

Die Depletion des IL-10-Gens in der IL-10^{-/-} Maus führt zu einer chronischen Enterocolitis, die durch eine starke Epithelhyperplasie, ein mononukleäres Infiltrat der Mukosa und eine hohe Inzidenz kolorektaler Karzinome gekennzeichnet ist.²¹ Das entzündliche Infiltrat weist eine erhöhte Anzahl $\alpha\beta$ TCR⁺ T-Helferzellen auf, die CD4 allein oder in Kombination mit CD8 α exprimieren.²² Diese Zellen sind vor allem in der Lamina propria angesiedelt. Colon-Organokulturen von IL-10^{-/-} Mäusen weisen erhöhte Mengen von IL-1 α , TNF α , IL-6, Stickoxid (NO) und IFN γ auf.^{17,23} Zu Beginn sind IL-12 und IFN γ an der Entzündungsreaktion beteiligt.

Die Behandlung mit anti-IL-12-monoklonalen Antikörpern sowie anti-IFN γ -monoklonalen Antikörpern verhindert die Entwicklung der Colitis bei 10 Tage bzw. 3 Wochen alten Mäusen. Bei erwachsenen (>3 Monate alten) Mäusen zeigt die anti-IFN γ -Behandlung keinen Effekt, während anti-IL-12-Antikörper eine Abschwächung der Colitis bewirken.^{23,24}

Im Verlauf der Entzündung kommt es zu einer Reduktion der Becherzellen und damit zu einer verminderten Schleimproduktion. Die Mucus-Schicht auf den Epithelzellen repräsentiert eine wichtige Barriere gegenüber Kommensalen und Pathogenen der Darmbakterien.²⁵ Durch die reduzierte Mucus-Produktion in Folge der Entzündung können Darmbakterien leichter zum Epithel gelangen, dieses überwinden und in die lymphatischen Organe und das Blut translozieren. Es kommt zum Übertritt von lebenden Bakterien und deren Bestandteilen in die Lamina propria, was die Entzündung verstärkt und die Erkrankung im Rahmen eines „*Circulus vitiosus*“ aufrechterhält.¹⁷

1.3 Die Darmflora als Motor der Entzündung

Bei der typischen Lokalisation der CED im terminalen Ileum und im Colon handelt es sich um die Regionen des Gastrointestinaltrakts, in denen die Konzentration an intraluminalen Bakterien am höchsten ist.⁹ Die Antigene der Darmbakterien besitzen ein starkes pro-inflammatorisches Potenzial. So kommt es in experimentellen Colitis-Modellen und auch bei der IL-10^{-/-} Maus nur dann zur Colitis, wenn die Tiere von einer normalen Darmflora besiedelt werden.^{26,27}

Auch beim Menschen wirkt die kommensale Darmflora pro-inflammatorisch und verstärkt die Entzündungsreaktionen bei CED. So zeigen Morbus Crohn Patienten im Schub eine erhöhte Produktion von Immunglobulin G (IgG), das gegen zytoplasmatische Proteine kommensaler Darmbakterien gerichtet ist. Erhöhte IgG-Spiegel treten auch bei Colitis ulcerosa-Patienten -in geringerer Ausprägung- auf.²⁸ Die Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora ist im entzündeten Darm der CED-Patienten aufgehoben.²⁹

Eine Verminderung der Bakterienlast wirkt sich auf das Krankheitsbild bei CED-Patienten positiv aus. So führt die kurzzeitige Verabreichung eines nicht resorbierbaren Breitspektrumantibiotikums bei aktiver Colitis ulcerosa zu einer Reduktion der mukosalen Entzündung und Besserung des klinischen Bildes.³⁰ Bei Morbus Crohn-Patienten gibt es Hinweise, dass Metronidazol und Ciprofloxacin allein sowie in Kombination bei Befall des Colons bzw. des Ileocolons einen Rückgang der Krankheitsaktivität bewirken, nicht aber bei isoliertem Ileumbefall.³¹⁻³³

Weiterhin ist die Zahl der mukosalen Bakterien im Darm von CED-Patienten erhöht³⁴ und die Zusammensetzung der Flora verändert sich hin zu einer Dysbiose, die die Entzündung fördert.³⁵

Dabei kommt es zu einer Vermehrung potenziell pro-inflammatorisch wirkender Kommensalen wie Bacteroides-Arten, *Escherichia coli* und Enterokokken sowie zu einer Reduktion „schützender“ Bakterien wie Bifidobakterien und Laktobazillus-Spezies.^{36,37} In Ileum-Biopsien von Morbus Crohn-Patienten konnten pathogene adherent-invasive *E. coli* (AIEC) nachgewiesen werden.³⁸ AIEC dringen aktiv in das Epithel ein, replizieren sich in Makrophagen und stimulieren diese zur Produktion von großen Mengen an TNF α .³⁹

Die besondere Herausforderung des mukosalen Immunsystems im Darm liegt darin, zum einen eine Ignoranz gegenüber der kommensalen Darmflora und den Nahrungsantigenen zu bewahren und zum anderen adäquat auf Pathogene zu reagieren.

1.4 Aufbau der Darmbarriere

Obwohl die Darmflora dem Wirt Vorteile bringt, können die darin enthaltenen Bakterien großen Schaden anrichten, wenn sie vom Lumen aus in das Epithel gelangen. An der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase sind sowohl physikalische, als auch immunologische Barrieren beteiligt. Eine wichtige Barriere besteht darin, den Kontakt der Bakterien mit dem Epithel zu reduzieren. Dies wird durch die Schleimschicht (Mucus), antimikrobielle Peptide und IgA vermittelt. Becherzellen produzieren die Mucine der Schleimschicht. Mäuse, denen das Mucin MUC2 fehlt, entwickeln im Rahmen der Dextran-Sulfate-Natrium (DSS)-Colitis eine stärkere intestinale Entzündung.⁴⁰

Schwerbrock und Mitarbeiter⁴¹ konnten zeigen, dass keimfreie IL-10-defiziente Mäuse vermindert MUC2 synthetisieren. Nach Besiedlung mit SPF-Darmflora kommt es zu einer reduzierten Sulfatierung von MUC2, was die Viskosität des Schleims vermindert und somit Bakterien den Durchtritt zum Epithel erleichtert. Verminderte MUC2-Synthese und MUC2-Sulfatierung konnten ebenso bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa beobachtet werden.⁴² Diese Ergebnisse zeigen, dass quantitative und strukturelle Veränderungen von MUC2 eine Schwächung der Barrierefunktionen der Mukosa bewirken. In der Folge werden die Möglichkeiten, Darmbakterien auf das Lumen zu begrenzen, eingeschränkt.

Die Epithelzellen des Darms produzieren antimikrobielle Peptide, die man auch als Defensine bezeichnet.⁴³ Einige Defensine werden ständig exprimiert.⁴⁴ Andere wiederum sind in ihrer Expression von der Aktivierung durch Bakterien via Toll-like Rezeptoren (TLR) abhängig. So führen Bakterien im Dünndarm dazu, dass über das TLR Adapterprotein „myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88)“ das antimikrobielle C-Typ Lektin „Regenerating islet-derived protein 3 (REG3)“ exprimiert wird.⁴⁵ Die meisten antimikrobiellen Peptide töten

Bakterien direkt durch enzymatische Zerstörung der bakteriellen Zellwand oder der inneren Membran.⁴⁶

Das in das Lumen sezernierte IgA vermindert den Kontakt der Darmbakterien mit dem Epithel und deren Durchtritt in tiefere Gewebeschichten.^{47,48} IgA kann zum einen T-Zell abhängig in den Keimzentren der Peyer'schen Plaques produziert werden⁴⁹, zum anderen T-Zell unabhängig in isolierten Lymphfollikeln⁵⁰ und der Lamina propria.⁵¹ Cerutti und Mitarbeiter⁵² konnten zeigen, dass Darmepithelzellen des Menschen den Klassenwechsel von B-Zellen hin zu IgA₂ bewirken können, wenn sie Bakterien über Toll-like Rezeptoren (TLR) wahrnehmen.

1.5 Die Rolle der Toll-like Rezeptoren im intestinalen Immunsystem

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Komponenten des angeborenen Immunsystems, die für die Infektabwehr, Regeneration und Homöostase in der Darmschleimhaut essentiell sind.

TLR sind Typ-1 Transmembran-Proteine, die sich aus drei Untereinheiten zusammensetzen: eine C-terminale Leucin-reiche Region, die der Ligandenbindung dient, ein zentraler Transmembran-Bereich und eine N-terminale zytosolische TIR (TOLL/IL-1-Rezeptor entsprechende) Region.⁵³

Die Ligandenbindung führt zur Interaktion der TIR-Region mit Adapterproteinen wie MyD88, TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Dabei wird eine intrazelluläre Signalkaskade (Abb. 1) in Gang gesetzt, an der der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist.

Jeder individuelle TLR wirkt über bestimmte Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren, was eine pro- oder anti-inflammatorische Immunantwort hervorruft. Abgesehen von TLR3 verlaufen alle TLR-Signalwege MyD88-abhängig und bewirken die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12, IL-6 und TNF. Der TLR3-Effekt wird unabhängig von MyD88 über das Adapterprotein TRIF vermittelt, was die Bildung von Typ-1 Interferonen zur Folge hat.⁵⁴ TLR4 bewirkt sowohl eine Aktivierung von MyD88, TRIF und TRAM.⁵⁵ TLR2 und 4 zeigen eine Interaktion mit TIRAP, deren Effekte jedoch weitgehend unbekannt sind.⁵¹

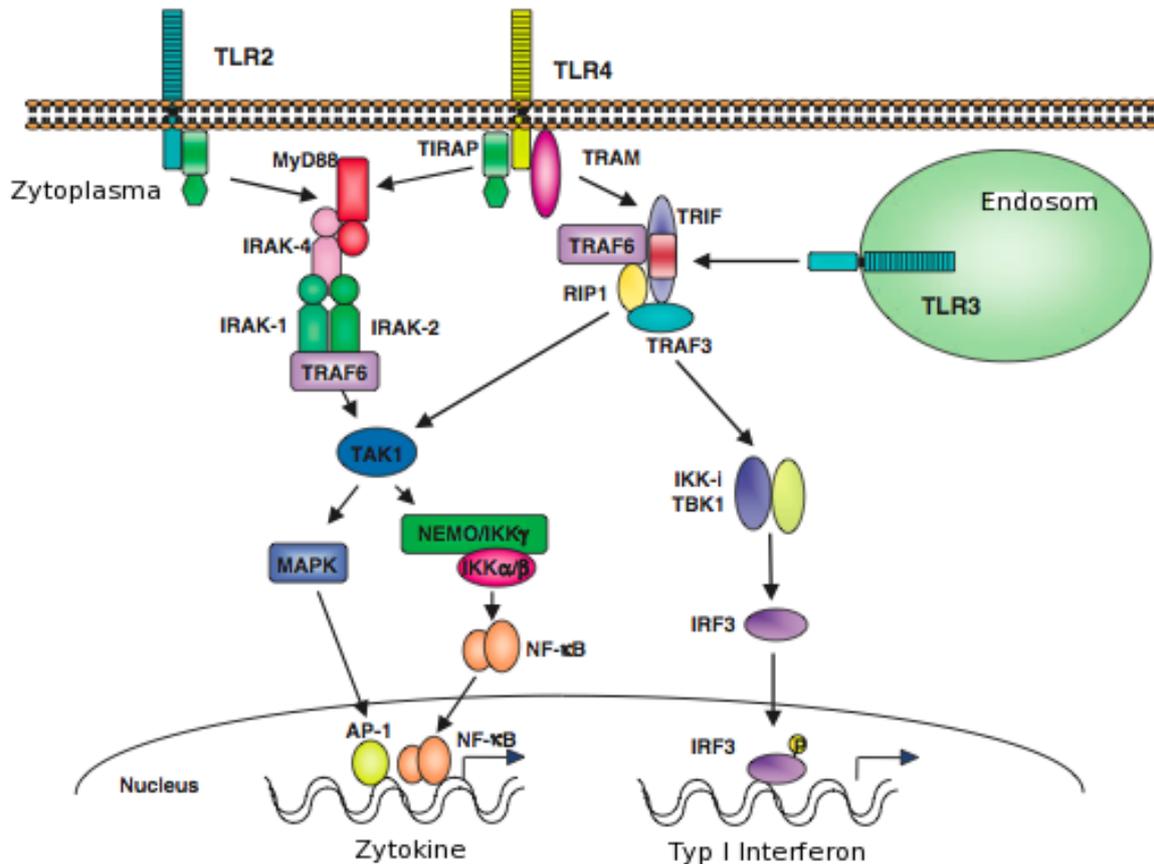


Abb. 1: MyD88-abhängige und TRIF-abhängige Signalwege nach TLR-Aktivierung (modifiziert nach ⁵⁷).

Die TLR werden kontinuierlich oder induzierbar von Darmepithelzellen, Myofibroblasten, enteroendokrinen Zellen und professionellen Immunzellen, wie T-Zellen und dendritischen Zellen, exprimiert.⁵² Eine Aktivierung der TLR im Epithel und der mononukleären Zellen in der Lamina propria initiiert eine anti-inflammatorische Kaskade, Proliferation des Epithels, IgA-Produktion, Aufrechterhaltung der tight junctions und Produktion antimikrobieller Peptide. Eine Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen löst dahingegen in der darunter liegenden Lamina propria eine pro-inflammatorische Immunantwort aus.^{59,60}

Die TLR-Liganden sind spezifische molekulare Bestandteile der Bakterien, wie das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, das TLR4 aktiviert, sowie zahlreiche Bestandteile der Bakterienwand, wie Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Peptidoglykane und der Pilzwand, die an TLR2 binden.⁶¹ Sie werden unter dem Begriff PAMPS (pathogen associated molecular pattern) zusammengefasst, sind aber nicht spezifisch für Pathogene, sondern werden ebenso von Darmkommensalen exprimiert.

Die Rolle der TLR im Rahmen der Wundheilung und Epithelregeneration wurde für die DSS-Colitis untersucht. Die akute DSS-Colitis verläuft bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen

schwerer als bei korrespondierenden Wildtypen.⁶²⁻⁶⁵ Dies geschieht nicht durch eine verstärkte Entzündungsreaktion, sondern durch den Ausfall der für die Epithelregeneration wichtigen Stimuli via TLR. Diese protektive Funktion der TLR unterstreichen Versuche mit TLR-Liganden. Die Verabreichung von TLR-Liganden schwächt eine DSS-Colitis ab bzw. schützt davor.⁵⁸

Die Aktivierung von TLR kann ebenso zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort mit Beteiligung von IL-12, IL-23, TNF α und IFN γ führen. In unserer Arbeitsgruppe⁶⁶ konnte gezeigt werden, dass eine TLR2- bzw. TLR4-Defizienz in murinen Modellen zu einem milderem Verlauf der akuten DSS-Colitis und der *T. gondii*-Ileitis führt. Auch die Verabreichung eines TLR4-Antagonisten mildert die Colitis.⁶⁷ Eine Erklärung dafür ist, dass eine TLR4-Aktivierung in dendritischen Zellen eine starke IL-12p70 und IFN γ basierte Entzündungsreaktion auslöst. Es kommt so zu einer Th1-vermittelten Immunreaktion.

Dieser Signalweg wird nach TLR2-Aktivierung in schwächerer Form initiiert. Neben IL-12p70 spielen hier vermehrt IL-10 und Retinolsäure eine Rolle, was zu einer Th0, Th2 und T-regulatorischen Antwort führt.⁵⁴ TLR2 kann nach Ligandenbindung sowohl mit TLR1 als auch mit TLR6 dimerisieren. TLR2 in Kombination mit TLR6 bewirkt die Produktion großer Mengen IL-10 und geringer Mengen IL-12, während eine TLR2-TLR1 Aktivierung das Gegenteil zur Folge hat.⁶⁸

Der Mechanismus der akuten DSS-Colitis beruht zu einem Großteil auf der Zerstörung der Darmbarriere. Dies unterscheidet sie von chronischen Colitis-Modellen, bei denen die Epithelzerstörung sekundär aufgrund der chronischen Entzündung auftritt und ein Ungleichgewicht des Immunsystems im Vordergrund steht. Im Colitis-Modell zeigten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen keine Entzündungszeichen.⁶⁹ Auch IL10-MyD88^{-/-} Mäuse entwickeln keine Entzündung.⁷⁰

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen eine TLR2- bzw. TLR4-Aktivierung eine Entzündung sowohl abschwächen als auch verstärken kann.

1.6 Genetik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass genetische Faktoren für die Wahrscheinlichkeit, an einer CED zu erkranken eine wichtige Rolle spielen.⁷¹ Die Konkordanzrate beträgt bei monozygoten Zwillingen 58% für Morbus Crohn und 6-17 % für Colitis ulcerosa. Niedriger fällt sie bei dizygoten Zwillingen und anderen Geschwistern aus.⁷²⁻⁷⁴ CED sind folglich zu einem gewissen Anteil vererbbar, allerdings scheint es sich um eine große genetische Komplexität mit vielen beteiligten Genen zu handeln.⁴

Die Pathologie einer Gen-Veränderung, die zur Erkrankung an Morbus Crohn beiträgt, konnte vor kurzem geklärt werden. Es handelt sich hierbei um das Caspase Recruitment Domain 15 (CARD15)-Gen. Ungefähr 15% der Crohn-Patienten sind von dieser Mutation betroffen.⁷⁵⁻⁷⁷ Das CARD15-Gen, das die Nucleotide Binding Oligomerisation Domain 2 (NOD2) kodiert, stellt das bisher wichtigste und am besten untersuchte Pathologie-vermittelnde Gen im Rahmen von Morbus Crohn dar.^{78,79}

Funktionell ist NOD2 ein intrazellulärer Rezeptor, der Muramyl-Dipeptid (MDP), eine Komponente der bakteriellen Zellwand, erkennt, die bei fast allen Bakterien vorkommt.⁸⁰ NOD2 wird in Antigen-präsentierenden Zellen (APC)⁸¹ und Darmepithelzellen⁸² exprimiert. Die Aktivierung von NOD2 durch MDP führt zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalwegs.⁸³ Die mit Morbus Crohn verbundene CARD15-Genmutation führt zu einer gestörten NF-κB-Aktivierung nach NOD2-Stimulation mit bakteriellen Liganden.^{77,84,85} Da die Pathologie des Morbus Crohn vor allem über eine Th1-Antwort sowie die Zytokine IL-12 und IFN γ vermittelt wird^{12,86} und der NF-κB-Signalweg diese Th1-Antwort hervorruft, erscheint eine NF-κB abschwächende Mutation zunächst unlogisch. Watanabe und Strober^{87,88} konnten jedoch beweisen, dass die NOD2-Aktivierung normalerweise die TLR2-vermittelte Th1-Immunreaktion verhindert. Ein Ausfall der NOD2-Funktion durch eine Mutation ruft eine Dysregulation des TLR2-Signalwegs hervor, wodurch es zur übermäßigen Aktivierung der Th1-Antwort kommt.^{89,90} Weitere Pathomechanismen durch die Veränderung der NOD2-Funktion werden in Betracht gezogen, darunter eine verminderte Defensin-Produktion.⁹¹

Bisher konnten mittels genomweiter Assoziationsstudien mehr als 30 Risiko-Genloci für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa identifiziert werden.^{9,92,93} Dabei betreffen einige Gene wie z.B. ATG16L1 (autophagy-related 16-like protein1 kodiert⁹⁴), NOD2, IRGM (immunity-related GTPase family, M⁷⁹) und TLR4⁹⁵ nur Morbus Crohn bzw. nur Colitis Ulcerosa (z.B. IL-10⁹¹). Andere, wie z.B. IL-23⁹⁷, IL-12B^{98,99} und STAT3^{79,98}, sind bei beiden Krankheiten zu finden.

1.7 Pathogene und CED

Neben der Rolle der Darmflora wird über die Bedeutung verschiedener Pathogene im Krankheitsgeschehen der CED diskutiert. Die Suche nach einem einzelnen Krankheitserreger als Ursache verlief bisher nicht erfolgreich. Kein Pathogen konnte bei jedem Morbus Crohn-respektive Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden und auch eine antibiotische Therapie führte nicht zur Heilung.^{100,101} Hinzu kommt, dass eine Übertragbarkeit chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nicht belegt ist. Dahingegen konnten Garcia Rodriguez¹⁰² sowie Porter und Mitarbeiter¹⁰³ zeigen, dass nach durchgemachter Gastroenteritis ein erhöhtes Risiko besteht, an

einer CED zu erkranken. Dabei kommt es nicht auf ein spezielles Pathogen an, sondern auf die akute Darmentzündung an sich. Die Pathomechanismen sind hierbei nicht vollständig geklärt. Möglich ist jedoch, dass die akute Gastroenteritis einen Epithelschaden bewirkt, der zu einer erhöhten Translokation luminaler Antigene führt.¹⁰⁴ In genetisch empfindlichen Individuen kann dies der Anfang für eine Entzündungsreaktion sein, die trotz Eliminierung des Pathogens nicht wieder herunterreguliert wird. Erste Erkenntnisse, die diese Theorie unterstützen, lieferten Kalischuk und Mitarbeiter¹⁰⁵ die zeigten, dass *Campylobacter jejuni* zur Translokation kommensaler Bakterien wie *E. coli* über einen lipid raft-abhängigen, transzellulären Weg führt. Die Frage, ob Pathogene einen Schub einer CED initiieren können, ist ebenfalls ungeklärt. Infektionen mit *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, Salmonellen und anderen Durchfallerregern konnten zu einem gewissen Prozentsatz bei CED-Patienten im Schub nachgewiesen werden.¹⁰⁴ Dabei war es jedoch nicht möglich zu unterscheiden, ob Symptome, die durch eine Darminfektion hervorgerufen werden, auf diese beschränkt sind oder ob das Pathogen einen Entzündungsprozess in Gang setzt, der nach dessen Elimination weiterbesteht und die Symptome des Schubes hervorruft.¹⁰⁶

1.8 Die *Campylobacter jejuni* -Infektion

Eine *Campylobacter*-Infektion zeigt sich als akute Gastroenteritis, die mit Bauchschmerzen, Fieber und schleimig-blutigem oder wässrigem Durchfall einhergeht. Die Infektionsdosis liegt bei nur 500-800 Bakterien.¹⁰⁷ Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Tage. Die Erkrankung hält meist eine Woche an und ist selbstlimitierend.¹⁰⁸ Die Therapie kann im Normalfall auf eine Elektrolyt- und Flüssigkeitssubstitution beschränkt werden. Bei anhaltendem Fieber oder Diarrhoe, immunsupprimierten Patienten und Rezidiven sollte eine antimikrobielle Behandlung mit Makroliden durchgeführt werden.¹⁰⁹

Die Pathologie betrifft hauptsächlich das Colon.¹¹⁰ In der Lamina propria zeigen sich entzündliche Infiltrate von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie mononukleären Zellen. Die Darmschleimhaut degeneriert und atrophiert und es kann zu Kryptenabszessen und Ulzerationen kommen.^{111,112} Die Schwere der Erkrankung ist von der Virulenz des jeweiligen *Campylobacter*-Stammes sowie dem Immunstatus des Patienten abhängig.¹¹³

Als Folge der Gastroenteritis treten in seltenen Fällen Autoimmunerkrankungen, wie das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), auf. Dabei handelt es sich um eine akute, demyelinisierende Polyneuropathie, die zu Lähmungen führt. Sie tritt in ungefähr 1 von 1000 Fällen nach *Campylobacteriose* auf.¹¹⁴ Lipooligosaccharide (LOS) in der äußeren Membran von *C. jejuni* scheinen für die Entstehung dieser Autoimmunerkrankungen verantwortlich zu sein. Einige LOS

ähneln in ihrer Struktur den Gangliosiden des Menschen, die in den Axonen der Nerven lokalisiert sind. Dieses molekulare Mimikry führt zu einer Immunreaktion, die sich gegen die Myelinschicht der Axone richtet.¹¹⁵ In der Folge kommt es zu einer verlangsamten bzw. blockierten Impulsweiterleitung, was die typischen Symptome wie periphere und kraniale Parese, Parestesie, Ataxie und autonome Dysfunktion hervorruft. Bei einer Variante des GBS, dem Miller-Fisher-Syndrom, stehen Ataxie, Ophthalmoplegie und Areflexie im Vordergrund. Die Patienten erkranken 1-3 Wochen nach der Infektion. Zunächst kommt es zu einer ca. zweiwöchigen Verschlechterung der Symptomatik, einer anschließenden wenige Tage dauernden stabilen Phase und schließlich zu einer meist über Monate dauernden Verbesserung des Zustandes. Ungefähr 50% der Erkrankten genesen innerhalb eines Jahres ohne Defizite. Jeder zehnte Patient erleidet persistierende neurologische Ausfälle. Die Mortalität liegt bei etwa 5%.¹¹⁶ Eine weitere Folgeerkrankung ist die reaktive Arthritis, die nach weniger als 1% der Infektionen auftritt.¹¹⁷ Nach einer Latenzzeit von 2-6 Wochen kommt es zu Gelenksbeschwerden, die vor allem die unteren Extremitäten betreffen. Gehen diese mit einer Urethritis, Konjunktivitis bzw. Iritis und Reiter-Dermatose einher, handelt es sich um das Vollbild der Erkrankung, das Reiter-Syndrom. Die Prognose ist gut: In 80% der Fälle kommt es innerhalb von 12 Monaten zur Genesung.¹¹⁸

Um eine Entzündungsreaktion im Darm des Menschen hervorzurufen, muss sich *C. jejuni* mit dem mukosalen Immunsystem auseinandersetzen. Aufgrund der Beweglichkeit, der spiralförmig gekrümmten Form und der Möglichkeit, Mucinbindungen zu reduzieren, kann das Bakterium die Schleimschicht durchdringen.¹¹⁹ *C. jejuni* ist in der Lage, in Darmepithelzellen einzudringen.¹¹⁰ Infizierte Epithelzellen sezernieren IL-8¹²⁰, das dendritische Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten anlockt. *Campylobacter* aktiviert sowohl TLR2 als auch TLR4.^{114,122} In Abhängigkeit von TLR2 kommt es in kultivierten Epithelzellen, Monozyten und dendritischen Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-6, IL-1 β , IL-8 und TNF α .^{121,123} Für einige *C. jejuni*-Stämme wurde gezeigt, dass infizierte dendritische Zellen IL-12p70, IL-6 und TNF α sezernieren. Bei gemeinsamer Inkubation von dendritischen Zellen und CD4⁺ T-Zellen kam es zu einer erhöhten IFN γ -Produktion, was auf eine Th1-Antwort schließen lässt.^{123,124}

Erkenntnisse zur Pathogenese und Immunantwort gegenüber *C. jejuni* sind nicht einfach zu gewinnen, da es an Mausmodellen, die einer menschlichen Infektion ähneln, mangelt. Mäuse können mit *C. jejuni* kolonisiert werden, es kommt jedoch nicht zu einer Gastroenteritis.¹²⁵ Junge Mäuse erkranken durch die Infektion¹²⁶, aber ihr Immunsystem ist noch nicht abschließend ausgebildet, weswegen die Verwendung dieser Tiere nicht als optimal angesehen werden kann. Auch bei Tieren, die große Defekte im angeborenen und/oder erworbenen Immunsystem

aufweisen konnte eine Gastroenteritis hervorgerufen werden¹²⁷, jedoch eignen sich auch diese Tiere wegen des Immundefekts nur eingeschränkt zur Analyse der Immunantwort gegenüber *C. jejuni*. MyD88^{-/-128} und NF-κB^{-/-129} Mäuse erkranken an Gastroenteritis, weisen jedoch noch relativ schwere Immundefekte auf. Dahingegen stellt das IL10^{-/-}-Colitis-Modell zur Untersuchung der Immunpathologie der *C. jejuni*-Infektion ein *in vivo* Modell dar, das, verglichen mit den anderen zur Verfügung stehenden Modellen, nur geringe Einschränkungen des Immunsystems aufweist.¹³⁰

Um Defekte des Immunsystems in den Versuchstieren komplett zu vermeiden, wurden in weiteren Studien Mäuse verwendet, deren Diversität der Darmflora limitiert war. Auch dies führte zur Entwicklung einer Colitis.¹³¹

1.9 Ziele dieser Arbeit

Es ist Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, welche Bedeutung TLR2 und TLR4 -den Rezeptoren für Gram-positive bzw. Gram-negative Bakterien- im Rahmen von Entzündungsreaktionen im Colon zukommt. Dafür wurde die Colitis in IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu IL-10^{-/-} Mäusen ohne Defekte im TLR-System (im genetischen C57BL/10-ScSn-Wildtyp-Hintergrund) untersucht. Der Verlauf der Colitis wurde klinisch, immunologisch und mikrobiologisch analysiert.

Gastrointestinale Erreger spielen in der Pathogenese und der Initiierung eines Schubes bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine noch nicht vollständig geklärte Rolle (siehe 1.8). Deshalb wurde in dieser Arbeit weiterhin untersucht, ob und wie die Infektion mit *C. jejuni* die Colitis in IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen beeinflusst und u. U. zu einer verstärkten Entzündung führt.

Welche Immunantwort *C. jejuni* im Wirt hervorruft ist weitgehend unbekannt. IL-10^{-/-} Mäuse im C57BL/6-Hintergrund können von *C. jejuni* besiedelt werden. Ob dies auch bei IL-10^{-/-} Mäusen im C57BL/10-Hintergrund möglich ist und welche Rolle TLR2 und TLR4 bei der durch *C. jejuni* induzierten Enteritis spielen, war Ziel weiterer Analysen.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Substanz	Hersteller/ Zusammensetzung
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Inst. f. Mikrobiologie
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
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
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lugols Lösung	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim
N-(1-naphthyl)ethylendiamine	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Percoll	GE Healthcare, Uppsala
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
Wasserstoffperoxid	Biochrom AG, Berlin

2.2 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 TM III Platinum ^R One-Step Quantitative-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Oligonukleotidprimer und –sonden

Tabelle 3: Oligonukleotidprimer

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Orientierung
HPRT ex7,8 F	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	sense
HPRT as	CACAggACTAgAACACCTgC	antisense
mu IFN γ se	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA	sense
mu IFN γ 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	AggAAggAgCAgTTCTTCg	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	gggCCAgCTCATTCCTCCCAC	antisense
TLR2 WT	ACgAgCAAgATCAACAggAgA	antisense
TLR4 Cr sense	gCAAgTTTCTATATgCATTCTC	sense
TLR4 Cr antisense	CCTCCATTTCCAATAggTAg	antisense
TLR4 Ex sense	CgTCggTCAgCAAACgCCTTCTTC	sense
TLR4 Ex antisense	CAAggCAggCTAgCAggAAAgggTg	antisense
TNF α ex 3,4 F	CTgTAgCCCACgTCgTAgCA	sense
TNF α R	CggCgAgAggAggTTgACT	antisense

Tabelle 4: Oligonukleotidsonden

Sonde	Sequenz 5' - 3'
HPRT FL-Sonde	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA
HPRT LC-Sonde	TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg
IFN γ FL-Sonde	CATCAgCAACAACATAAagCgTCA
IFN γ 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	TgACCCACAAggACTCAAaggACAA
Muc2 FL-Sonde	AgCACCTgCTCTATCTACgggAgTg
Muc2 LC-Sonde	CCACTACATCACCTTCgACgggAA
TNF α FL-Sonde	CCCgACTACgTgCTCCTCACCCA
TNF α LC-Sonde	CCgTCAgCCgATTTgCTATCTCATACC

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

2.4 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 (0,5µg/µl)	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

2.5 Antikörper

2.5.1 Durchflusszytometrie-Antikörper

Tabelle 6: Durchflusszytometrie-Antikörper

Antikörper	Hersteller
CD4 <i>APC</i> Ratte anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD69 FITC Hamster anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD8α PE/ <i>APC</i> Ratte-anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
B220 PE anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
TCRγδ FITC anti-Maus	Pharmingen, Franklin Lakes, USA
NK1.1 FITC anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD11c <i>APC</i> Hamster anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD11b FITC anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Gr1 <i>APC</i> anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Isotyp <i>APC</i> Maus IgG2a	Invitrogen, Karlsruhe
Isotyp FITC Ratte IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp PE Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg

2.5.2 Immunhistochemie-Antikörper

Tabelle 7: Immunhistochemie-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 (Forkhead box P3)	1:100	ebioscience, San Diego
Ki67	1:100	DAKO, Hamburg
MPO7	1:400	DAKO, Hamburg

2.6 Nährmedien und Seren

Tabelle 8: 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

2.7 Geräte und Plastikwaren

Tabelle 9: 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 Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
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
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multisteppipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
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

2.8 Sonstiges

Tabelle 10: Sonstiges

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

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} Mäuse im C57BL/10-ScS-Hintergrund wurden von Prof. Marina Freudenberg vom Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg, zur Verfügung gestellt. Die TLR4-Defizienz ist durch eine spontane Deletion des TLR4-Gens bedingt.¹³² Das TLR2-Gen wurde durch gezielte Einrekombination einer Resistenzgenkassette inaktiviert und die Tiere auf einen C57BL/10-ScSn-Hintergrund gekreuzt.^{133,134}

Die IL-10^{-/-} Mäuse im 129/SvJ-Hintergrund wurden von Prof. Dirk Haller und Prof. R. Balfour Sartor, University of Carolina, zur Verfügung gestellt.

IL-10^{-/-} Mäuse wurden mit TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} Mäusen gekreuzt, um IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im 129/SvJ//C57BL/10-ScSn-Hintergrund zu erhalten. Da die Ausprägung der IL-10^{-/-}-Colitis stark vom genetischen Hintergrund der Maus abhängt¹³⁵, wurden als Kontrolltiere Kreuzungen aus C57BL/10-Wildtypen und IL-10^{-/-} Mäusen im 129/SvJ-Hintergrund verwendet. Die Versuchstiere wurden ab der 4. Generation in die Experimente aufgenommen. Die Gendefekte jeder Maus wurden durch Genotypisierung mittels PCR überprüft.

Die Tiere wurden unter Spezifisch Pathogenfreien (SPF)-Bedingungen in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin gehalten. Der Zugang zu sterilem Futter und Wasser war uneingeschränkt. Die Experimente wurden gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsvorhaben G0173/07 vom 15.11.2007, Tötungsantrag 114/05 vom 27.4.2005).

3.2 Klinischer Score

Die klinische Beurteilung erfolgte im Alter von 4-6 Monaten. Die Symptomatik infizierter Tiere wurde an den Tagen 3 und 5 post infectionem (p.i.) erneut bewertet. Für die Erfassung des Zustandes wurde ein standardisierter, modifizierter Score für die akute DSS-Colitis verwendet. Der Score unterteilte sich in die drei Hauptkategorien klinischer Aspekt, Stuhlkonsistenz und Blut per rectum. Hinsichtlich des klinischen Aspekts wurden für ein unbeeinträchtigt Erscheinungsbild 0 Punkte vergeben, für struppiges Fell 1 Punkt, für struppiges Fell und gekrümmte Haltung 2 Punkte, 3 Punkte für die vorgenannten sowie Isolationsverhalten und 4 Punkte bei präfinalem Erscheinungsbild bzw. Tod. Für die Stuhlkonsistenz wurden bei geformtem, harten Faeces 0 Punkte vergeben, bei breiigem, weichen Faeces 2 Punkte und bei

flüssigem, am Anus klebenden Faeces 4 Punkte. Ob die Tiere Blut im Stuhl absetzten wurde durch einen Haemocult-Test überprüft. Für die Analyse mit dem modifizierten Guajak-Test nach Greegor wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück Faeces auf die Fläche des Haemocult-Testfelds gegeben und die Rückseite mit der Entwicklungsflüssigkeit beträufelt. Eine Minute später wurde die Beurteilung vorgenommen. Ergab sich kein Farbumschlag wurden 0 Punkte vergeben, 2 Punkte bei Farbumschlag und 4 Punkte bei makroskopisch sichtbarem Blut sowie einem Rektumprolaps.

Die Punkte der drei Hauptkategorien wurden addiert, sodass sich maximal ein Score von 12 ergab.

3.3 Tötung der Tiere und Organentnahme

Infizierte Mäuse wurden an Tag 5 p.i., naive Mäuse in einem zu den infizierten Tieren korrelierenden Alter durch CO₂-Inhalation getötet. Nach einer Ganzkörperdesinfektion durch Eintauchen der Mäuse in 70% Isopropanol wurden Brust- und Bauchfell eröffnet und Vollblut mittels Herzpunktion gewonnen. Danach wurde die Bauchhöhle freigelegt und die Organe hinsichtlich pathologischer Veränderungen, wie z.B. Vergrößerung und Einblutung, beurteilt. Milz, Leber, Niere, mesenteriale Lymphknoten (MLN) und der Darm wurden entnommen. Der Darm wurde der Länge nach ausgebreitet und vermessen. Ein ca. 1 cm langes Stück Inhalt wurde aus dem Colon entnommen, in ein mit 1,5 ml sterilem PBS gefülltes Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Der Darmabschnitt, aus dem der Inhalt entnommen worden war, wurde aufgeschnitten und der pH-Wert durch einen Streifentest bestimmt. Anschließend wurde das Darmstück gespült und in PBS auf Eis gelagert. Ein weiteres ca. 0,5 cm langes Stück Colon wurde aufgeschnitten, in PBS gespült und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die restlichen Darmabschnitte wurden in Histologiekassetten gebettet und in 4% Formaldehyd gelagert.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Herstellung histologischer Präparate

Die entnommenen Darmabschnitte wurden in Einbettkassetten 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 und die Einbettung in Paraffin. Die Paraffinblöckchen wurden mithilfe eines Mikrotoms 4-5 µm dick geschnitten, auf einen Objektträger überführt und über Nacht bei 60°C getrocknet.

3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histopathologische Beurteilung wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dazu wurden die Präparate 2 x 5 Minuten in Xylol entparaffinisiert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100%iges Isopropanol, 96%iges, 80%iges und 70%iges Ethanol) rehydriert. Nach Waschen in Aqua dest. erfolgte die drei Minuten dauernde Färbung mit Hämatoxylin. Das Präparat wurde wieder gewaschen, in 1%ige Salzsäure (HCl) getaucht, erneut gewaschen und anschließend über fünf Minuten in Leitungswasser gespült. Es folgte ein weiterer kurzer Waschvorgang in Aqua dest. und die 30-60 Sekunden dauernde Färbung mit Eosin. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend mit Xylol behandelt. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt und so haltbar gemacht.

3.4.3 Auswertung der histologischen Präparate

Die HE-gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop unter 100- bis 400facher Vergrößerung anhand des OVA-Colitis-Scores beurteilt (Tabelle 11).

Tabelle 11: OVA-Score

Punktwert	Morphologisches Merkmal
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 vereinzelt 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 nicht in ganzen Zahlenwerten, sondern in 0,25er Schritte unterteilt vergeben. Insgesamt war die jeweils schwerste Läsion ausschlaggebend. Die Bewertung erfolgte durch drei Gutachter unabhängig voneinander. Der Mittelwert der drei Bewertungen wurde verwendet.

3.4.4 Herstellung und Beurteilung immunhistochemischer Schnitte

Durch die Immunhistochemie werden mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion Moleküle detektiert und *in situ* sichtbar gemacht. Nach Anfertigung der Schnitte wie unter 3.4.1 (Herstellung histologischer Präparate) 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, B220 oder Myeloperoxidase 7 (MPO7) inkubiert. Die Präparate für die Forkhead box P3 (Foxp3)-Färbung wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidase zunächst mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 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 benutzt. Als tertiärer Enzym-tragender Komplex wurde mit Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase verwendet bzw. im Falle von Foxp3 die Envision Peroxidase Anti-Kaninchen. Die Peroxidase wurde mittels Diaminobenzidin bzw. mit Fast Red als Chromogen detektiert und visualisiert.

Die durchschnittliche Anzahl der Immunzellen wurde durch sechsmaliges Zählen der positiven Zellen in verschiedenen Colonabschnitten in 400facher Vergrößerung und Mittelwertbildung bestimmt. Die immunhistochemischen Färbungen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Bestimmung bakterieller Translokationsraten in Blut, MLN, Milz, Leber und Niere

Um die bakterielle Translokationsrate kulturell zu bestimmen wurde das jeweilige Organ in Thioglukonat-Bouillon überführt und bei 37°C inkubiert. Auch einige Tropfen durch Herzpunktion gewonnenes Vollblut wurden in die Nährlösung überführt. Für die Bestimmung wurden die gesamten MLN, die ganze Milz und eine Niere verwendet. Von der Leber wurde ein 1 x 1 x 0,5 cm großes Stück abgeschnitten und in die Nährlösung überführt. Die Bouillons wurden eine Woche bebrütet und dann auf zwei Columbia- sowie einer halben CNA-Platte fraktioniert ausgestrichen. Dazu wurde ein 3-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Die Bebrütung einer Columbia- sowie der CNA-Platte erfolgte aerob bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil über 48 Stunden. Begutachtungen wurden nach 24 und 48 Stunden vorgenommen. Die zweite Columbia-Platte wurde anaerob bei 37°C ebenfalls über 48 Stunden bebrütet. Die anaerobe Atmosphäre wurde mittels eines AnaeroGen-Systems erzeugt und mithilfe von AnaeroTest Indikatorstreifen überprüft. Anaerob bebrütete Agares wurden nach 48 Stunden begutachtet. Die Nährlösungen der infizierten Tiere wurden zusätzlich auf einer halben Karmali-Platte ausgestrichen, die unter mikroaerophilen Bedingungen (CampyGen) bei 37°C 48 Stunden bebrütet wurde.

Kam es zu einem Eintrüben der Bouillons, wurden diese direkt nach dem Eintrüben mit einem erweiterten Plattensatz ausgestrichen. Es wurde zusätzlich zu den schon erwähnten Nährböden

auf je einem halben MacConkey-, MRS- und KV-Agar fraktioniert ausgestrichen. MRS- und KV-Platten wurden unter den gleichen Bedingungen wie die anaerobe Columbia-Platte bebrütet. Die Bebrütung der MacConkey-Platten erfolgte bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen über 48 Stunden.

Bei der Begutachtung wurden die unterschiedlichen Koloniemorphologien dokumentiert. Fragliche Koloniemorphen wurden auf Universal- und Selektivnährböden isoliert und weitere 24 Stunden bebrütet. Zusätzlich wurden Nativ- und Gramfärbungen sowie mikrobiologische Differenzierungstests durchgeführt (3.5.2). Die Identifizierung der Isolate erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. Markus M. Heimesaat, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité Universitätsmedizin Berlin.

3.5.2 Mikrobiologische Differenzierung

Die Differenzierung der Bakteriengattungen erfolgte mittels Anzucht auf Selektivplatten (3.5.1), Gramfärbung sowie Oxidase- und Katalasetest.

Zur Durchführung des Katalasetests wird eine Koloniebildende Einheit (KBE) vom Agar abgenommen und mit einem Tropfen 10%igem Wasserstoffperoxid gemischt. Bei katalasepositiven Bakterien kommt es zur Blasenbildung. Das Enzym Katalase setzt dabei Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um, der die Blasenbildung verursacht. Bei den katalasepositiven Bakterien handelt es sich um Staphylokokken, die durch den Katalasetest gegen andere grampositive Kokken, wie beispielsweise Enterokokken und Streptokokken abgegrenzt werden können.

Um den Oxidasetest durchzuführen wird eine KBE auf einen Oxidase-Teststreifen überführt. Bei blauvioletter Farbumschlag gilt der Test als positiv. Das Prinzip des Tests beruht auf der Oxidation von Cytochromen der Bakterien. U.a. sind Pseudomonaden Oxidase-positiv und können so von Enterobacteriaceae unterschieden werden.

Für die Gramfärbung wurde eine KBE der zu untersuchenden Koloniemorphologie unter Verwendung sterilen Materials auf einen Objektträger überführt und mit einem Tropfen 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung vermischt. Das Präparat trocknete an der Luft und wurde für 2 Minuten mit Methanol fixiert. Die Gramfärbung erfolgte nach dem in Tabelle 12 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 12: Arbeitsprotokoll Gramfärbung

Arbeitsschritt	Dauer
Gram's crystal violet solution	2 Minuten
Spülen mit Aqua dest.	Kurz
Lugol'sche Lösung	2 Minuten
Spülen mit Aqua dest.	Kurz
Ethanol 96%	10-15 Sekunden
Spülen mit Aqua dest.	Kurz
Gram's safranin solution	1 Minute
Spülen mit Aqua dest.	kurz

Anschließend trocknete das Präparat an der Luft und wurde bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion mikroskopiert. Beurteilt wurden dabei das Färbeverhalten (grampositiv/gramnegativ) und die Bakterienform (Kokken/ Stäbchen).

3.5.3 *Campylobacter jejuni* ATCC 43431: Anzucht und Herstellung der Infektionssuspension

Bei *Campylobacter jejuni* ATCC 43431 handelte es sich um ein Patientenisolat, das von Prof. Dr. Steffen Backert, Universität Magdeburg, zur Verfügung gestellt wurde. Das Bakterium wurde in einer Cryo-Bank bei -80°C gelagert. Zur Anzucht wurden 100 µl sowie einige Kunststoffkügelchen aus der Cryo-Bank auf einen Karmali-Agar gegeben und unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C über 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien von je 2 bewachsenen Platten mit einem sterilen Tupfer von der Platte abgenommen und in 1,5 ml steriles PBS eingerührt. Jeweils 100 µl der Suspension wurden auf 14 Karmali-Agares ausplattiert und 24 Stunden unter den gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Die Kolonien zweier Platten wurden in 1 ml steriles PBS eingerührt. Es wurden nur Agares mit $>10^6$ KBE Wachstum/ Agar verwendet. Ein Tier wurde mit 0,3 ml der *Campylobacter*- Suspension infiziert. Um die Menge der gegebenen KBE/ ml Suspension bestimmen zu können wurde eine Verdünnungsreihe der Infektionssuspension angefertigt. 100 µl der Ausgangssuspension wurden in 10 ml steriles NaCl 0,9% gegeben und durchmischt, um eine 1:100 Verdünnung zu erhalten. Für die nächste Verdünnungsstufe (1:10000) wurden 100 µl aus der ersten Verdünnung entnommen und wiederum in 10 ml steriles NaCl 0,9% gegeben und durchmischt. Aus diesem

wurden erneut 100 µl entnommen und in 10 ml steriles NaCl 0,9% gegeben, woraus eine 1:1000000 Verdünnung entstand. Jeweils 100 µl der ersten beiden Verdünnungsstufen wurden auf Columbia-Agar ausplattiert, jeweils 100 µl der letzten beiden Verdünnungsstufen wurden auf Karmali-Agar aufgetragen. 100 µl der Original-Suspension wurden unverdünnt auf einem CNA-Agar ausplattiert, um grampositive aerobe Kontaminationen aufdecken zu können.

Der CNA-Agar wurde 24 Stunden bei 37°C und normaler Atmosphäre bebrütet. Alle anderen Nährböden wurden unter mikroaerophilen Bedingungen über 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung der Koloniebildenden Einheiten wurde wie unter 3.5.4 beschrieben vorgenommen.

3.5.4 *C. jejuni*- Quantifizierung im Colon

Die Menge lebender *C. jejuni* wurde aus dem Coloninhalt der Mäuse bestimmt. Dazu wurde der Coloninhalt während der Sektion in mit 1,5 ml sterilem PBS gefüllte Eppendorf-Röhrchen gegeben. Diese wurden vor und nach der Sektion gewogen, um das Faecesgewicht bestimmen zu können. Der Faeces wurde mithilfe eines sterilen Tupfers mit dem PBS homogenisiert. Um die Quantifizierung zu optimieren wurde eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Dafür wurden 100 µl des Faeces-Homogenats mit 10 ml sterilem NaCl 0,9% vermischt. 100 µl der Ausgangslösung bzw. der Verdünnung wurden auf Karmali-Selektivplatten aufgetragen und unter Ausnutzung des gesamten Agars ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über 48 Stunden unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C. Anschließend wurden die KBE nach folgendem Prinzip bestimmt:

Tabelle 13: Quantifizierung Koloniebildender Einheiten

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

Um die Quantifizierung zu präzisieren wurden weitere Abstufungen vorgenommen: Beispielsweise wurden bei 25 KBE 10²⁻⁽³⁾ notiert, bei 50 KBE 10²⁻³ und bei 75 KBE 10⁽²⁾⁻³. Die ermittelten KBE wurden auf das Faecesgewicht bezogen.

3.5.5 *Escherichia coli*-Quantifizierung im Colon

Die Menge lebender *E.coli* wurde aus dem Coloninhalt der Mäuse bestimmt. Dazu wurde der Coloninhalt wie unter 3.5.4 beschrieben entnommen und verdünnt. 100 µl der Ausgangslösung bzw. der Verdünnung wurden auf je einen Columbia- und MacConkey-Agar aufgetragen und ausplattiert. Der Columbia-Universalagar wurde mitgeführt, um eine mögliche übermäßige Hemmung des Wachstums durch den Selektivagar aufzudecken. Die Bebrütung der beiden Agares erfolgte über 18 Stunden unter normalen atmosphärischen Bedingungen bei 37°C. Anschließend wurden die KBE wie unter 3.5.4 beschrieben quantifiziert. Die Identifizierung der Kolonien als *E.coli* erfolgte anhand der Koloniemorphologie, des Geruchs und des Farbindikators im MacConkey-Agar (Umschlag zu Pink bei Laktose-positiven Keimen).

3.6 Zytokin- und Proteinmessungen

3.6.1 Organkultur Colon

Für die Zytokinmessungen wurde ein 1 cm langes Stück Colon aufgeschnitten, zur Entfernung des Inhalts in PBS gespült und bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Nach Überführen in RPMI/ 0,01% Pen/Strep wurde das Colonstück über 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Colonstück wurde gewogen, der Überstand entnommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Colon-Organkulturüberstände wurden mithilfe der nachfolgenden Methoden (3.6.2- 3.6.5) untersucht.

3.6.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, IL-12p70, IFN γ , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und TNF α wurde mit dem CBA Mouse Inflammation Kit von BD laut Protokoll vorgenommen. Im Kit sind 6 verschiedene Gruppen von „Kügelchen“ (Beads) mit Antikörpern versehen, die jeweils gegen eines der vorgenannten Zytokine gerichtet sind. Die Beads, Proben und detektierende Antikörper, die mit Phycoerythrin (PE) konjugiert sind, wurden gemeinsam inkubiert und formten Sandwich-Komplexe. Diese wurden mit dem FACS-Canto durchflusszytometrisch erfasst. Zur Unterscheidung der verschiedenen Beads diente eine für die jeweilige Gruppe spezifische Fluoreszenz-Intensität.

3.6.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-22 wurde das Quantikine Mouse/Rat IL-22 Kit von R&D Systems laut Protokoll verwendet. Eine Mikrotiterplatte wurde mit polyklonalem Maus/Ratte anti-IL-22-Antikörpern versehen. Standard, Kontrolle und Proben wurden in die Vertiefungen pipettiert und vorhandenes IL-22 vom Antikörper gebunden. Ein mit einem Enzym verbundener

Antikörper gegen IL-22 wurde zugegeben. Ein Substrat wurde hinzugefügt und vom gebundenen Enzym umgesetzt. Die Menge von IL-22 wurde über die Farbintensität des umgesetzten Substrates anhand einer Standardkurve bestimmt.

3.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

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

3.6.5 Bestimmung der Konzentration von Stickstoffmonoxid

Die Bestimmung der Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) wurde mithilfe der Griess-Reaktion durchgeführt. Da NO aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit eine geringe Halbwertszeit besitzt, wird der Nachweis über das Stoffwechselprodukt Nitrit vorgenommen. Für die Bestimmung wurden 3 g Sulfanilamid in 18 ml Phosphorsäure gegeben und mit 300 ml Aqua dest. gemischt. Dazu wurden 300 mg N-(1-naphtyl)ethylenendiamin gelöst in 300 ml Aqua dest. gegeben. 50 µl dieser Griess-Reagenz wurden zu 50 µl Colon-Organkulturüberstand in eine Mikrotiterplatte gegeben. Das N-(1-naphtyl)ethylenendiamin reagierte mit dem im Organkulturüberstand vorhandenen Nitrit und bildete einen Azofarbstoff, dessen Absorption bei 550 nm bestimmt wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer von Natriumnitrit ausgehenden Standardkurve.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 RNA-Extraktion aus Colongewebe

Die RNA-Extraktion wurde mit dem peqGold Total RNA Kit laut Protokoll vorgenommen. Dafür wurden Colonstücke, die während der Sektion in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert wurden, verwendet. Für die RNA-Isolierung wurden die Colonstücke mithilfe von Bashing Beads von Zymo Research zerkleinert und homogenisiert. Rnasen wurden inaktiviert. Das Lysat wurde über eine DNA-Säule laufen gelassen, die genomische DNA bindete. Die Probe lief über eine weitere Säule, in der die RNA an die Säulen-Membran bindet. Nach einigen Waschschritten zur Entfernung von Kontaminanten wurde die RNA in 40 µl Rnase-freiem Aqua bidest. eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.2 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) für die mRNA-Bestimmung

Die aus dem Colon gewonnene RNA wurde mit dem SuperScript™ III Platinum^R One-Step Quantitative-PCR System laut Protokoll in cDNA umgeschrieben und im LightCycler analysiert. Dafür wurden 1 µl RNA-Template mit 5 µl 2fachem Puffer, je 0,5 µl BSA, Primermix, Sonde FI und Sonde LC sowie 0,25 µl MgCl₂, 0,4 µl Enzymmix und 1,35 µl Aqua dest. in einer Glaskapillare vermenget und im LightCycler analysiert. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Die RT-PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen der RT-PCR

	HPRT	TNF α	IFN γ	IL-18	Muc2	IL-23	IL-6	IL-22
Reverse	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
Transkription	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	55°C	55°C
Initiale	2 min.	2 min.	2 min.	2 min.	2 min.	2 min.	2 min.	2 min.
Denaturierung	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Denaturierung	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.	5 Sek.
	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Bindung der	7 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.	7 sek.	7 sek.	8 sek.
Oligonukleotide	58°C	59°C	60°C	57°C	55°C	58°C	59°C	58°C
Strangverlänge-	10 sek.	9 sek.	7 sek.	9 sek.	7 sek.	5 sek.	10 sek.	5 sek.
rung	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 Detektion der Fluoreszenz erfolgte am Ende jedes 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 seziierten 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. Der Crossing-Point wurde durch die Software RelQuant bestimmt.

3.7.3 DNA-Extraktion aus Mausgewebe

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen laut Protokoll. Dabei wurden die Schwanzspitzen der Mäuse mithilfe von Proteinase K lysiert und die freigesetzte

DNA an die QIAmp Membran gebunden. Nach zweimaligem Waschen wurde die DNA in 50 µl Aqua dest. eluiert und für die PCR verwendet.

3.7.4 Genotypisierung der Mäuse

Um die IL-10-, TLR2- und TLR4-Defizienz der Mäuse zu überprüfen, wurde die aus den Schwanzspitzen extrahierte DNA (3.7.3) mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Es wurden sowohl die Mutation als auch die Wildtypvariante überprüft, um eine Heterozygotie auszuschließen.

Zur Überprüfung der IL10-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 Gen-Fragment zu amplifizieren. 1µl der Template-DNA wurden mit 0,25 µl jedes Primers, 2,5 µl MgCl₂, 0,25 µl BSA, 0,5 µl Nukleotiden, 0,25 µl Taq-Polymerase, 2,5 µl 10fach TBE-Puffer und 17,5 µl Aqua dest. gemischt. Die Konditionen der IL-10-PCR erfolgten wie in Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 15: PCR-Konditionen im Rahmen der Genotypisierung

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

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

Für die Durchführung der TLR4-PCR wurden die gleichen Mengen wie in der IL10-PCR im Reaktionsansatz 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.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges (IL-10), 2%iges (TLR2) oder 3%iges (TLR4) Agarosegel aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Aqua dest. Zur Herstellung des Gels wurden 100 ml 1x TBE-Puffer mit 1,5-3 g Agarose gemischt und zum Sieden gebracht. 1 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid wurde zugegeben, vermengt und die Flüssigkeit wurde in eine Form zum Aushärten 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 1x TBE-Puffer über 30 Minuten bei 130 Volt in einer Elektrophoresekammer. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid, das sich in die DNA einlagert, konnte die DNA unter UV-Licht als Bande sichtbar gemacht werden. Abschließend wurde ein Foto des Gels angefertigt.

3.8 Zellisolierung und Durchflusszytometrie

3.8.1 Isolierung von Immunzellen aus MLN und Milz

Zur Analyse der Immunzellpopulationen wurden Zellen aus den MLN und der Milz isoliert und mithilfe der Durchflusszytometrie charakterisiert. Nach der Entnahme wurden die Organe bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert um die Autolyse einzuschränken. Die Organe wurden in ein Zellsieb (70 µm) überführt, mit einem Spritzenstempel zerkleinert und mit 10 ml PBS/ 5% FKS/ 0,4% EDTA 2mM (Medium) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 350 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet der MLN-Isolierung wurde anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Für die Erythrozytenlyse wurde 1 ml Aqua dest. zum Pellet der Milz-Isolierung gegeben. Nach 45 Sekunden erfolgte die Zugabe von 1 ml 1,8%igem NaCl. Die Zellsuspension wurde erneut wie beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert.

3.8.2 Isolierung von Immunzellen aus der Leber

Die Leber wurde *in situ* über die Vena portae mit 2 ml PBS gespült. Um die Autolyse zu verzögern, wurde das Organ bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis aufbewahrt. Die Leber wurde in ein Zellsieb (70 µm) überführt, mittels einer Schere und eines Spritzenstempels durch das Zellsieb gepresst und mit 25 ml PBS/ 5% FKS/ 0,4% EDTA 2 mM (Medium) gespült. Es folgte

die einminütige Zentrifugation bei 50 g und 4°C. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Sediment verworfen. Diese Zentrifugation wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand 10 Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Je 2 Pellets wurden in 5 ml 40%igem Percoll resuspendiert und auf 8 ml 70%iges Percoll aufgetragen. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 800 g wurde die Interphase abgenommen und mit 10 ml Medium gemischt. Nach Zentrifugation über 10 Minuten bei 350 g und 4°C wurde das Pellet in 1 ml Aqua dest. resuspendiert (Erythrozytenlyse). Nach 45 Sekunden wurde die gleiche Menge 1,8%iges NaCl zugegeben. Die Zellsuspension wurde wie im Schritt zuvor zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert.

3.8.3 Isolierung der Intraepithelialen und Lamina propria-Lymphozyten

Das Colon wurde entnommen, aufgeschnitten und nach Entfernung des Inhalts in RPMI gespült. Es wurde in 1 cm lange Stücke geschnitten und in 20 ml Lösung gegeben, die 19,2 ml RPMI, 600 µl FKS, 200 µl EDTA 5mM, 50 µl Pen/Strep und 25 µl DTT enthielt. Unter Rühren wurden die Colonstücke 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb (100 µm) gegossen. Verbleibende Colonstücke wurden in RPMI/ 1% EDTA 5 mM überführt, geschüttelt und wieder durch das Zellsieb gegossen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das Medium enthielt damit die Intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und wurde bei 350 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je 2 Pellets wurden in 5 ml 40%igem Percoll resuspendiert und auf 8 ml 70%iges Percoll aufgetragen. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 800 g wurde die Interphase abgenommen und mit 10 ml PBS/ 5% FKS/ 0,4% EDTA 2 mM (Medium) gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 350 g und 4°C über 10 Minuten wurde das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung (Verdünnung 1:2) in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Isolierung der Lamina propria-Lymphozyten (LPL) wurden die nach dem Schüttelvorgang im Zellsieb verbleibenden Colonstücke in je 5ml RPMI/ Liberase (500 µg/ml)/ 0,005% DNase (50 µg/ml) gegeben und unter Rühren bei 37°C bis zur Zerkleinerung (ca. 45 Minuten) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm) gegossen und mit 15 ml RPMI/ 10% FKS gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 350 g und 4°C über 10 Minuten. Anschließend wurden je 2 Pellets in 5 ml 40%igem Percoll resuspendiert und auf 8 ml 70%iges Percoll aufgetragen. Die anschließende Durchführung ab diesem Schritt entsprach der der IEL-Isolierung.

3.8.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS) -Analyse der isolierten Zellen

Zur Detektion von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie wurde die 1 ml-Zellsuspension auf 4 Eppendorftubes aliquotiert. Eine geringe Menge der Suspension wurde von jeder Probe für die Kontrollen entnommen (Isotyp und Ungefärbt). Es folgten das Waschen der Zellen mit 1 ml PBS/ 5% FKS/ 0,4% EDTA 2 mM (Medium) und die Zentrifugation bei 350 g und 4°C über 10 Minuten. Für die Mastermixe wurden für jede Probe 100 µl Medium mit 2 verschiedenen Oberflächenantigenen in 1:200 Verdünnung und anti-Fcγ-Antikörper in 1:200 Verdünnung gemischt. Das Pellet wurde im Mastermix resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml Medium und Zentrifugation wie beschrieben. Das Pellet wurde je nach Größe in 250-600 µl Medium resuspendiert und mit dem FACS-Calibur gemessen. Entsprechende ungefärbte und Isotyp-Kontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit CellquestPro und FlowJo.

3.9 Software und Statistik

FACS-Analyse:	CellquestPro, BD Biosciences, Heidelberg FlowJo 8.8.6, Tree Star, Ashland, USA
Graphische Darstellungen:	GraphPad Prism 5.0a, GraphPad Software, LaJolla, USA
ELISA-Auswertung:	SERION Evaluate, Virion, Rüslikon, Schweiz
Fotoaufnahmen:	Easy Measure, Inteq, London, GB
Fotobearbeitung:	Gimp 2.6, Freeware, www.gimp.org
LightCycler Software	Relquant 1.0, Roche Molecular Biochemicals, Basel, Schweiz

In den Abbildungen sind durch horizontale Balken und je nach Angabe der Mittelwert bzw. Median dargestellt. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet. Für die statistische Auswertung der kulturellen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) lag. Signifikanzen, die unter $p < 0,005$ lagen wurden als $p < 0,005$ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 TLR2- und TLR4-Defizienz im IL-10^{-/-}-Colitis Modell der Maus

Um die Bedeutung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 im Rahmen der chronischen Colitis in der IL-10-defizienten Maus zu untersuchen, wurden IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im C57BL/10 Hintergrund untersucht. Neben einer klinischen Einschätzung wurden histologische und immunhistochemische Vergleiche sowie Zytokinmessungen, mRNA-Messungen und FACS-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurden die *E.coli*-Konzentrationen im Colon und die Translokationsrate von Darmbakterien in mesenteriale Lymphknoten, Leber, Milz, Niere und Blut bestimmt.

4.1.1 Klinische Beurteilung der naiven Mäuse

Um einen Eindruck vom klinischen Zustand der Tiere zu bekommen, wurden diese anhand der Kriterien äußerer Eindruck, Stuhlkonsistenz und Blut per Rectum (siehe 3.2 klinischer Score) beurteilt. Der Zustand der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse stellte sich besser dar als der der IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse (Abb. 2). Das Alter der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} betrug 5-6 Monate. IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse waren 4-5 Monate alt.

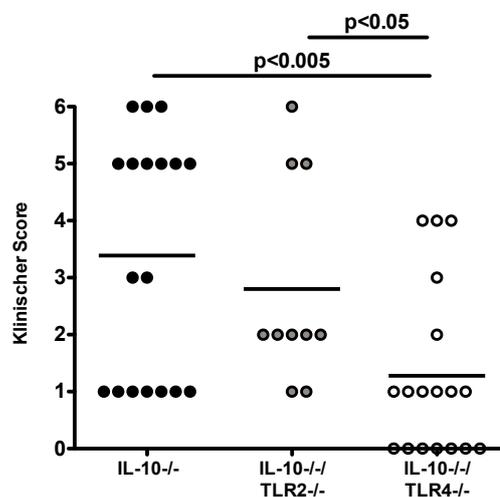


Abb. 2: Klinischer Score naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Mittelwerte und Signifikanzniveaus sind angegeben. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.2 Colonlänge und pH-Werte im Colon naiver Mäuse

Durch die Entzündung kommt es zu einer Verkürzung der Länge und einer Verminderung der Resorptionsfläche des Colons. Die Colonlänge stellt somit ein grobes Maß für die entzündliche Aktivität des Organs dar. Die IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen ein längeres Colon auf (Abb. 3 B). Dieses Ergebnis zeugt von einer höheren Krankheitsaktivität bei IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen. Im Rahmen der Colitis kann es zur Vermehrung pro-inflammatorisch wirkender Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, kommen.⁶⁶ Deren Stoffwechsellleistungen unterscheiden sich vom Stoffwechsel der ursprünglichen Flora. Dadurch kann sich der pH-Wert im Darmlumen verändern. Bei den untersuchten naiven IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen konnte jedoch kein Unterschied im pH-Wert des Colons festgestellt werden.

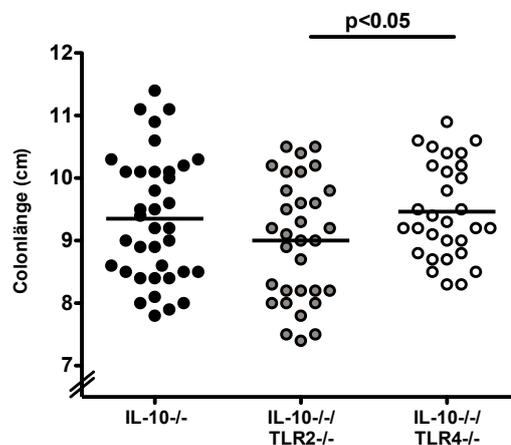


Abb. 3: Länge des Colons (cm) naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 7 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.3 Histopathologie des Colons der naiven Mäuse

Um die Schwere der Entzündung einschätzen zu können, wurden die HE-gefärbten Schnitte des Colons mithilfe des OVA-Colitis-Score (siehe 3.4.3) bewertet. Dabei zeigte sich bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tieren im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen eine stärker ausgeprägte Entzündung (Abb. 4). Gesunde Wildtyp-Mäuse, die unter den gleichen Bedingungen wie die IL-10-defizienten Tiere gehalten wurden, zeigten keine Pathologien. Die stärkere Entzündung im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse bestätigte die Erkenntnisse aus der Erfassung der Colonlängen. Die Entzündung war im Darm der untersuchten Tiere deutlich erkennbar. Es kam zur Einwanderung von Entzündungszellen in die Lamina propria (Abb. 5 A-D), die Submukosa (Abb. 5 C) zur Epithelhyperplasie (Abb. 5 A), zum Verlust von Becherzellen, zu Kryptenabszessen (Abb. 5 D) und Ulzerationen (Abb. 6).

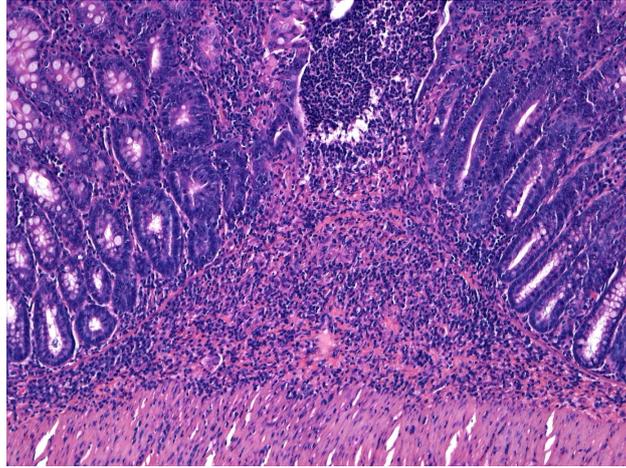


Abb. 6: Histopathologische Veränderungen im Colon einer naiven $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Maus. 100fache Vergrößerung, HE-Färbung des Colons, repräsentative Ausschnitte. Lymphozytäres Infiltrat in Mukosa und Submukosa, Ulzeration.

4.1.4 Immunhistochemische Analysen im Colon der naiven Mäuse

Mit der Immunhistochemie (IHC) können Antigene *in situ* sichtbar gemacht und es kann das Vorkommen bestimmter Immunzellpopulationen im Colon nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen des Colons wurden für die Marker Caspase3, Ki67, CD3, B220, Foxp3 und MPO7 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob bei den untersuchten Tieren tatsächlich eine Entzündung bestand, wurden naive Wildtyp-Mäuse als Kontrollen mitgeführt.

Apoptotische Zellen wurden mittels der Effektorprotease Caspase3 gefärbt. Im Colon der gesunden Wildtyp-Tiere wurden im Vergleich zu den Colitis-Tieren weniger apoptotische Zellen nachgewiesen. Die Anzahl der Caspase3⁺ Zellen im Colon der $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäuse war im Vergleich zu den $IL-10^{-/-}$ Mäusen signifikant reduziert (Abb. 7 A). Weniger apoptotische Zellen im Colon der $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäuse sprechen für eine im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen mildere Entzündung. Ki67 wurde als Marker für proliferierende Zellen gewählt. Colitis-Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mehr proliferierende Zellen im Colon auf. Im Darm der $IL-10^{-/-}$ Mäuse zeigten sich deutlich mehr Ki67⁺ Zellen als bei $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäusen (Abb. 7 B). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Wundheilung der Darmmukosa durch das Fehlen von TLR2 bzw. TLR4 beeinträchtigt ist.⁶⁰

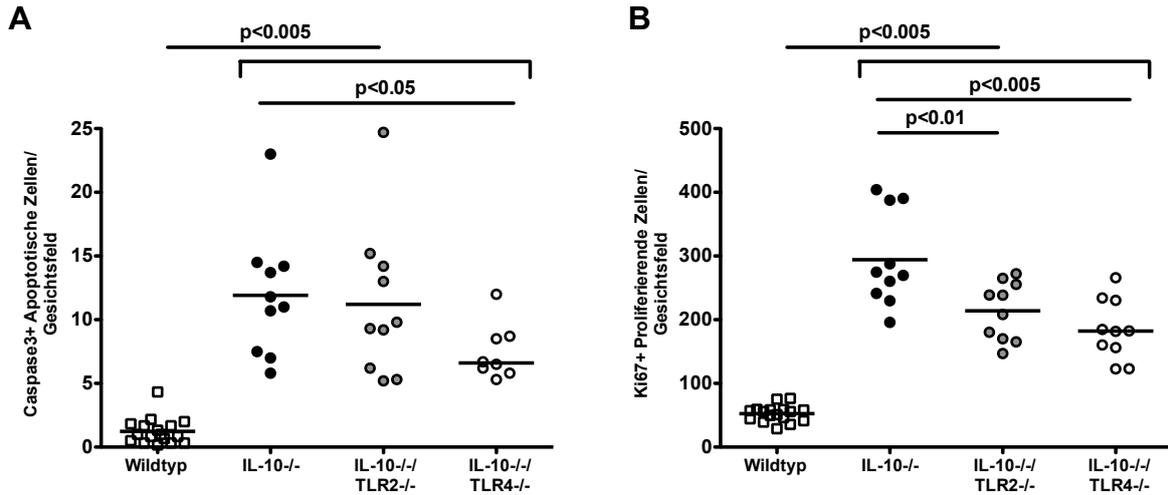


Abb. 7: Caspase 3⁺ (A) und Ki67⁺ (B) Zellen im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

MPO7 wird von myeloiden Zellen des Immunsystems, wie z.B. neutrophilen Granulozyten, exprimiert. Im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse wurden gegenüber den IL-10^{-/-} Kontrolltieren signifikant mehr neutrophile Granulozyten nachgewiesen. Im Vergleich zu den gesunden Wildtypen wiesen die IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse mehr MPO7⁺ Zellen auf, wie es im Rahmen der Colitis zu erwarten war (Abb. 8 A).

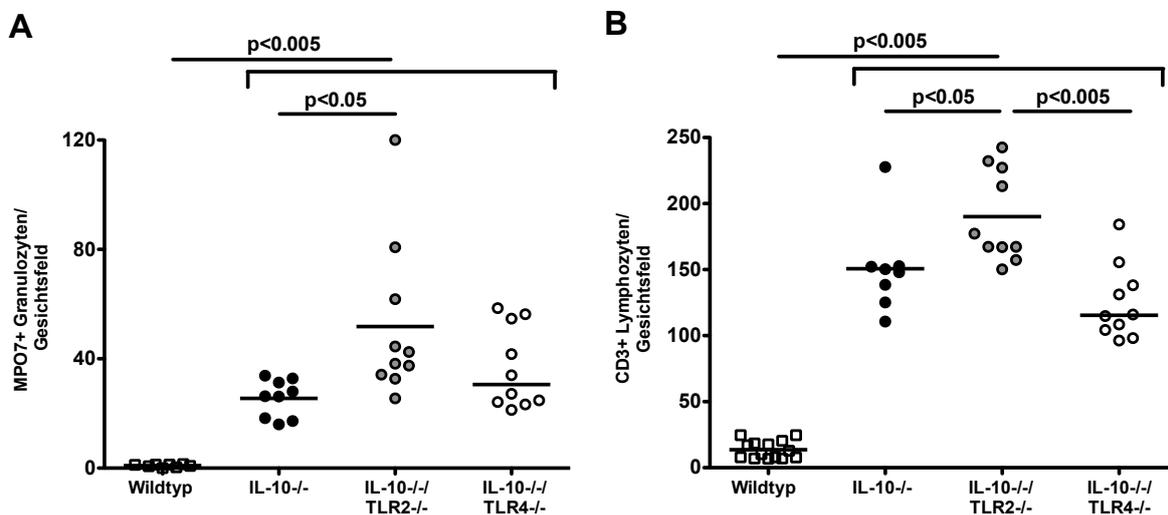


Abb. 8: MPO7⁺ Granulozyten (A) und CD3⁺ Lymphozyten (B) im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Da die Pathologie der IL-10^{-/-} Colitis durch Th1-Zellen vermittelt wird¹⁷, wurde CD3 als Marker für T-Zellen verwendet. Dabei zeigten sich im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tiere signifikant mehr

T-Zellen als bei $IL-10^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäusen, was die Ergebnisse des histopathologischen Scores bestätigt (Abb. 8 B). Gesunde Wildtyp-Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Anteil von T-Zellen im Colon im Vergleich zu den $IL-10^{-/-}$, $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäusen.

Beim B-Zellmarker B220 färbten sich bei den $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäusen signifikant weniger Zellen positiv an als bei den beiden anderen Gruppen (Abb. 9 A), was auf eine geringere Aktivierung des Immunsystems deutet. Wildtyp-Mäuse zeigten einen im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen signifikant geringeren Anteil von B-Zellen im Colon, da bei den Wildtyp-Tieren keine Colitis vorlag. Regulatorische T-Zellen wurden mittels Foxp3 gefärbt, wobei $IL-10^{-/-}$, $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäuse einen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant höheren Anteil regulatorischer T-Zellen im Colon zeigen (Abb. 9 B).

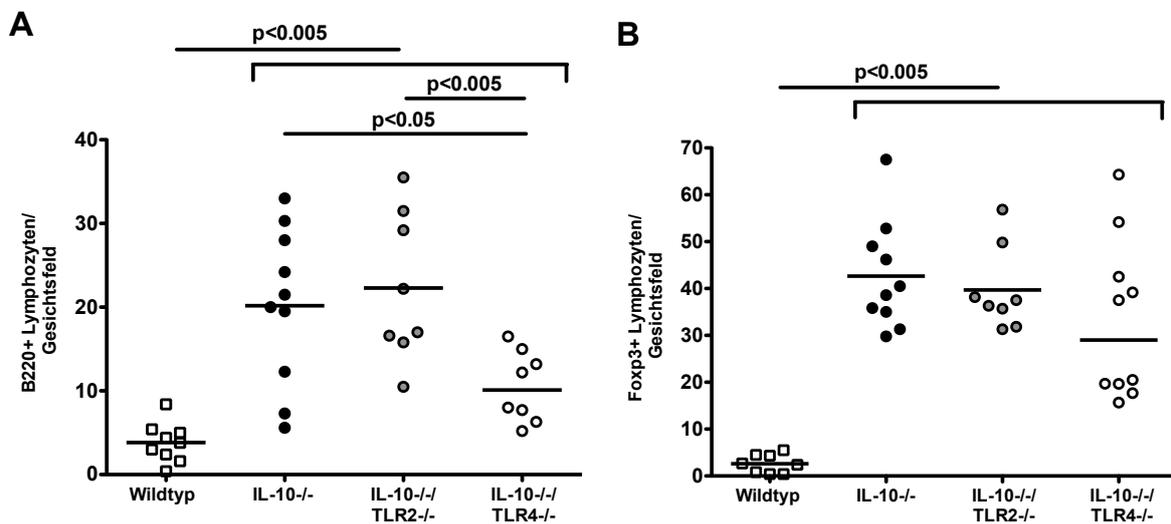


Abb. 9: B220⁺ (A) und Foxp3⁺ (B) Lymphozyten im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), $IL-10^{-/-}$ (schwarze Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ (graue Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.5 Zytokinkonzentrationen im Colon naiver Mäuse

Um die Immunantworten der TLR2 bzw. TLR4-defizienten Tieren weiter untersuchen zu können, wurden Zytokinmessungen in Organkulturüberständen von *ex vivo* gewonnenen Colonproben durchgeführt. IL-12p70 und $IFN\gamma$ sind Zytokine, die für eine Th1-basierte Entzündungsreaktion charakteristisch sind. Im Rahmen der Immunantworten im $IL-10^{-/-}$ -Modell kommt es zu einem drastischen Anstieg dieser beiden Chemokine.¹⁷ Unsere Messungen ergaben, dass die Konzentrationen an IL-12p70 und $IFN\gamma$ bei den $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den $IL-10^{-/-}$ Tieren signifikant reduziert waren, was durch die abgeschwächte Entzündungsreaktion bei diesem Genotyp bedingt ist (Abb. 10 A und B).

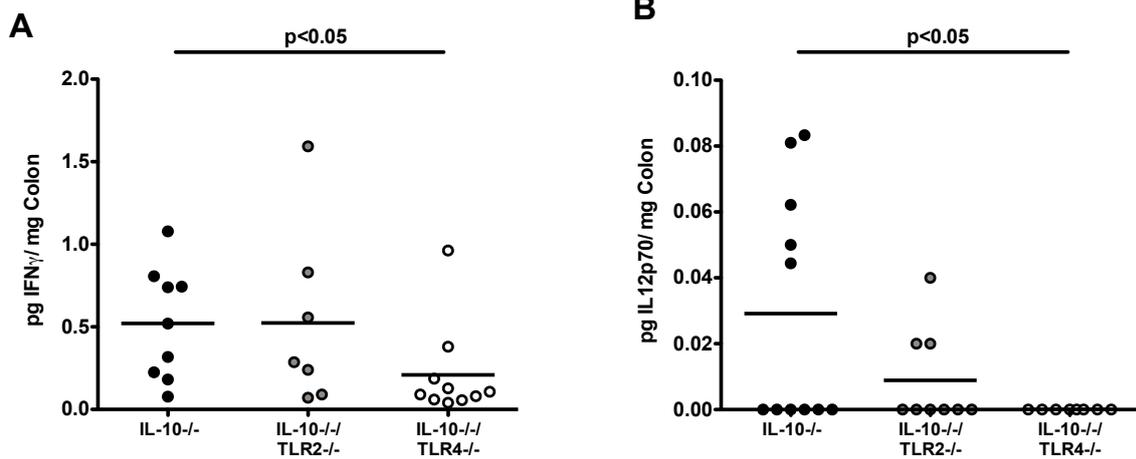


Abb. 10: IFN γ - (A) und IL12p70- (B) Konzentration im Colon naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Das Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) ist ein Chemokin, das die Aktivierung und die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen in entzündete Gewebe steuert. Bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen wurde eine im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen signifikant verminderte MCP-1-Konzentration gemessen (Abb. 11 A), was ebenfalls durch die schwächere Entzündung erklärt werden kann. Stickstoffmonoxid (NO) ist eine wichtige Komponente der unspezifischen Abwehr. Die NO-Werte lagen bei beiden TLR-defizienten Mauspopulationen niedriger als bei den IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 11 B).

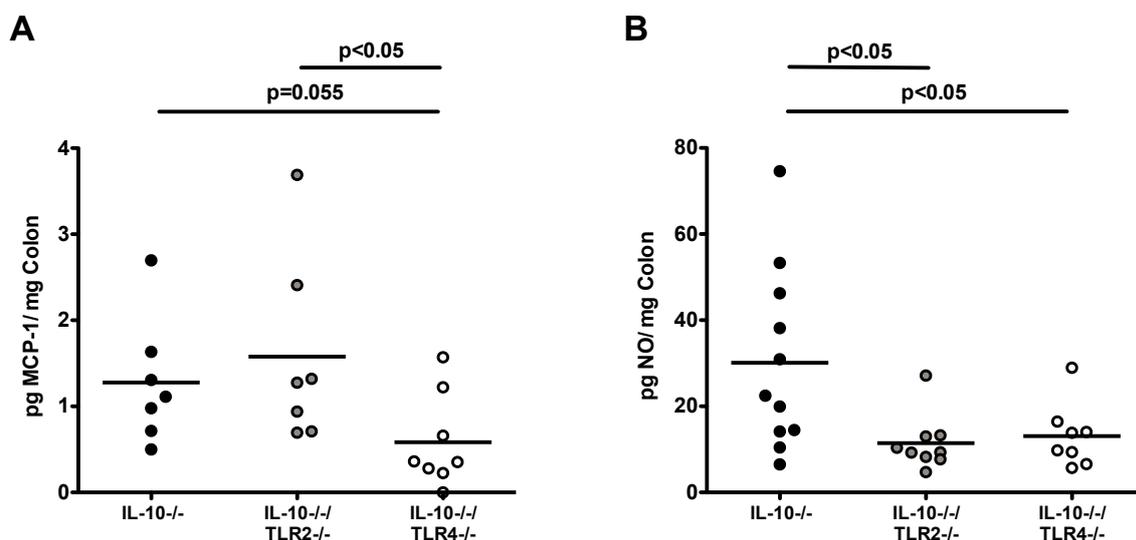


Abb. 11: MCP-1- (A) und NO- (B) Konzentration im Colon naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Aktivierte Makrophagen setzen TNF α frei, das u.a. Phagozyten und Lymphozyten ins Gewebe lockt. Die TNF α - und IL-6-Konzentrationen im Colon der IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Mäuse waren im Vergleich zu IL-10 $^{-/-}$ und IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht (Abb. 12 A und B).

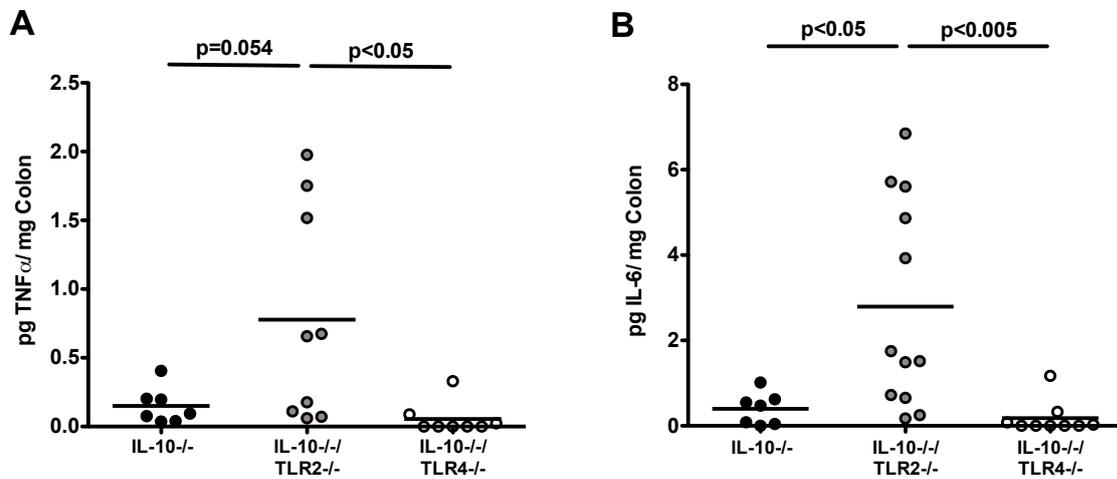


Abb. 12: TNF α - (A) und IL-6- (B) Konzentration im Colon naiver IL-10 $^{-/-}$ (schwarze Kreise), IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ (graue Kreise), IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

IL-22 bewirkt die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine¹³⁶, besitzt aber im Rahmen der Epitheldifferenzierung und -proliferation auch protektive Wirkungen.¹³⁷ Im Colon der IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Mäuse wurden im Vergleich zu IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ Mäusen erhöhte IL-22-Konzentrationen nachgewiesen, wobei die Messungen erhebliche Standardabweichung aufweisen (Abb. 13).

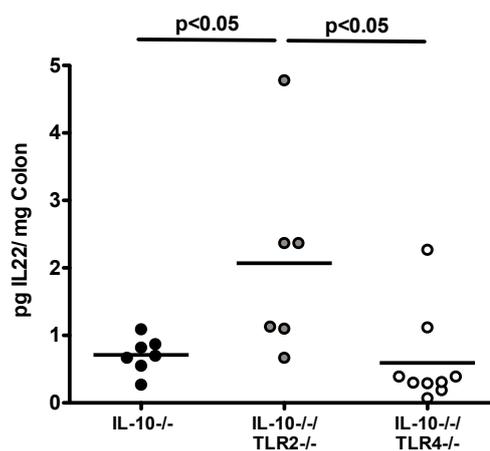


Abb. 13: IL22-Konzentration im Colon naiver IL-10 $^{-/-}$ (schwarze Kreise), IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ (graue Kreise), IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Die absolute Konzentration wurde auf das Organgewicht bezogen. Bei Bezug auf den Proteingehalt des analysierten Colonstücks ergaben sich mit großer Übereinstimmung die gleichen Signifikanzen.

4.1.6 mRNA-Expression im Colon naiver Mäuse

Neben der Untersuchung der Zytokinkonzentration auf Proteinebene mithilfe von CBA und ELISA wurde auch die Genexpression ausgewählter Zytokine analysiert. Dazu wurde die mRNA der Gene für die pro-inflammatorischen Zytokine $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-23, IL-18 und IL-6 mittels Reverse-Transkriptase-basierter Echtzeit-PCR bestimmt. Außerdem wurde die Expression der Gene für Mucin2 (MUC2), das an der Schleimbildung im Colon beteiligt ist und IL-22, für das sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen im Colon nachgewiesen wurden, bestimmt. Um das Konzentrationsniveau der verschiedenen Zytokine besser einschätzen zu können, wurde ein Vergleich mit gesunden Wildtypen durchgeführt.

$\text{IFN}\gamma$ wird von Th1-Zellen produziert. Im Modell der $\text{IL-10}^{-/-}$ Maus wird es vermehrt gebildet und ist am Entzündungsgeschehen beteiligt. Der Vergleich von gesunden Wildtyp-Tieren mit $\text{IL-10}^{-/-}$, $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR2}^{-/-}$ und $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR4}^{-/-}$ Mäusen ergab eine erhöhte $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration im Colon aller Colitis-Tiere (Abb. 15 A). Dies bestätigte die bei diesen Tieren vorliegende Entzündung. $\text{TNF}\alpha$ wirkt pro-inflammatorisch und ist an der Aktivierung und Differenzierung vieler Immunzelltypen beteiligt.¹³⁸ Der Vergleich von nicht-entzündeten Wildtyp-Mäusen mit $\text{IL-10}^{-/-}$, $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR2}^{-/-}$ und $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR4}^{-/-}$ Mäusen ergab auch bei den $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen erhöhte Werte bei den Colitis-Tieren (Abb. 15 B), was die Entzündungssituation im Darm widerspiegelte.

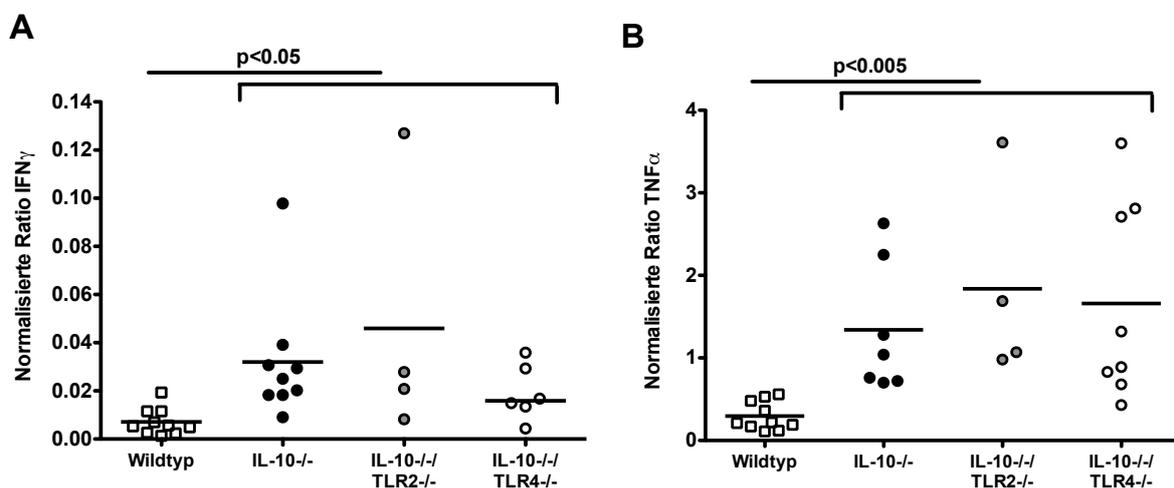


Abb. 14: $\text{IFN}\gamma$ - (A) und $\text{TNF}\alpha$ - (B) mRNA-Expression im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), $\text{IL-10}^{-/-}$ (schwarze Kreise), $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR2}^{-/-}$ (graue Kreise), $\text{IL-10}^{-/-}/\text{TLR4}^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

IL-23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das im Colon von antigenpräsentierenden Zellen (APC) sezerniert wird. Zum einen hemmt es regulatorische T-Zellen, sodass deren Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und $\text{TGF-}\beta$ unterdrückt wird und zum anderen stimuliert

es Th17-Zellen, die daraufhin eine Reihe weiterer pro-inflammatorischer Zytokine freisetzen.¹³⁹ Der Vergleich der IL-23-mRNA-Konzentration im Colon der Wildtyp-Mäuse mit den IL-10^{-/-} Mäusen zeigte eine signifikant höhere IL-23-Konzentration bei den IL-10^{-/-} Mäusen. Auch die IL-23-Konzentration im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erhöht. Zwischen Wildtyp- und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 15 A). IL-22 besitzt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte (siehe 4.1.5). Es konnte im Colon von Wildtyp-Tieren fast gar nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu fanden sich erhöhte Konzentrationen bei IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen (Abb. 15 B).

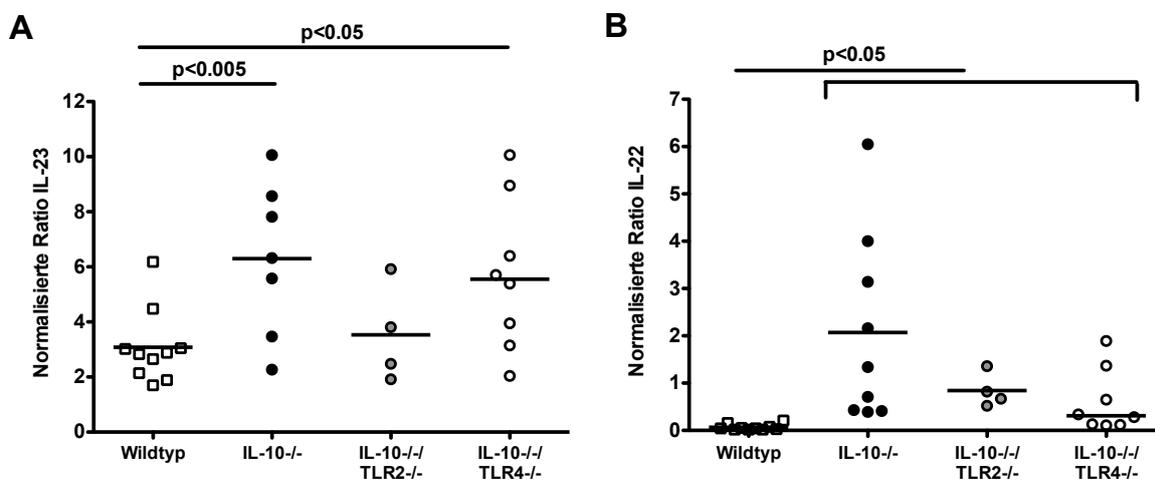


Abb. 15: IL-23- (A) und IL-22- (B) mRNA-Expression im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise) und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

IL-18 wirkt im Colon pro-inflammatorisch¹⁴⁰, erfüllt aber auch wichtige protektive Funktionen bei den intestinalen Epithelzellen.¹⁴¹ Bei der Analyse der IL-18-mRNA-Expression im Colon der Wildtyp, IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse konnte gezeigt werden, dass im Colon der Wildtyp-Tiere mehr IL-18-mRNA exprimiert wurde als bei den IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen (Abb. 16 A).

IL-6 ist ein pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das in murinen Colitis-Modellen an der Vermittlung der Immunreaktion mitwirkt.¹⁴² Die IL-6-Konzentrationen aller entzündeten Tiere liegen über denen der Wildtyp-Tiere, was die Beteiligung von IL-6 an der Entzündung in diesem Colitis-Modell hervorhebt. Beim Vergleich der IL-6-mRNA-Expression innerhalb der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse ergaben sich keine Unterschiede (Abb. 16 B). Da auf Proteinebene Unterschiede hinsichtlich der IL-6-Konzentration nachweisbar waren, ist dies ein Ergebnis, was nicht den Erwartungen entsprach.

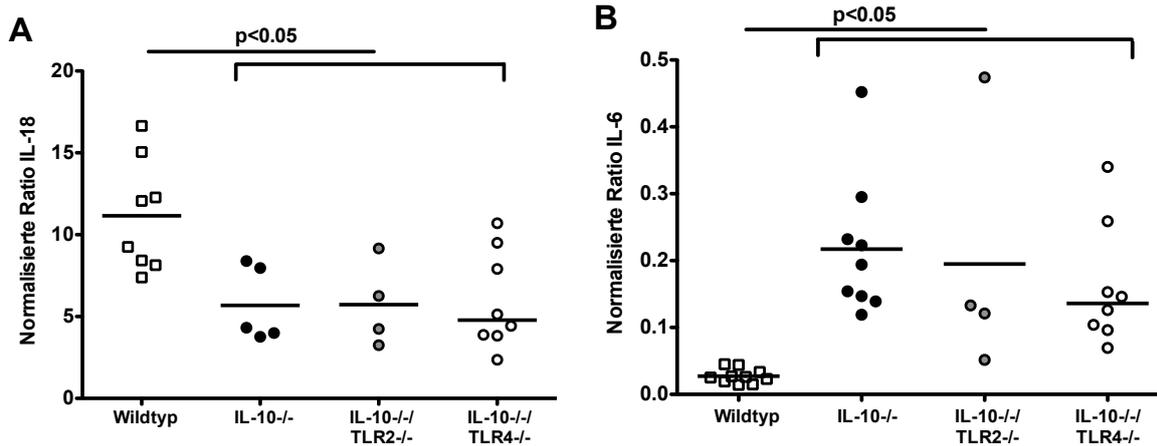


Abb. 16: IL-18- (A) und IL-6- (B) mRNA-Expression im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

MUC2, das von Becherzellen im Colon produziert wird, bildet die Hauptkomponente der Colon-Schleimschicht und stellt einen wichtigen Baustein der Darmbarriere dar.¹⁴³ Die Analyse der MUC2-mRNA-Expression im Colon der Wildtyp, IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigte keine Unterschiede (Abb. 17).

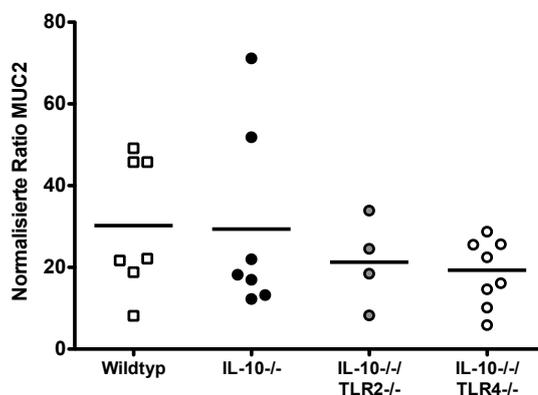


Abb. 17: MUC2-mRNA-Expression im Colon naiver Wildtyp- (weiße Kästchen), IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.7 FACS-Analyse der mesenterialen Lymphknoten naiver Mäuse

Mesenteriale Lymphknoten (MLN) bilden den größten Teil des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT, gut associated lymphoid tissue) und stellen die erste Lymphknotenstation für Immunzellen aus dem Colon dar. In den MLN von Morbus Crohn Patienten wurden mehr Th1- und Th17-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen.¹⁴⁴ Es ist davon auszugehen, dass sich ein wesentlicher Teil der Immunantwort in diesem Kompartiment abspielt. Die Immunzellpopulationen in den MLN der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}

/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Population der CD4⁺ Zellen wird von T-Helferzellen (Th) gebildet, wobei die zusätzliche Expression von CD69 aktivierte Th-Zellen kennzeichnet. Th-Zellen sind aktiv an der Entzündung beteiligt. Hinsichtlich der CD4⁺ und CD4⁺/CD69⁺ Zellpopulationen konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden. Um die T-Zellantwort näher zu charakterisieren, wurden zytotoxische CD8⁺ T-Zellen analysiert. In den MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurde im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tieren ein signifikant höherer Anteil an CD8⁺ Zellen gemessen (Abb. 18 A). Um das Verhältnis von Th-Zellen und zytotoxischen T-Zellen zueinander abschätzen zu können, wurde die CD4⁺/CD8⁺-Ratio bestimmt. Die CD4⁺/CD8⁺-Ratio ergab einen signifikant verminderten Wert der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Gruppe im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Tieren (Abb. 18 B), worin sich die Erhöhung der CD8⁺ Zellen widerspiegelt und eine veränderte T-Zellantwort anzeigt.

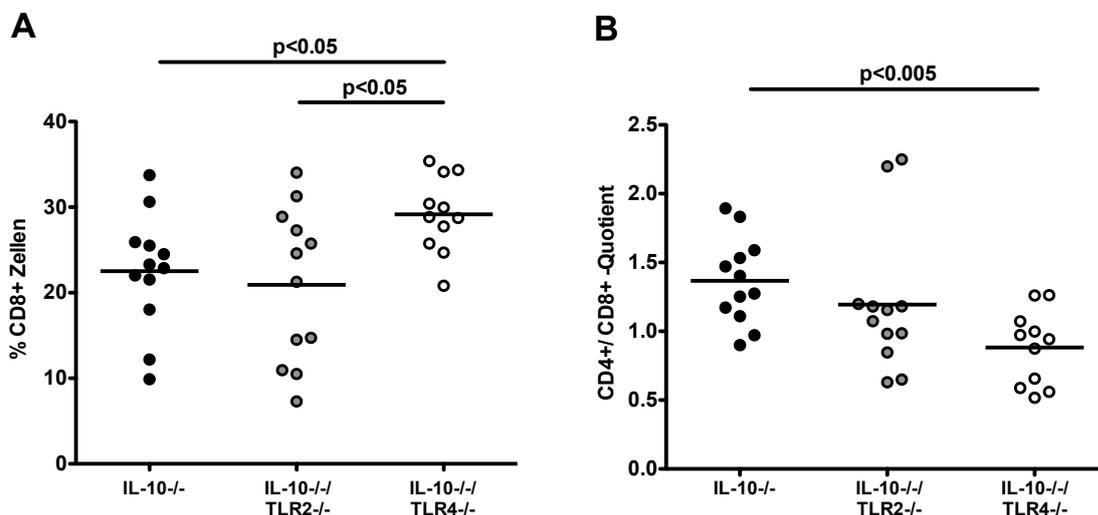


Abb. 18: Anteil CD8⁺ Zellen (A) und CD4⁺/CD8⁺- Quotient (B) in den MLN naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Auch bei der Analyse der natürlichen Killerzellen (NK1.1⁺) zeigten sich in der Gruppe der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse Unterschiede im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen. Die Anzahl dieser Zellpopulation war in den MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse reduziert (Abb. 19). Bei der Bestimmung der B-Zellen (B220⁺), Neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺/Gr1⁺) und dendritischen Zellen (CD11c⁺) konnten bezüglich des Anteils dieser Zellpopulationen keine signifikanten Unterschiede in den MLN festgestellt werden (nicht dargestellt).

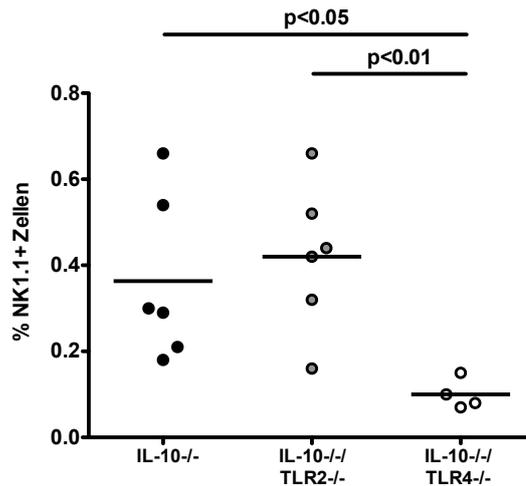


Abb. 19: Anteil NK1.1⁺ Zellen in den MLN naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.8 FACS-Analyse der Milz naiver Mäuse

Um eine systemische Beteiligung des Immunsystems zu analysieren wurden Immunzellen der Milz isoliert und hinsichtlich der gleichen Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert wie in den MLN. Dabei ergab sich bei den CD4⁺ T-Helferzellen kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (nicht dargestellt). In der Milz der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden im Vergleich zu bei den beiden anderen Genotypen signifikant erhöhte Mengen an aktivierten (CD4⁺/CD69⁺) Th-Zellen gefunden (Abb. 20 A).

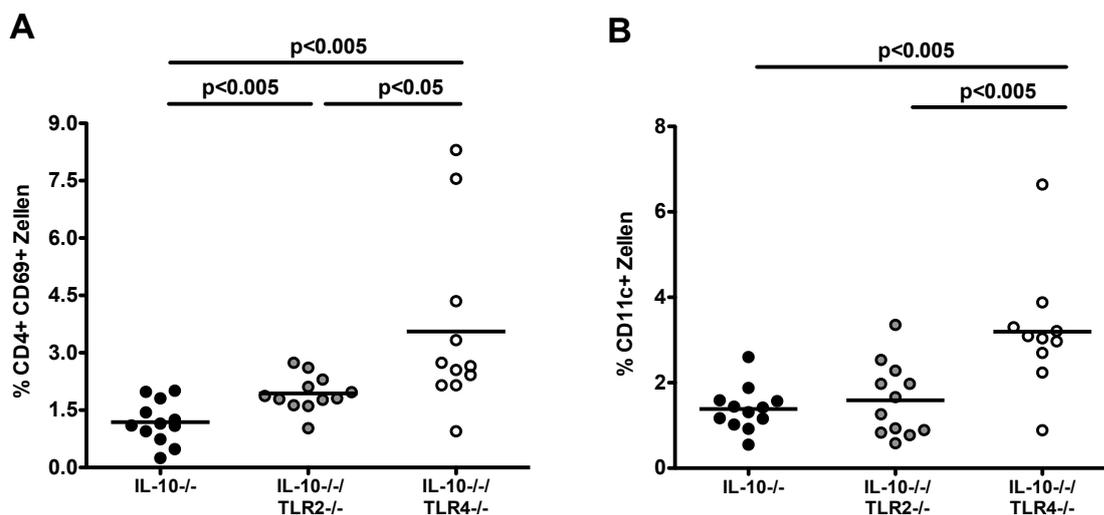


Abb. 20: Anteil CD4⁺/CD69⁺ (A) und CD11c⁺ (B) Zellen in der Milz naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Mäusen ebenso einen höheren Anteil an CD4⁺/CD69⁺ Zellen auf. Dendritische Zellen in der Milz wurden mit dem Marker CD11c untersucht. Auch hier ergab sich ein signifikant erhöhter Anteil CD11c⁺ Zellen in der Milz der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen (Abb. 20 B).

Die Analyse der CD8⁺ Zellen und die Berechnung der CD4⁺/CD8⁺-Ratio ergab - ebenso wie die Bestimmung der B220⁺ Zellen - keine Unterschiede zwischen den Maus-Genotypen (nicht dargestellt). Die bezüglich der zytotoxischen T-Zellen festgestellten Unterschiede in den MLN fanden sich nicht in der Milz. Der Anteil der natürlichen Killerzellen (NK1.1⁺) war, wie schon in den MLN, bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erniedrigt (Abb. 21 A). In der Gruppe der IL-10^{-/-} Tiere wurde ein höherer Anteil neutrophiler Granulozyten (CD11b⁺/Gr1⁺) im Vergleich zu den anderen Genotypen gemessen (Abb. 21 B).

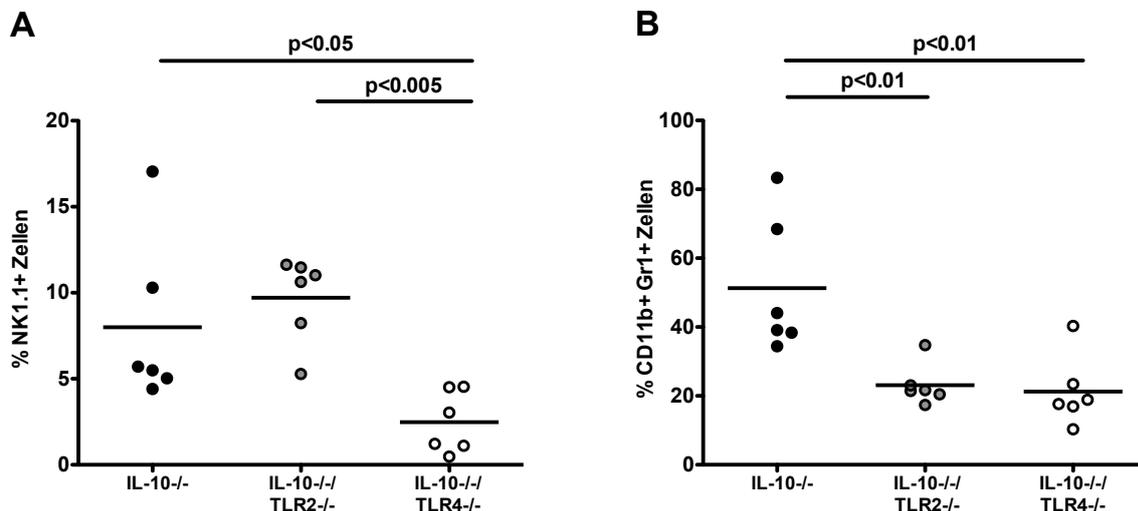


Abb. 21: Anteil NK1.1⁺ (A) und CD11b⁺/Gr1⁺ (B) Zellen in der Milz naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.1.9 Quantifizierung von *E. coli* im Coloninhalt

Da es im Rahmen einer Darmentzündung zum Anstieg von potenziell pro-inflammatorisch wirkenden Darmkommensalen, wie z.B. von *E. coli*, kommen kann³⁷, wurde die Menge von *E. coli* im Coloninhalt der Mäuse bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die *E. coli* Konzentrationen in den IL-10^{-/-} Mäusen signifikant niedriger waren als in den beiden anderen Genotypen. Es konnte bei einigen IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tieren überhaupt kein *E. coli* nachgewiesen werden, wobei sich aber bei allen IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen mindestens 10⁴ KBE/ g Faeces nachweisen ließen (Abb. 22).

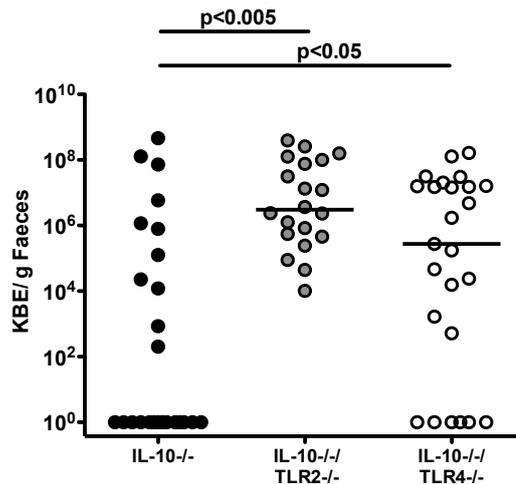


Abb. 22: Quantifizierung von *E. coli* im Coloninhalt naiver IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise), IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Median und Signifikanzniveaus von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere (n=26-29).

4.1.10 Translokation lebender Bakterien in MLN, Leber, Milz, Niere und Blut

Im murinen IL-10^{-/-} Modell kommt es aufgrund der Barrieredefekte im Rahmen der Colitis zu einer erhöhten Translokation von Bakterien. Es zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der TLR-Defizienz. Dabei kam es bei 65% (13/20) der IL-10^{-/-} Mäuse zu einer Translokation in die mesenterialen Lymphknoten (MLN). In den Gewebshomogenaten der MLN wurden Laktobazillen, Enterokokken und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen gefunden. Im Falle der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse kam es in 53,3% (8/15) zu Translokationen in die MLN, wobei es sich um Laktobazillen, Enterokokken und *E. coli* handelte. Nur bei 35% (7/20) der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse waren Bakterien in den MLN nachweisbar. Es handelte sich um Laktobazillen, Enterokokken, *E. coli*, *Proteus* sp. und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen.

Im Vergleich zu den MLN kam es zu einer geringeren Translokation in die Leber. Es konnten in einer IL-10^{-/-} Maus von insgesamt 20 Tieren (5%) Laktobazillen in der Leber nachgewiesen werden. In der Leber einer IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Maus (von 15; 6,7%) Laktobazillen, Enterokokken und *E. coli* vorgefunden. In 15% (3/20) der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse kam es zu einer Translokation von Laktobazillen und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen.

In der Milz konnten in der Gruppe der IL-10^{-/-} Mäuse keine Bakterien nachgewiesen werden. Bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen wurden in 6,7% (1/15) Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen vorgefunden. Ein größerer Bakteriennachweis konnte bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen geführt werden (15%, 3/20). Es handelte sich um Laktobazillen, Enterokokken, *E. coli* und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen.

In den Nieren konnten zu einem gleichen Prozentsatz Bakterien nachgewiesen werden wie in der Leber. Dabei waren bei den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen ausschließlich Laktobazillen vorhanden, während es sich bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen um Laktobazillen, Enterokokken, *E. coli*, *Proteus* sp. und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen handelte.

Im Blut waren bei keinem der untersuchten Tiere lebende Bakterien nachweisbar.

Tabelle 16: Unterschiede zwischen naiven Wildtyp IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen. * p<0.05, ** p<0.01 und *** p< 0.005 IL10^{-/-} vs. IL10-TLR2^{-/-}; † p<0.05, †† p<0.01 und ††† p<0.005 IL10^{-/-} vs. IL10-TLR4^{-/-}; ^a p<0.05, ^{aa} p<0.01 und ^{aaa} p<0.005 IL10-TLR2^{-/-} vs. IL10-TLR4^{-/-}; ^o p<0.05, ^{oo} p<0.01 und ^{ooo} p<0.005 Wildtyp vs. IL10^{-/-}. Angegeben sind Mittelwert bzw. *Median (kursiv)* ± Standardabweichung. IHC - Immunhistochemie.

	IL-10 ^{-/-}	IL-10 ^{-/-} /TLR2 ^{-/-}	IL-10 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-}	ggf. Wildtyp
Colon				
- pH	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,1	6,6 ± 0,3	
- länge (cm)	9,4 ± 1	9 ± 0,9 ^a	9,5 ± 0,7 ^a	
Scores				
- Klinisch	3,3 ± 2,1 ^{†††}	2,8 ± 1,7 ^a	1,3 ± 1,4 ^{†††a}	
- Histopatholog.	2,0 ± 0,8 ^{** ooo}	2,8 ± 0,8 ^{** a}	2,3 ± 0,7 ^a	0 ± 0 ^{ooo}
IHC (Zellen/ Gesichtsfeld)				
- Caspase3 ⁺	11,9 ± 4,7 [†]	11,2 ± 5,6	7,5 ± 2,1 [†]	
- Ki67 ⁺	294,1 ± 69,9 ^{** †††}	214,1 ± 43,5 ^{**}	184,2 ± 45 ^{†††}	
- CD3 ⁺	150,7 ± 32,3 ^{* ooo}	190,1 ± 32,9 ^{* aaa}	124,7 ± 26,6 ^{aaa}	18,2 ± 4,8 ^{ooo}
- B220 ⁺	20,2 ± 8,9 ^{† ooo}	22,3 ± 8,3 ^{aaa}	10,5 ± 4 ^{† aaa}	3,8 ± 2,2 ^{ooo}
- MPO7 ⁺	25,4 ± 6,4 ^{* ooo}	51,9 ± 27,6 [*]	36,6 ± 14,2	0,9 ± 0,5 ^{ooo}
- Foxp3 ⁺	42,7 ± 10,9 ^{ooo}	39,7 ± 8,4	33,1 ± 16,2	2,6 ± 1,9 ^{ooo}
Zytokinkonzentration (pg/ mg Colon)				
- IFN γ	0,5 ± 0,3 [†]	0,5 ± 0,5	0,2 ± 0,3 [†]	
- IL-12p70	0,03 ± 0,03 [†]	0,01 ± 0,01	0 ± 0 [†]	
- MCP-1	1,3 ± 0,7	1,6 ± 1,1 ^a	0,5 ± 0,3 ^a	
- NO	30,1 ± 20,1 ^{* †}	11,5 ± 6,1 [*]	13,1 ± 7 [†]	
- TNF α	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,7 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	
- IL-6				
- IL-22	0,4 ± 0,3 [*]	3,3 ± 2,5 ^{* aaa}	0,2 ± 0,4 ^{aaa}	
	0,7 ± 0,2 [†]	2,1 ± 1,4 ^a	0,6 ± 0,7 ^{†a}	

mRNA-Expression

(Normal. Ratio)

- IFN γ	0,03 \pm 0,01 $^{\circ}$	0,05 \pm 0,05	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01 $^{\circ}$
- TNF α	1,3 \pm 0,7 $^{\circ\circ}$	1,8 \pm 1,1	1,7 \pm 1,1	0,3 \pm 0,2 $^{\circ\circ}$
- IL-6	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	
- IL-22	2,1 \pm 1,7 $^{\circ}$	0,8 \pm 0,3	0,6 \pm 0,6	0,1 \pm 0,1 $^{\circ}$
- IL-23	6,3 \pm 2,6 $^{\circ\circ}$	3,5 \pm 1,5	5,7 \pm 2,6	3,1 \pm 1,3 $^{\circ\circ}$
- IL-18	5,7 \pm 2 $^{\circ}$	5,7 \pm 2,3	6 \pm 2,8	11,2 \pm 3,2 $^{\circ}$
- MUC2	29,4 \pm 21,2	21,3 \pm 9,3	18,6 \pm 7,7	33,9 \pm 13,1

FACS-Analyse

MLN (%/ + Zellen)

- CD4	29,5 \pm 7	23,6 \pm 10,1	25,2 \pm 6,6
- CD4/CD69	6,7 \pm 2,2	5,7 \pm 2,1	6,1 \pm 2,3
- CD8	22,5 \pm 6,5 ‡	20,9 \pm 8,6 a	29,2 \pm 4,2 $^{\ddagger a}$
- CD4/CD8-Quot.	1,4 \pm 0,3 ‡‡‡	1,2 \pm 0,5	0,9 \pm 0,3 ‡‡‡
- CD11c	0,7 \pm 0,5	0,7 \pm 0,5	0,6 \pm 0,2
- CD11bGr1	3,3 \pm 3,2	2,4 \pm 2,5	2,2 \pm 1
- B220	20 \pm 7,3	19,6 \pm 8,4	22,8 \pm 5,8
- NK1.1	0,4 \pm 0,2 ‡	0,4 \pm 0,2 aa	0,1 \pm 0,03 $^{\ddagger aa}$

FACS-Analyse

Milz (%/ + Zellen)

- CD4	9,9 \pm 6,2	12,7 \pm 3	11,8 \pm 4,8
- CD4/CD69	1,2 \pm 0,5 $^{*** \ddagger\ddagger\ddagger}$	1,9 \pm 0,4 $^{*** a}$	3,6 \pm 2,2 $^{\ddagger\ddagger\ddagger a}$
- CD8	7,1 \pm 3,6	7,7 \pm 2,7	7,6 \pm 3,2
- CD4/CD8-Quot.	1,4 \pm 0,5	1,7 \pm 0,4	1,5 \pm 0,5
- CD11c	1,4 \pm 0,5 ‡‡‡	1,6 \pm 0,8 aaa	3,2 \pm 1,4 $^{\ddagger\ddagger\ddagger aaa}$
- CD11bGr1	51,3 \pm 18,1 $^{** \ddagger\ddagger}$	23,1 \pm 5,5 **	21,2 \pm 9,3 ‡‡
- B220	26,4 \pm 14,6	32,7 \pm 12,3	23,9 \pm 8,9
- NK1.1	8 \pm 4,5 ‡	9,7 \pm 2,3 aaa	2,5 \pm 1,6 $^{\ddagger aaa}$

E. coli* (KBE/ g**Faeces) $1 \pm 9 \times 10^7$ $^{ \ddagger}$ $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^8$ *** $2 \times 10^5 \pm 3 \times 10^7$ ‡

Translokation/

Tier (%)

- MLN	13/20 (65 %)	8/15 (53,3 %)	7/20 (35 %)
- Leber	1/20 (5 %)	1/15 (6,7 %)	3/20 (15 %)
- Milz	0/20 (0 %)	1/15 (6,7 %)	3/20 (15 %)
- Niere	1/20 (5 %)	1/15 (6,7 %)	3/20 (15 %)
- Blut	0/20 (0 %)	0/15 (0 %)	0/20 (0 %)

4.2 Auswirkungen von *C. jejuni* auf die IL-10^{-/-}-Colitis und die Rolle der TLR2 und TLR4 im Rahmen der *C. jejuni*-Infektion

Gastrointestinale Erreger spielen in der Pathogenese und der Initiierung eines Schubes bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine noch nicht vollständig geklärte Rolle (siehe 1.8). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Infektion mit *C. jejuni* ATCC43431 die Colitis von IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im C57BL/10-ScSn-Hintergrund beeinflusst und ggf. zu einer verstärkten Entzündung führt. Dafür wurden Spezifisch Pathogenfreie (SPF) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im C57BL/10 Hintergrund mit *C. jejuni* infiziert. Aus Vorversuchen in der eigenen Forschungsgruppe ist bekannt, dass in einem Zeitraum von 14 Tagen p.i. die *C. jejuni*-Konzentration im Colon der IL-10^{-/-} Tiere abnimmt und bei einigen Tieren kein *C. jejuni* mehr nachgewiesen werden kann. Für diese Arbeit wurde Tag 5 p.i. für die Tötung der Tiere und die Organentnahme gewählt, um bei einer größt möglichen Anzahl von Mäusen eine Immunantwort gegenüber *C. jejuni* untersuchen zu können. Die Organentnahme bei den naiven Tieren erfolgte in einem den infizierten Tieren entsprechenden Alter.

Durch den Vergleich naiver und infizierter Tiere ist es möglich, die Veränderungen, die durch die Infektion mit *C. jejuni* hervorgerufen werden, zu detektieren. Analog zu den naiven Tieren wurden auch bei den infizierten Mäusen klinische, immunologische und mikrobiologische Parameter untersucht. Vergleicht man infizierte IL-10^{-/-} Mäuse mit infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen lassen sich zudem Aussagen zur Bedeutung der TLR2 und TLR4 im Rahmen einer Infektion mit *C. jejuni* machen.

4.2.1 *C. jejuni* Konzentrationen im Colon der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse

IL-10, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden mit *C. jejuni* in einer Dosis von $7,5 \times 10^7$ - 1×10^{10} KBE/ ml PBS per os (p.o.) an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0, 1 und 2) infiziert. Um den Erfolg der Infektion zu überprüfen, wurde an den Tagen 3, 4 und 5 p.i. eine quantitative Bestimmung der *C. jejuni*-Konzentrationen in Faecesproben durchgeführt. Die Bestimmung der *C. jejuni*-Konzentration an Tag 3 p.i. zeigte signifikant mehr KBE/g Faeces bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb. 23 A). Die Faecesmenge an Tag 4 zeigte eine leichte Reduktion der Konzentrationen insgesamt, jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 23 B). Nach Sektion der Mäuse an Tag 5

wurde im Coloninhalt der $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ Mäuse eine im Vergleich zu den $IL-10^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäusen signifikant höhere Menge *C. jejuni* nachgewiesen (Abb. 24).

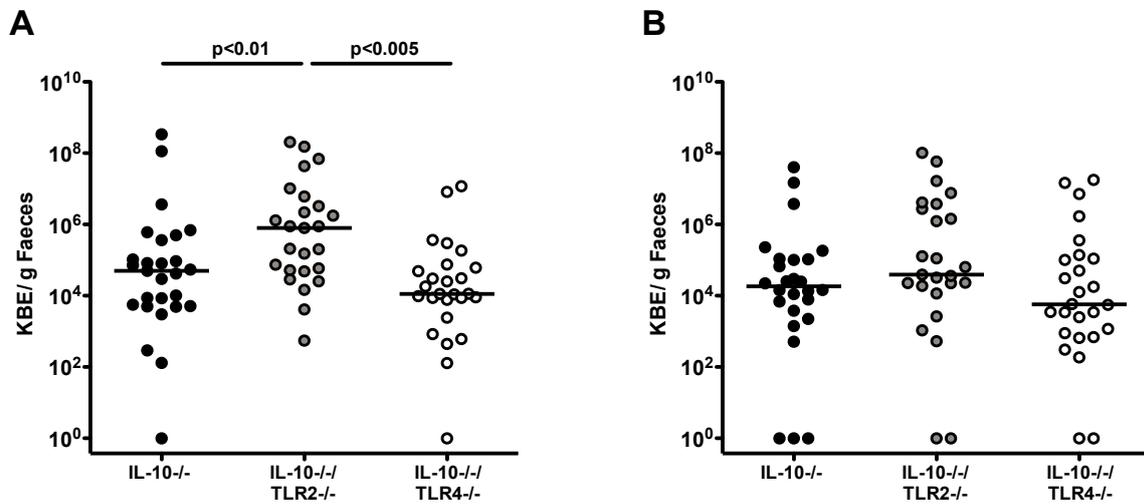


Abb. 23: Quantifizierung von *C. jejuni* an Tag 3 (A) und Tag 4 (B) aus dem Faeces infizierter $IL-10^{-/-}$ (schwarze Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ (graue Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind der Median und Signifikanzniveaus von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere (n=33-36).

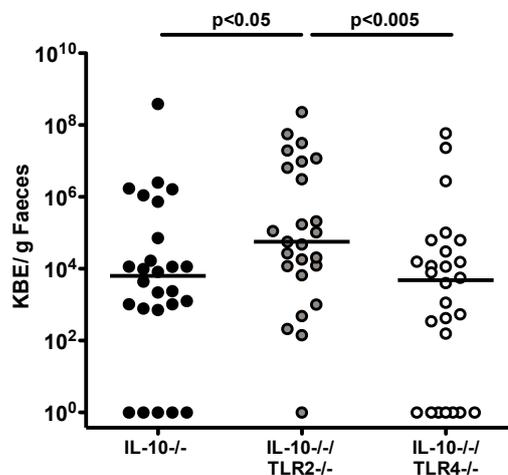


Abb. 24: Quantifizierung *C. jejuni* an Tag 5 aus dem Coloninhalt infizierter $IL-10^{-/-}$ (schwarze Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ (graue Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind der Median und Signifikanzniveaus von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere (n=33-35).

4.2.2 Verlauf des klinischen Zustandes der Mäuse nach der Infektion mit *C. jejuni*

Um die Beeinträchtigung der Mäuse durch eine Infektion mit *C. jejuni* besser erfassen zu können, wurden sie vor der Infektion sowie an den Tagen 3 und 5 p.i. klinisch beurteilt. Bei allen Tieren kam es durch die Infektion zu einem Anstieg des klinischen Scores (Abb. 25 A-C). Die Verschlechterung des Zustandes im Vergleich zur Ausgangssituation fiel jedoch nur bei den $IL-$

IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen so stark aus, dass die Veränderung an Tag 5 p.i. statistisch signifikant wurde.

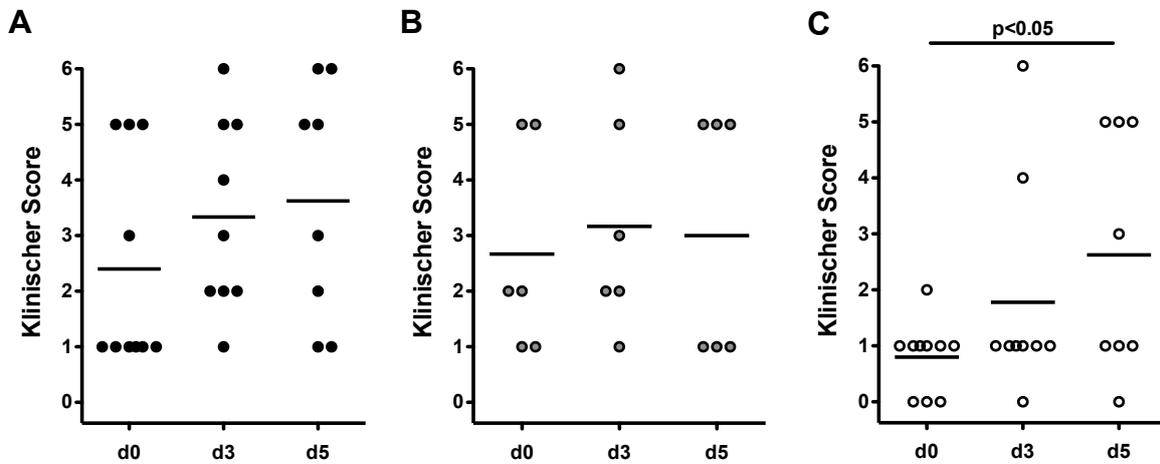


Abb. 25: Verlauf des klinischen Zustandes von IL-10^{-/-} (A), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (B) und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (C) Mäusen vor Infektion (d0) sowie an den Tagen 3 und 5 (d3/ d5) nach Infektion mit *C. jejuni*. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.2.3 Colonlänge und pH-Wert im Colon der infizierten Mäuse

Die Colonlänge als ein Maß für die Stärke der Entzündung (siehe 4.1.2) wurde auch bei den mit *C. jejuni* infizierten Tieren gemessen. Die IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Mäusen ein signifikant längeres Colon auf (Abb. 26). Die Infektion mit *C. jejuni* bewirkte keine Veränderung der Colonlänge der infizierten Tiere im Vergleich zu den naiven. Auch der pH-Wert des Colons als Zeichen einer veränderten Darmflora zeigte keine Unterschiede.

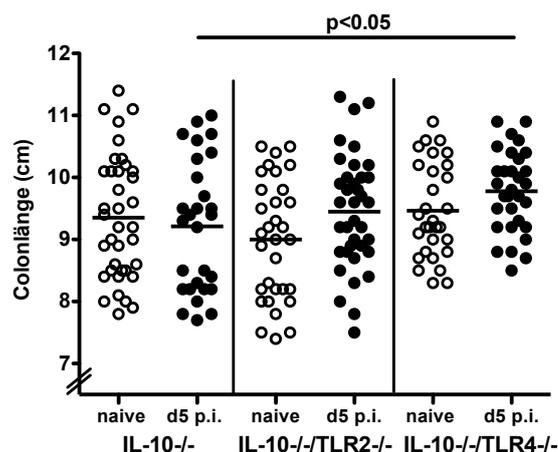


Abb. 26: Länge des Colons (cm) naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 7 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere (n=29-37). Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

4.2.4 Histopathologie des Colons infizierter Mäuse

Um eine durch die Infektion mit *C. jejuni* ausgelöste Pathologie festzustellen, wurden HE-gefärbte Schnitte des Colons infizierter und naiver Tiere mit dem OVA-Colitis-Score (siehe 3.4.3) bewertet (Abb. 27).

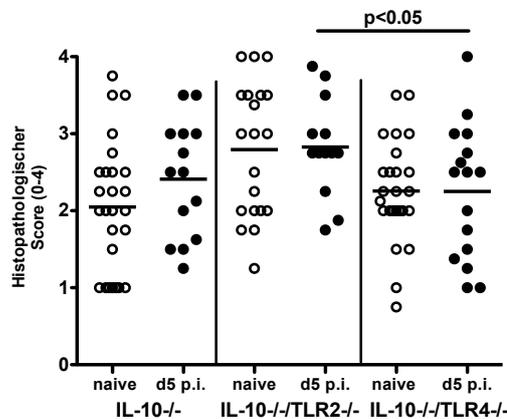


Abb. 27: Histopathologischer Score naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind die Mittelwerte von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere (n=14-26). Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Im Vergleich der naiven IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zu den jeweiligen infizierten Genotypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Somit führte die Infektion mit *C. jejuni* zu keiner mittels OVA-Colitis-Score feststellbaren Histopathologie im Colon der Tiere. Infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse wiesen einen im Vergleich zu den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen erhöhten histopathologischen Score auf.

4.2.5 Immunhistochemische Analyse des Colons naiver und infizierter Mäuse

Analog zu den naiven Tieren wurde das Colon der mit *C. jejuni* infizierten Tiere immunhistochemisch untersucht. Es wurden die Marker CD3 (T-Zellen), B220 (B-Zellen), Foxp3 (T-regulatorische Zellen), Ki67 (proliferierende Zellen) und Caspase3 (apoptotische Zellen) verwendet. Es konnten keine MPO7⁺ Zellen (myeloide Zellen) im Colon der infizierten Tiere untersucht werden, da die Färbung trotz dreimaligen Anfertigens nicht gelang.

Apoptotische Zellen wurden mittels Caspase3 detektiert. Hinsichtlich dieser Zellpopulation konnte im Colon naiver und infizierter IL-10^{-/-} Mäuse kein Unterschied festgestellt werden. Im Colon infizierter IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tiere befanden sich mehr Zellen in Apoptose als im Colon der naiven IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tiere. Auch im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse konnte kein signifikanter Anstieg von Caspase3⁺ Zellen festgestellt werden. Die Unterschiede im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse können mit der höheren Konzentration *C. jejunis* im Darm dieser Tiere

zusammenhängen (Abb. 28 A). Proliferierende Zellen, die Ki67 exprimieren, wurden im Colon der infizierten IL-10^{-/-} Mäuse in etwa in gleicher Anzahl vorgefunden wie im Colon der naiven IL-10^{-/-} Mäuse. Ki67⁺ Zellen zeigten sich jedoch vermehrt im Colon der infizierten TLR-defizienten Gruppen im Vergleich zu deren naiven Genotypen. Die Infektion mit *C. jejuni* bewirkte somit einen Anstieg proliferierender Zellen. Im Colon der infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse kam es zu einer signifikanten Reduktion Ki67⁺ proliferierender Zellen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 28 B). Aufgrund des TLR-Defekts wäre dies auch bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen zu erwarten gewesen, deutet sich aber nur tendenziell an.

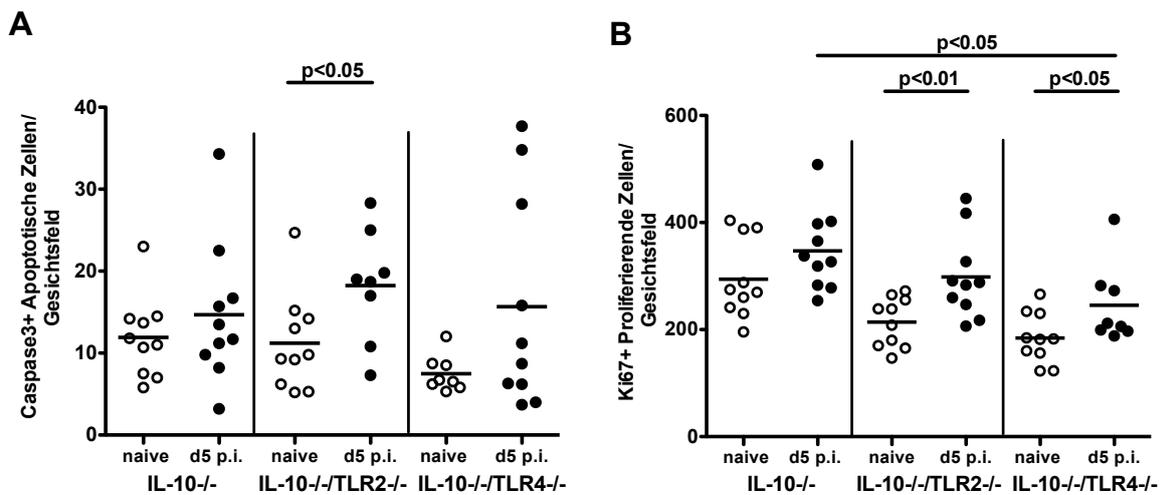


Abb. 28: Caspase3⁺ apoptotische (A) und Ki67⁺ proliferierende (B) Zellen im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Infizierte IL-10^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu naiven IL-10^{-/-} Mäusen leicht erhöhte CD3⁺ Zellzahlen im Colon, deren Unterschiede jedoch nicht signifikant sind. Innerhalb der infizierten Gruppen ließ sich im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse eine deutlich geringere Anzahl CD3⁺ T-Zellen und B220⁺ B-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb. 29) erkennen. Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei allen Gruppen zu einer erhöhten Anzahl B220⁺ Zellen im Vergleich zu dem jeweiligen naiven Genotyp.

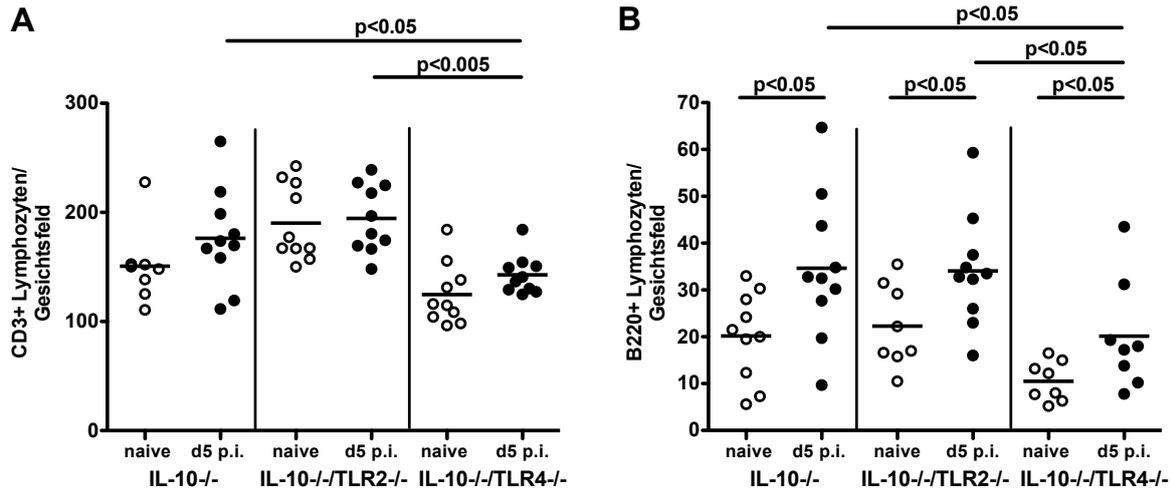


Abb. 29: CD3⁺ (A) und B220⁺ (B) Zellen im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Regulatorische T-Zellen, die Foxp3 exprimieren, verhindern die Aktivierung naiver T-Zellen hin zu T-Effektorzellen. Im Colon der infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse kam es zu einer signifikanten Erhöhung Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu ihren jeweiligen naiven Genotypen (Abb. 30).

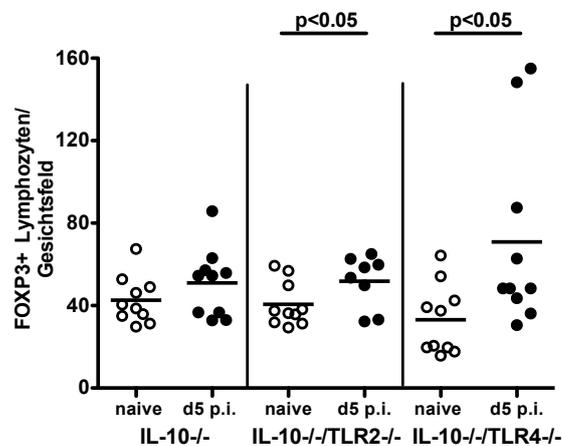


Abb. 30: Foxp3⁺ Zellen im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

4.2.6 Zytokinanalyse

Die pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine IFN γ , IL-12p70, IL-6, TNF α , NO und MCP-1 wurden in Organkulturüberständen von Colonproben per CBA bestimmt. Außerdem wurden die IL-22-Konzentrationen im Colon der Tiere analysiert. Die Th1-Antwort wird hauptsächlich

durch die Zytokine IFN γ und IL-12 charakterisiert. Weder die IFN γ - noch die IL-12p70-Konzentration im Colon der Mäuse veränderte sich durch die Infektion mit *C. jejuni*. Innerhalb der infizierten Gruppen zeigte sich eine höhere IFN γ -Konzentration bei den IL-10 $^{-/-}$ Mäusen gegenüber den beiden anderen Genotypen (Abb. 31 A). Hinsichtlich der IL-12p70-Konzentration trat eine Erhöhung bei den IL-10 $^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Mäusen auf (Abb. 31 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Infektion mit *C. jejuni* bei den IL-10 $^{-/-}$ Mäusen zu einer stärkeren Th1-Antwort im Vergleich zu den TLR-defizienten Gruppen führt.

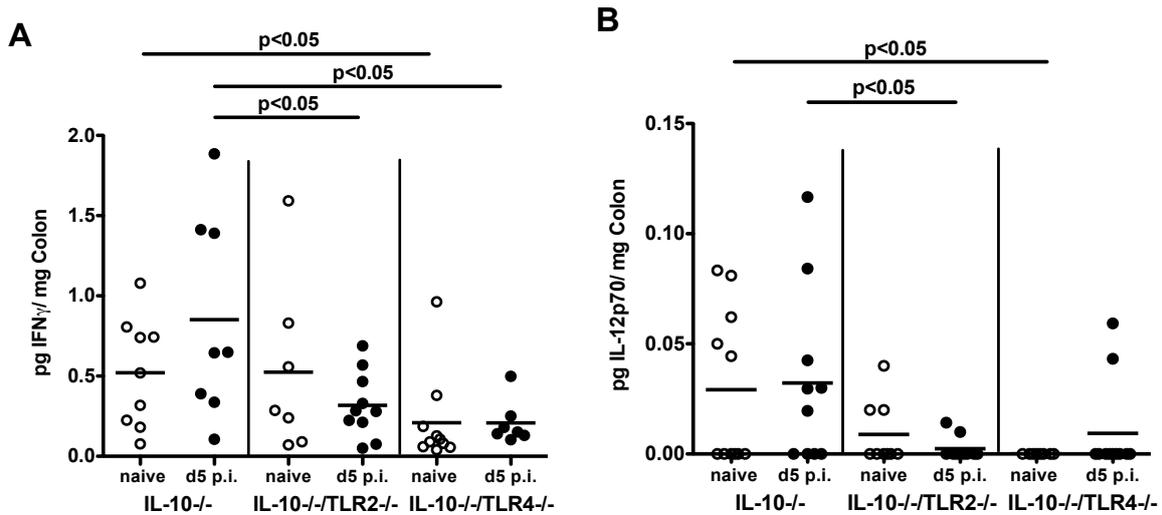


Abb. 31: IFN γ - (A) und IL-12p70- (B) Konzentration im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10 $^{-/-}$, IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ und IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Die IL-6-Messungen zeigten einen Anstieg der infizierten IL-10 $^{-/-}$ und IL-10 $^{-/-}$ /TLR4 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den naiven, wobei es in der IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Gruppe zu gegensätzlichen Ergebnissen kam (Abb. 32 A). Die Infektion mit *C. jejuni* bewirkte bei den IL10 $^{-/-}$ Mäusen keine Veränderung der TNF α -Konzentration im Vergleich zu den naiven Tieren gleichen Genotyps (Abb. 32 B). Die infizierten IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Mäuse zeigten eine Reduktion der TNF α -Konzentration im Vergleich zu den naiven IL-10 $^{-/-}$ /TLR2 $^{-/-}$ Mäusen. Die Messung der NO-Konzentration ergab signifikant verminderte Werte bei den infizierten IL-10 $^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10 $^{-/-}$ Mäusen (Abb. 32 C).

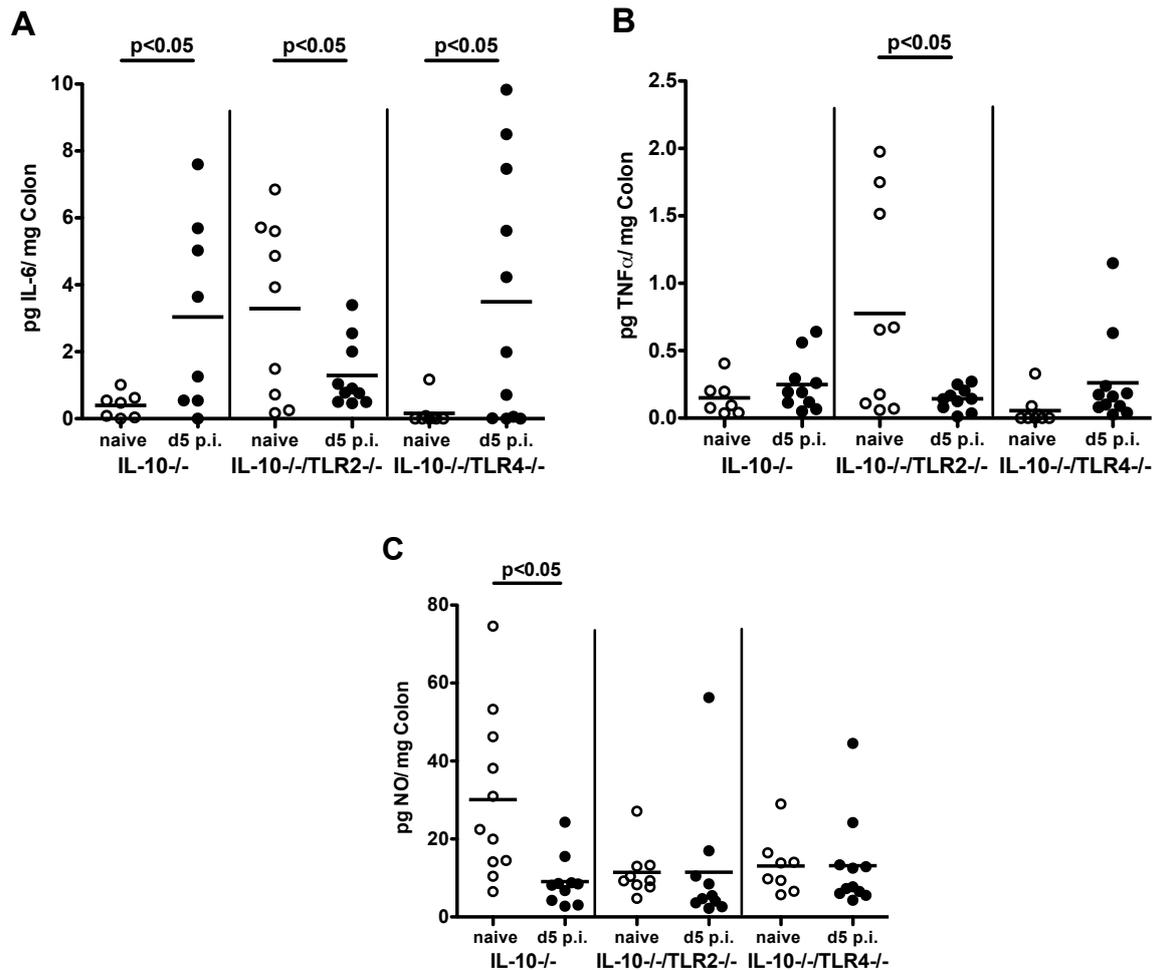


Abb. 32: IL-6- (A), TNF α - (B) und NO- (C) Konzentrationen im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Im Colon der infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse konnte im Vergleich zu den jeweiligen naiven Genotypen keine erhöhte Konzentration des Chemokins MCP-1 nachgewiesen werden. Auch die Analyse der IL-22-Konzentration ergab keine Unterschiede im Vergleich naiver und infizierter Mäuse und der infizierten Gruppen untereinander (nicht dargestellt).

4.2.7 mRNA-Bestimmung im Colon infizierter Mäuse

Die Infektion mit *C. jejuni* führte im Colon aller Genotypen zu einer signifikanten Reduktion von MUC2 und IL-18 im Vergleich zu den naiven Gruppen (Abb. 33 A und B). Zudem wiesen infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu IL-10^{-/-} Mäusen erhöhte IL-18-Konzentrationen auf.

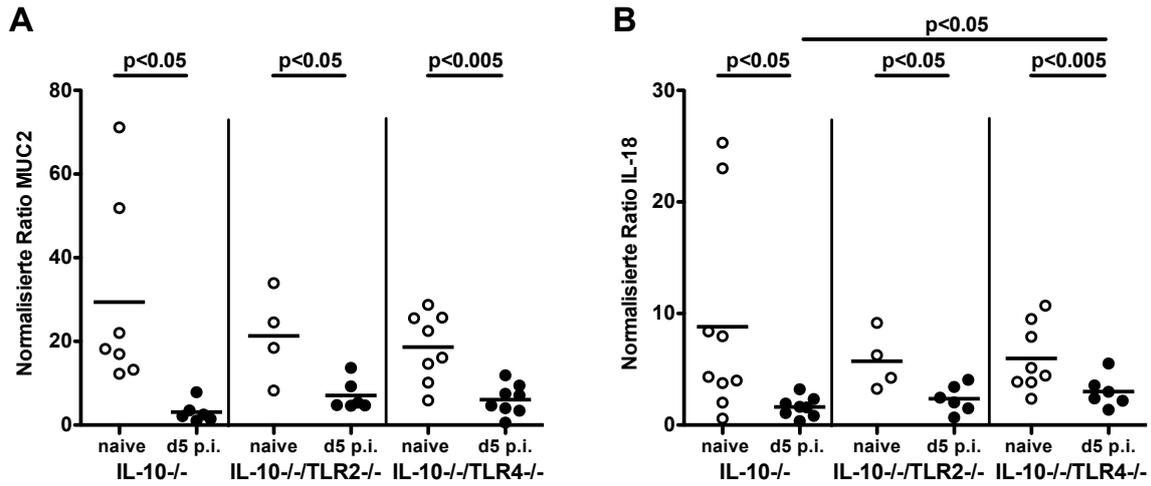


Abb. 33: MUC2- (A) und IL-18- (B) mRNA-Expression im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Die IL-23, IL-6, IFN γ und TNF α -Werte der infizierten IL-10^{-/-} Tiere lagen signifikant unter denen der naiven IL-10^{-/-} Tiere (Abb. 34 und Abb. 35). Innerhalb der infizierten Gruppen wurde ein Anstieg der TNF α -Konzentration bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen gegenüber den IL-10^{-/-} Mäusen nachgewiesen. Die IL-22-mRNA-Analyse ergab wie die IL-22-Bestimmung auf Proteinniveau keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

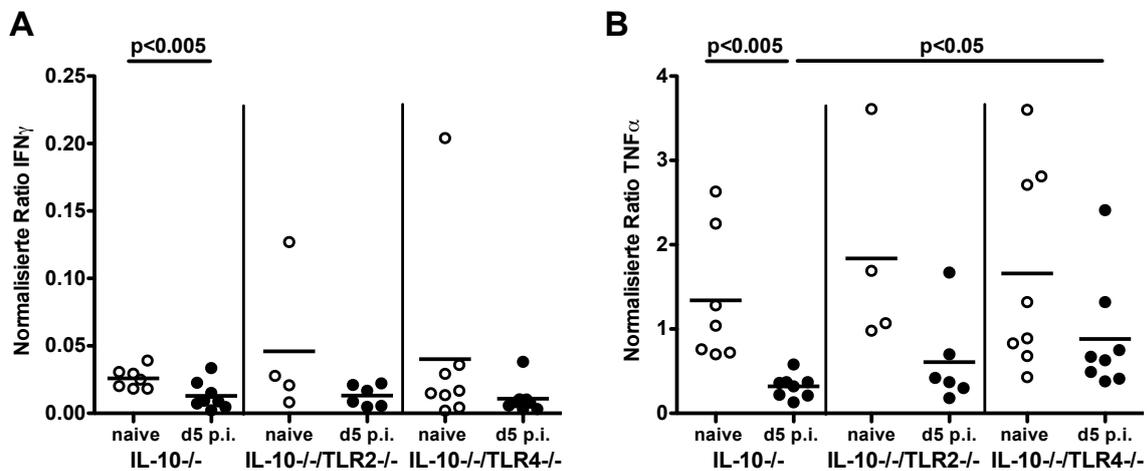


Abb. 34: IFN γ - (A) und TNF α - (B) mRNA-Expression im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

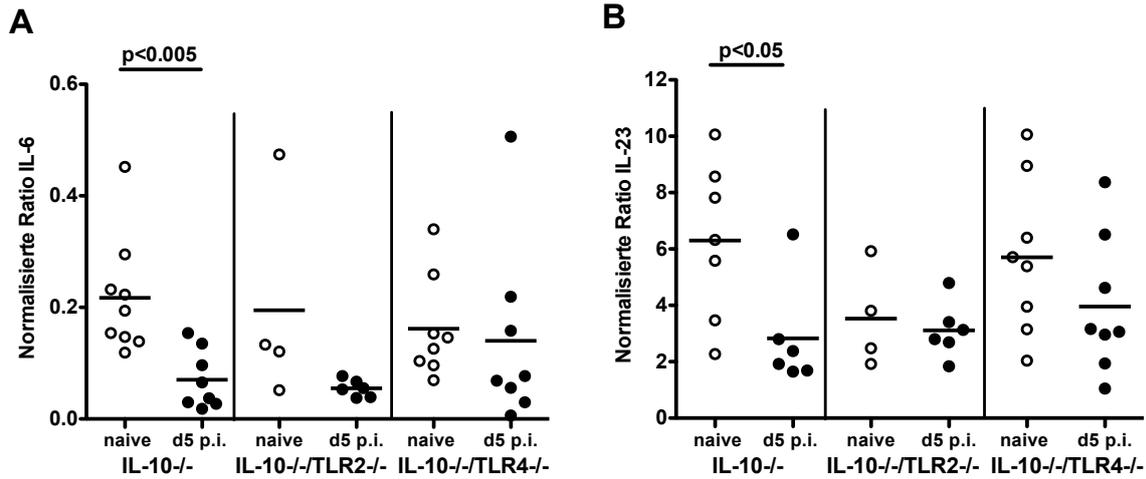


Abb. 35: IL-6- (A) und IL-23- (B) mRNA-Expression im Colon naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.2.8 Immunzellpopulationen in den MLN infizierter und naiver Tiere

Die durchflusszytometrische Analyse der MLN ergab hinsichtlich der CD4⁺ Zellen und des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten keine Unterschiede bei der Gegenüberstellung naiver und infizierter IL-10^{-/-} sowie IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse (Abb. 36 A und B). Infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu den naiven Tieren gleichen Genotyps einen Anstieg CD4⁺ Zellen sowie eine Erhöhung des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten. Innerhalb der infizierten Gruppen zeigte sich ein signifikant reduzierter Anteil CD4⁺ Zellen in der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen (Abb. 36 A).

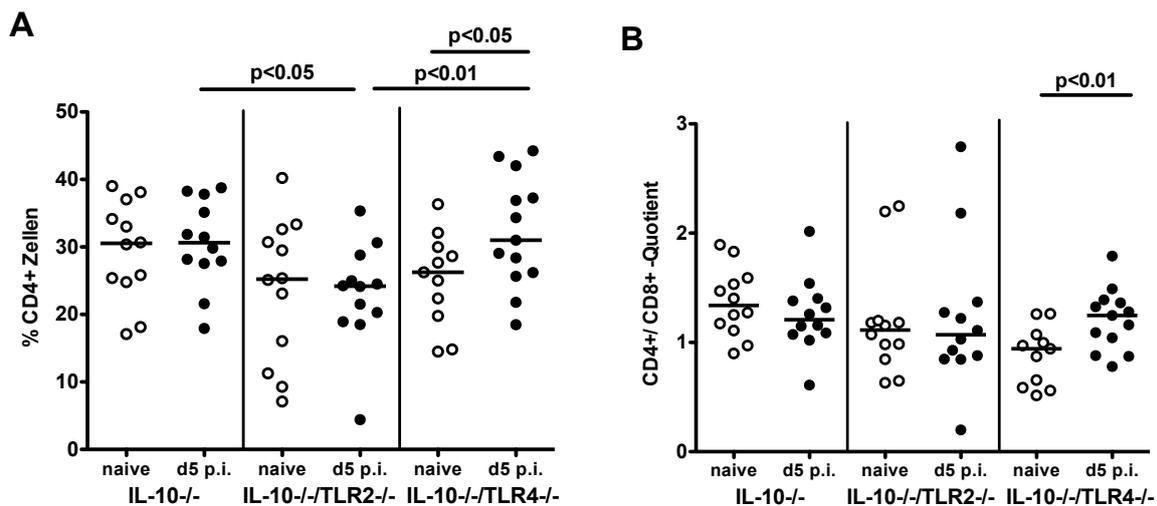


Abb. 36: Anteil CD4⁺ Zellen (A) und CD4⁺/CD8⁺-Quotient (B) in den MLN naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Die Analyse der CD4⁺/CD69⁺ Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt). Bei den mit *C. jejuni*-infizierten Tieren konnte keine Änderung des Anteils zytotoxischer T-Zellen im Vergleich zu den naiven Mäusen festgestellt werden. Infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen -wie schon die naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse- einen höheren Anteil CD8⁺ Zellen auf als infizierte IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse (Abb. 37 A). Infizierte IL-10^{-/-} sowie IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse zeigten in etwa gleiche Anteile dendritischer Zellen wie naive IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. Der Anteil der CD11c⁺ Zellen der infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse liegt deutlich über dem der anderen infizierten Gruppen und den naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tieren (Abb. 37 B).

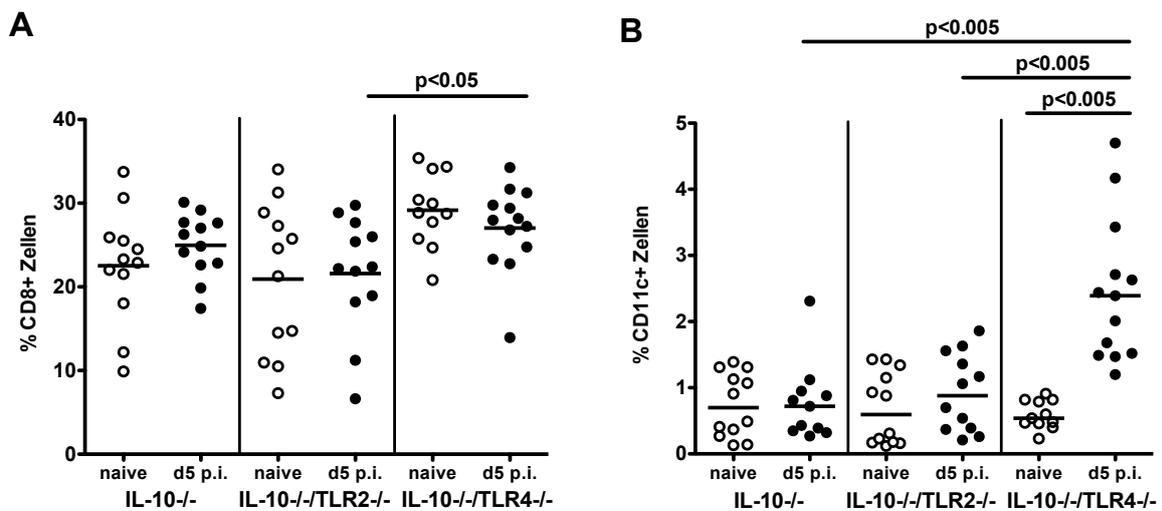


Abb. 37: Anteil CD8⁺ (A) und CD11c⁺ (B) Zellen in den MLN naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

Auch bei der Analyse der CD11b⁺/Gr1⁺ und B220⁺ Zellen in den MLN der infizierten IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den naiven Tieren gleichen Genotyps. Infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen sowohl bei den CD11b⁺/Gr1⁺ Zellen als auch bei den B220⁺ Zellen eine signifikante Verminderung im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen und allen infizierten Gruppen auf (Abb. 38 A und B). Abweichend zu den Ergebnissen der naiven Tiere waren bei den NK1.1⁺ Zellen keine Unterschiede feststellbar (nicht dargestellt).

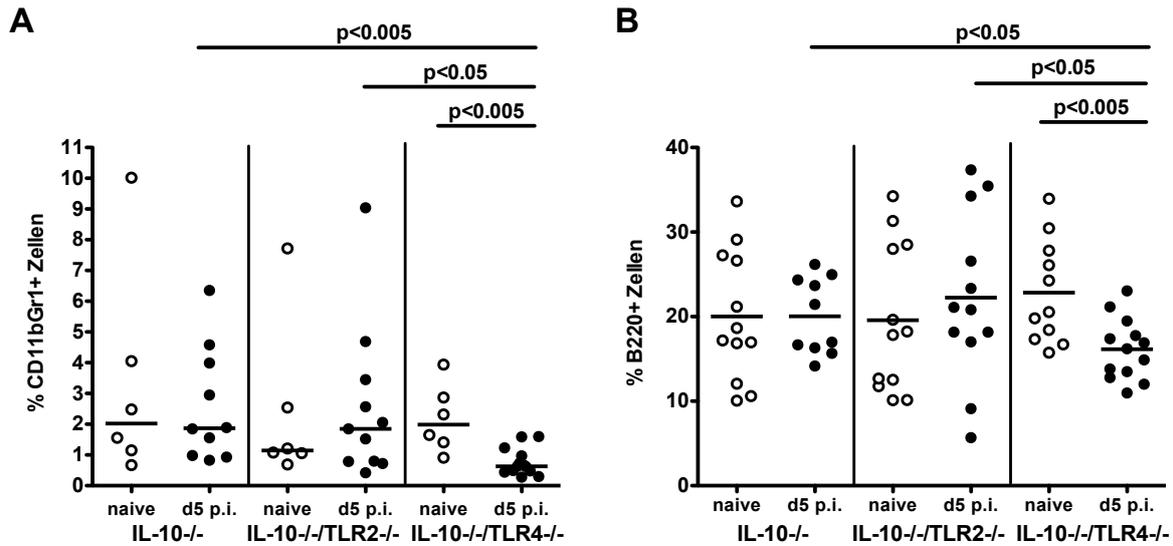


Abb. 38: Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ (A) und B220⁺ (B) Zellen in den MLN naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.2.9 Immunzellpopulationen in der Milz naiver und infizierter Tiere

Infizierte IL-10^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen keine signifikanten Unterschiede des Anteils CD4⁺, CD4⁺/CD69⁺, CD8⁺ und CD11c⁺ Zellpopulationen in der Milz. Der Anteil der CD4⁺, CD4⁺/CD69⁺ und CD8⁺ Zellen lag bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen signifikant über dem der infizierten IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen sowie über dem der naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen. Infizierte IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tiere wiesen zudem einen verminderten Anteil CD4⁺ Zellen gegenüber den naiven IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tieren auf (Abb. 39 A-C). Die Analyse CD11c⁺ Zellen ergab eine Erhöhung dieser Zellpopulation in der Gruppe der infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere gegenüber den beiden anderen infizierten Gruppen, sowie einen erhöhten Anteil bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tieren im Vergleich zu infizierten IL-10^{-/-} (Abb. 39 D).

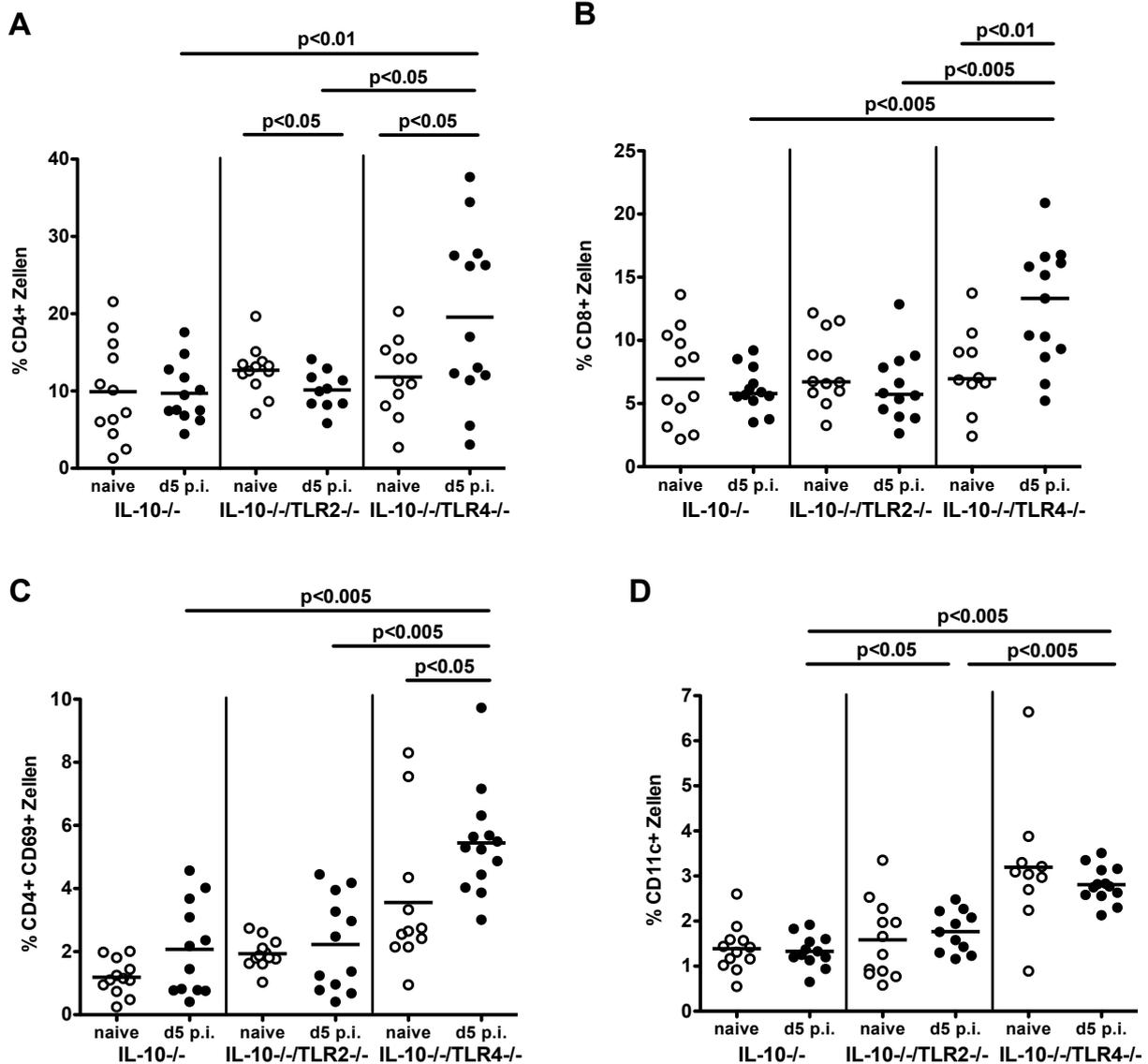


Abb. 39: Anteil CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD4⁺/CD69⁺ (C) und CD11c⁺ (D) Zellen in der Milz naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

In der Milz infizierter IL-10^{-/-} Mäuse konnte eine signifikante Reduktion des Anteils CD11b⁺/Gr1⁺ Zellen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Auch infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen geringere Anteile von Granulozyten in der Milz auf im Vergleich zu naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen. Zudem zeigte sich bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen der von allen untersuchten Gruppen geringste Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ Zellen (Abb. 40 A). Der Anteil NK1.1⁺ Zellen lag bei allen infizierten Gruppen unter dem der naiven (Abb. 40 B). Bei der Analyse der B220⁺ Zellen und des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

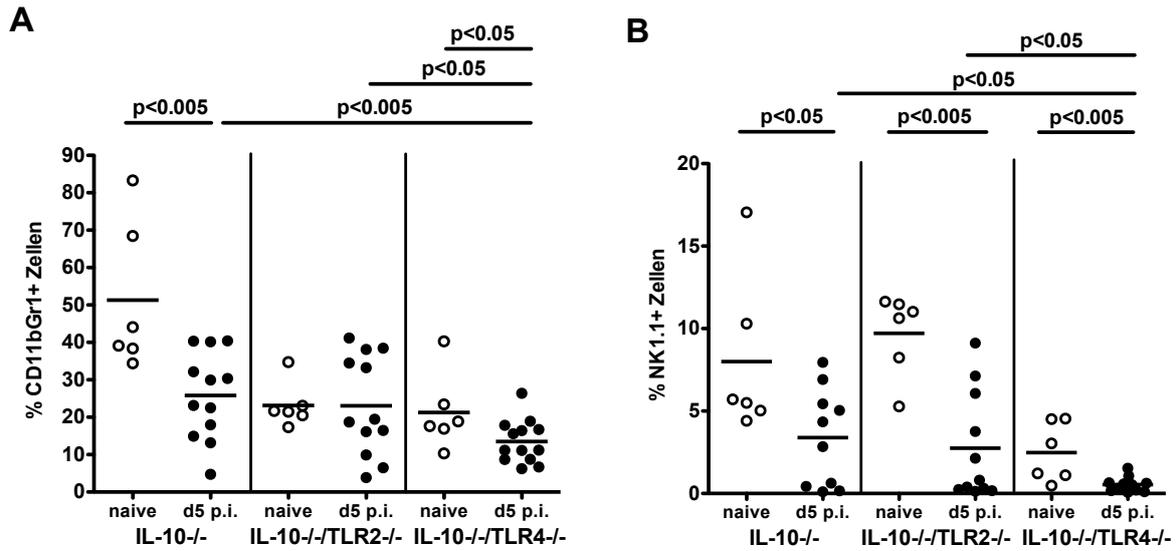


Abb. 40: Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ (A) und NK1.1⁺ (B) Zellen in der Milz naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

4.2.10 Durchflusszytometrische Analyse der Leber

Die Leber erfüllt neben zahlreichen Funktionen im Stoffwechsel auch immunologische Aufgaben. Infizierte IL-10^{-/-} Mäuse zeigten in der Leber einen signifikant höheren Anteil CD4⁺ Zellen im Vergleich zu infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und naiven IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 41 A). Eine Erhöhung des Anteils CD8⁺ Zellen konnte ebenfalls bei den infizierten gegenüber den naiven IL-10^{-/-} Tieren festgestellt werden (Abb. 41 B).

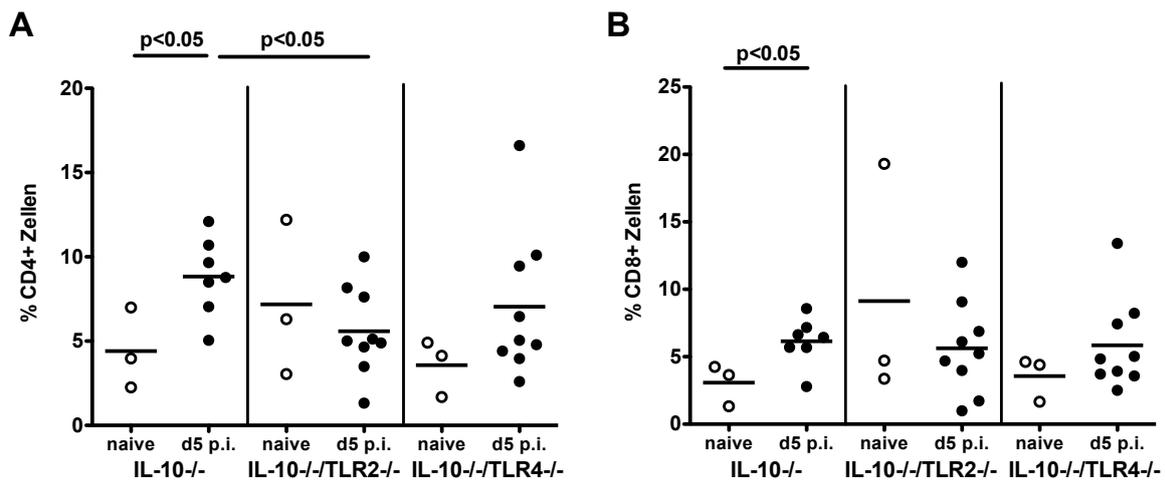


Abb. 41: Anteil CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) Zellen in der Leber naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Alle infizierten Gruppen zeigten erhöhte Werte CD11b⁺/Gr1⁺ Zellen im Vergleich zu den naiven Genotypen. Innerhalb der infizierten Gruppen konnten zudem bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tieren erhöhte Anteile der CD11b⁺/Gr1⁺ Zellpopulation im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 42 A). Bei allen infizierten Tieren konnte eine Reduktion des Anteil NK1.1⁺ Zellen im Vergleich zu den naiven Mäusen gezeigt werden (Abb. 42 B).

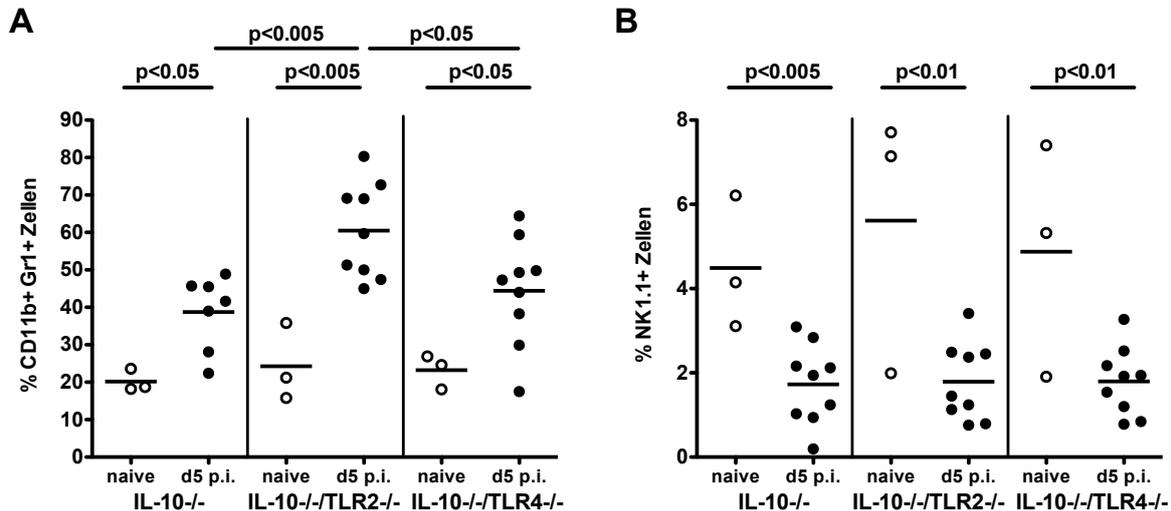


Abb. 42: Anteil CD11b⁺/Gr1⁺ (A) und NK1.1⁺ (B) Zellen in der Leber naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Die Analyse der CD4⁺/CD69⁺, CD4⁺/CD8⁺-Ratio, CD11c⁺ und TCRγδ⁺ Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

4.2.11 Durchflusszytometrische Analyse der IEL

Durch die Analyse der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) wurde eine signifikante Reduktion der NK1.1⁺ und TCRγδ⁺ Zellen in der Gruppe der infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen nachgewiesen (Abb. 43 A und B). Die Analyse des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten zeigte eine Erhöhung bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen (Abb. 43 C). Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD4⁺, CD4⁺/CD69⁺, CD8⁺, CD11c⁺ und CD11b⁺/Gr1⁺ Zellpopulationen ergab keine Unterschiede zwischen infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen (nicht dargestellt). Ein Vergleich zu naiven Tieren konnte aufgrund einer zu geringen Tierzahl nicht vorgenommen werden.

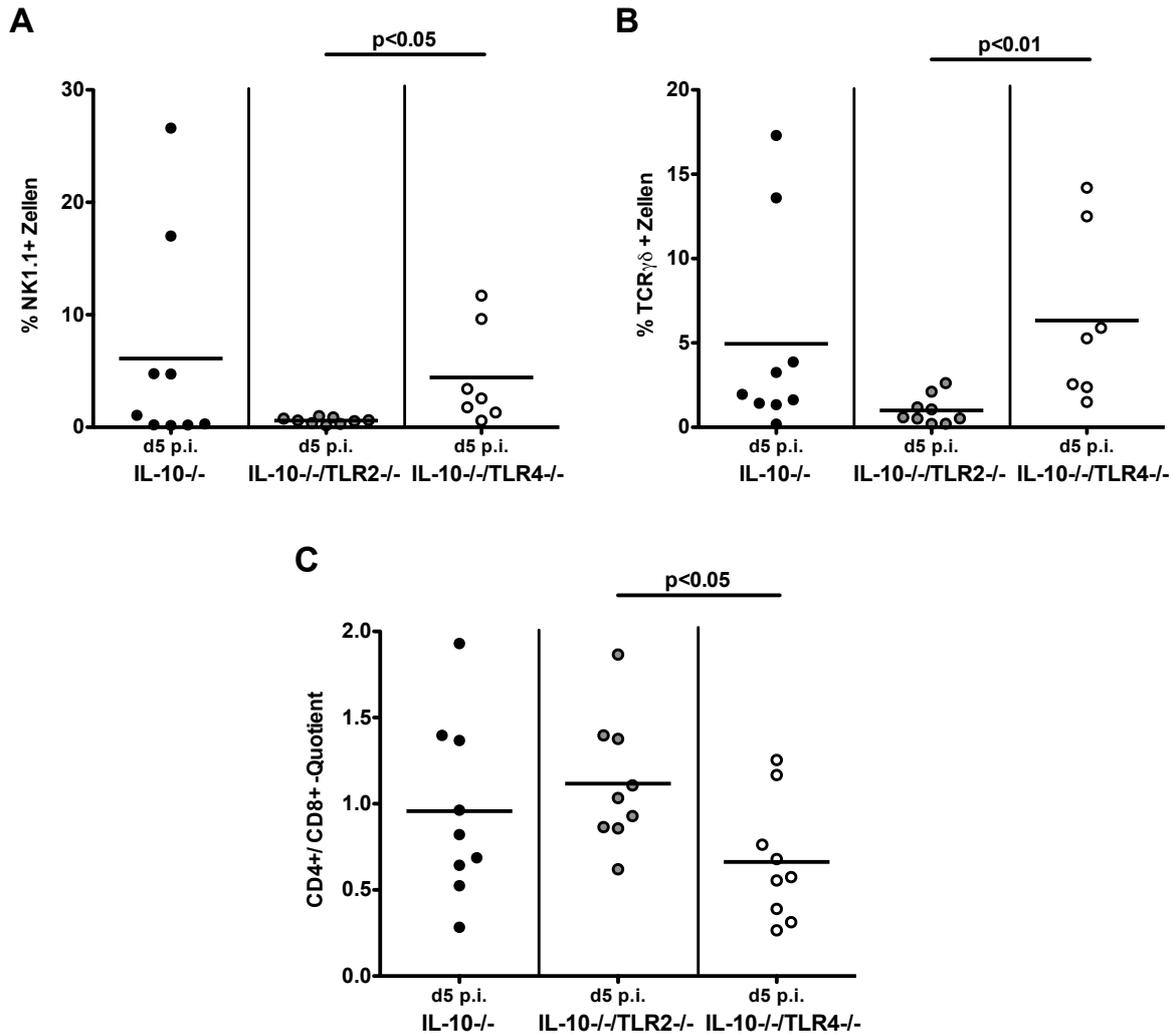


Abb. 43: Anteil NK1.1⁺ (A) und TCRγδ⁺ (B) Zellen und CD4⁺/CD8⁺ -Quotient (C) der Intraepithelialen Lymphozyten infizierter IL-10^{-/-} (schwarze Kreise), IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} (graue Kreise) und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der LPL

Die Lymphozyten der Lamina propria bekämpfen Erreger, die die Epithelbarriere überwunden haben. Die Infektion mit *C. jejuni* verursachte bei den IL-10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen einen Anstieg CD8⁺, CD11c⁺ und CD11bGr1⁺ Zellen in den Lymphozyten der Lamina propria (Abb. 44 A-C).

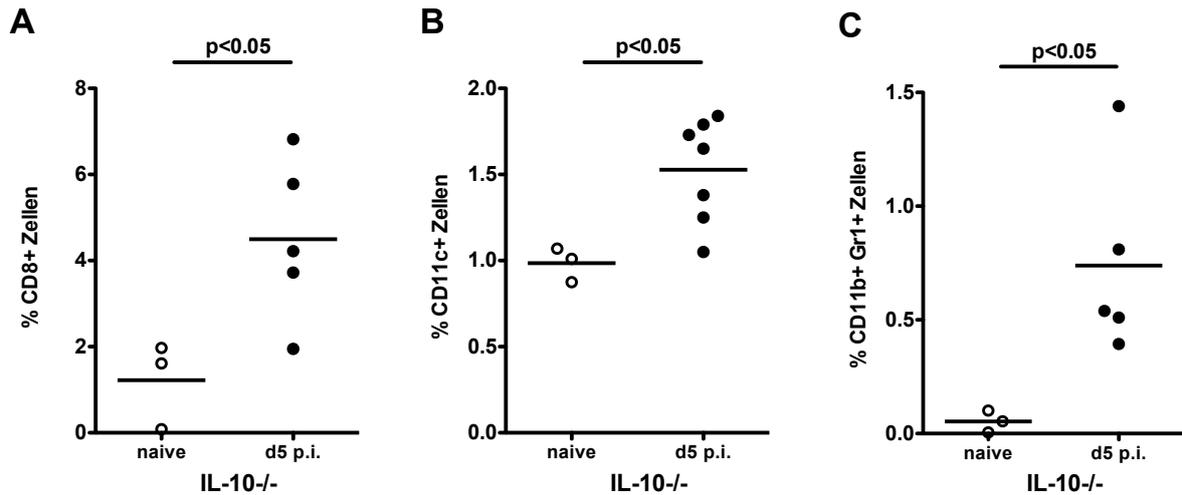


Abb. 44: Anteil $CD8^+$ (A), $CD11c^+$ (B) und $CD11b^+/Gr1^+$ (C) Zellen der Lymphozyten der Lamina propria naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) $IL-10^{-/-}$ Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

Infizierte $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Tiere wiesen mehr $CD11c^+$ Zellen auf als infizierte $IL-10^{-/-}$ Tiere (Abb. 45 A). Ebenso lag die Zahl $CD11b^+/Gr1^+$ Zellen bei den infizierten $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Gruppen über der der infizierten $IL-10^{-/-}$ Gruppe (Abb. 45 B). Unterschiede bei den $CD4^+$, $CD4^+/CD69^+$, $TCR\gamma\delta^+$ und $NK1.1^+$ Zellpopulationen und des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten konnten nicht festgestellt werden (nicht dargestellt). Die Analyse der LPL naiver $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ Mäuse konnte aufgrund fehlender Tierzahlen nicht durchgeführt werden.

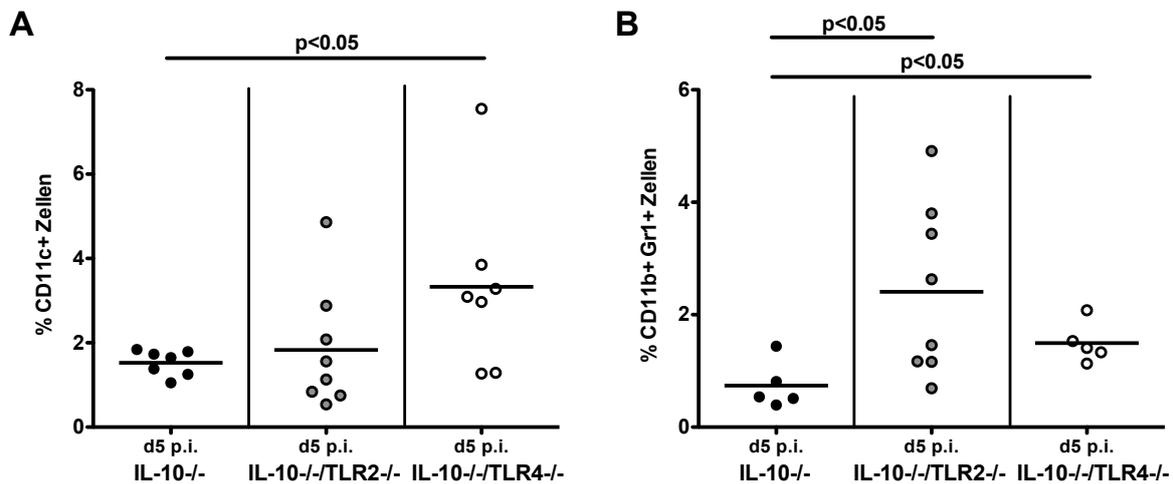


Abb. 45: Anteil $CD11c^+$ (A) und $CD11b^+/Gr1^+$ (B) Zellen der Lymphozyten in der Lamina propria infizierter $IL-10^{-/-}$ (schwarze Kreise), $IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-}$ (graue Kreise) und $IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-}$ (weiße Kreise) Mäuse. Angegeben sind Mittelwert und Signifikanzniveaus von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere.

4.2.13 Veränderung der *E. coli*-Konzentration durch die Infektion

Um zu überprüfen, ob die Infektion mit *C. jejuni* die Konzentration von *E. coli* im Colon der Mäuse verändert, wurden die *E. coli*-Konzentrationen aus dem Coloninhalt an Tag 5 p.i. bestimmt und mit den Daten der naiven Tiere verglichen. Der Median der *E. coli*-Konzentration im Colon infizierter IL-10^{-/-} Mäuse zeigte keinen signifikanten Unterschied zu naiven IL-10^{-/-} Mäusen. Es konnte jedoch bei mehr naiven als infizierten IL-10^{-/-} Mäusen *E. coli* im Colon nachgewiesen werden. Bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen konnte im Vergleich zu den jeweiligen naiven Genotypen eine signifikante Verminderung der *E. coli*-Konzentration belegt werden (Abb. 46). Zudem zeigte sich innerhalb der infizierten Mauspopulationen eine signifikant höhere *E. coli*-Konzentration bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen.

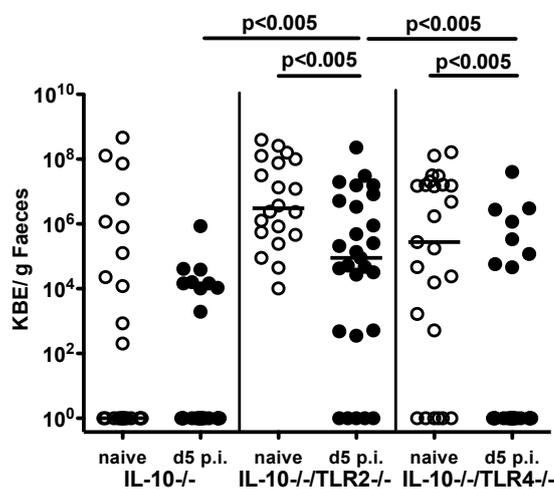


Abb. 46: Quantifizierung von *E. coli* an Tag 5 aus dem Coloninhalt naiver (weiße Kreise) und infizierter (schwarze Kreise) IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Angegeben sind der Median und Signifikanzniveaus von 6 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (n=20-28). Die Anzahl der Symbole entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzniveaus der naiven Tiere untereinander sind nicht angegeben (diese sind in Abschnitt zu finden 4.1 zu finden).

4.2.14 Bakterielle Translokation in MLN, Leber, Milz, Niere und Blut mit *C. jejuni* infizierter Mäuse

Insgesamt kam es bei den infizierten Tieren häufiger zur Translokation von Bakterien als bei den naiven. Dabei traten innerhalb der infizierten IL-10^{-/-} Gruppe in 72,2% (13/18 Tiere) der Fälle Laktobazillen, Enterokokken und *E. coli* in die MLN der Tiere über. Bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen gelangten in 68,4% (13/19) Laktobazillen, Enterokokken, *E. coli*, *Bacteroides/Prevotella* und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen in die MLN. Die Translokationsrate in die MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse lag mit 47,1% (8/17) unter der der

anderen beiden Genotypen. Bei den beteiligten Spezies handelte es sich um Laktobazillen, Enterokokken und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen.

Zur Translokation in die Leber kam es bei 16,7% (3/18) der IL-10^{-/-} Tiere und dem Übertritt von Laktobazillen und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen. In der Gruppe der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Tiere translozierten Laktobazillen, Enterokokken und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen in 21,1% (4/19) der Fälle in die Leber. In diesem Organ zeigten die IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere mit 47,1% (8/17) die höchste Translokationsrate. Es wurden Laktobazillen, Enterokokken, *Bacillus* sp. und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen nachgewiesen. In 16,7% (3/18) konnte eine Translokation in die Milz der IL-10^{-/-} Mäuse belegt werden. Dabei handelte es sich um Laktobazillen und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen. Mit 26,3% (Laktobazillen, Enterokokken, *E.coli* und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen.) zeigte sich bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen die höchste Translokationsrate in der Milz. Die IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse lagen mit einer Translokation von 9,1% (3/17) unter den beiden vorgenannten. Es konnten Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen identifiziert werden. In 3 von 18 Fällen (16,7%) translozierten Laktobazillen in die Nieren der IL-10^{-/-} Gruppe. Bei doppelt so vielen Tieren (6/19; 31,6%) der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Gruppe konnten Laktobazillen, Enterokokken, *E. coli* und Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen nachgewiesen werden. In die Nieren der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Gruppe traten in 3 von 17 Fällen (17,6%) Bakterien der Clostridium/ Eubacterium-Gruppen über.

Es konnte keine Translokation in das Blut der Tiere festgestellt werden.

Tabelle 17: Unterschiede zwischen infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen. * p<0.05, ** p<0.01 und *** p< 0.005 IL10^{-/-} vs. IL10-TLR2^{-/-}; † p<0.05, †† p<0.01 und ††† p<0.005 IL10^{-/-} vs. IL10-TLR4^{-/-}; ^a p<0.05, ^{aa} p<0.01 und ^{aaa} p<0.005 IL10-TLR2^{-/-} vs. IL10-TLR4^{-/-}; ° p<0.05, °° p<0.01 und °°° p<0.005 naiv vs. infiziert gleichen Genotyps; - keine Veränderungen vs. naiven Genotyp. Angegeben sind Mittelwert bzw. Median (*kursiv*) ± Standardabweichung. IHC - Immunhistochemie.

	IL-10 ^{-/-} (+ <i>C. jejuni</i>)	IL-10 ^{-/-} /TLR2 ^{-/-} (+ <i>C. jejuni</i>)	IL-10 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-} (+ <i>C. jejuni</i>)	Unterschied zum jew. naiven Genotyp
<i>C. jejuni</i>-Konzen.				
- Faeces, d3 p.i.	5 x 10 ⁴ ± 6 x 10 ⁷ **	8 x 10 ⁵ ± 5 x 10 ⁷ ** aa	1 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ⁶ aa	
- Faeces, d4 p.i.	1 x 10 ⁴ ± 8 x 10 ⁶	3 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ⁷	5 x 10 ³ ± 4 x 10 ⁶	
- Colon, d5 p.i.	6 x 10 ³ ± 7 x 10 ⁷ **	5 x 10 ⁴ ± 4 x 10 ⁷ ** aa	4 x 10 ³ ± 1 x 10 ⁷ aa	
Colon				
- pH	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,3	
- länge (cm)	9,2 ± 1 [†]	9,4 ± 0,9	9,8 ± 0,6 [‡]	
Scores				
- Klinisch (d0)	2,4 ± 1,9 [‡]	2,7 ± 1,9 ^{aa}	0,8 ± 0,6 ^{‡ aa}	
- Klinisch (d3 p.i.)	3,3 ± 1,8	23,2 ± 1,9	1,8 ± 1,9	
- Klinisch (d5 p.i.)	3,6 ± 2,1	3 ± 2,2	2,7 ± 2,1	
- Histopatholog.	2,4 ± 0,7	2,8 ± 0,6 ^a	2,2 ± 0,7 ^a	
IHC (Zellen/ Gesichtsfeld)				
- Caspase3 ⁺	14,7 ± 8,2	18,2 ± 6,4 [°]	15,7 ± 12,4	- / ° / -
- Ki67 ⁺	347,1 ± 71,2 [‡]	298,2 ± 74,9 ^{°°}	245,4 ± 69,1 ^{‡°}	- / °° / °
- CD3 ⁺	176,2 ± 42,6 [‡]	194,5 ± 29,4 ^{aaa}	142,7 ± 17 ^{‡ aaa}	- / - / -
- B220 ⁺	34,6 ± 14,7 ^{‡°}	34 ± 11,4 ^{a °}	20,1 ± 11 ^{‡ a °}	° / ° / °
- Foxp3 ⁺	51 ± 15,8	51,8 ± 11,9 [°]	70,9 ± 43 [°]	- / ° / °
Zytokinkonzentration (pg/ mg Colon)				
- IFN γ	0,8 ± 0,6* †	0,3 ± 0,2*	0,2 ± 0,1 [‡]	
- IL-12p70	0,03 ± 0,03*	0,002 ± 0,005*	0,01 ± 0,02	
- MCP-1	2,2 ± 2	1,4 ± 0,9	1,7 ± 2	
- NO	9 ± 6,1 ^{°°}	11,5 ± 15,5	13,2 ± 11,3	°° / - / -
- TNF α	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1 [°]	0,3 ± 0,3	- / ° / -
- IL-6	3 ± 2,7 [°]	1,3 ± 1 [°]	3,5 ± 3,6 [°]	° / ° / °
- IL-22	2,3 ± 2	1,4 ± 1,2	0,8 ± 0,7	

mRNA-Expression

(Normal. Ratio)

- IFN γ	0,01 \pm 0,01 ^o	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	o / - / -
- TNF α	0,3 \pm 0,1 ^{‡ooo}	0,6 \pm 0,5	0,9 \pm 0,6 [‡]	ooo / - / -
- IL-6	0,07 \pm 0,05 ^{ooo}	0,05 \pm 0,01	0,1 \pm 0,2	ooo / - / -
- IL-22	2,1 \pm 2,7	0,8 \pm 0,6	1,5 \pm 1,6	
- IL-23	2,8 \pm 1,7 ^o	3,1 \pm 0,9	4 \pm 2,3	o / - / -
- IL-18	1,6 \pm 0,8 ^{‡ooo}	2,4 \pm 1,1 ^o	3 \pm 1,3 ^{‡o}	ooo / o / o
- MUC2	3,1 \pm 2,3 ^o	7,1 \pm 3,4 ^o	6,1 \pm 3,4 ^{ooo}	o / o / ooo

FACS-Analyse

MLN (%/ + Zellen)

- CD4	30,5 \pm 6,2*	23 \pm 7,3* aa	32,2 \pm 7,9 ^{aa o}	- / - / o
- CD4/CD69	6,1 \pm 1,4	6,4 \pm 1,6	6,5 \pm 1,6	
- CD8	25 \pm 3,6	21,6 \pm 6,7 ^a	27 \pm 4,9 ^a	
- CD4/CD8-Quot.	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,6	1,2 \pm 0,3 ^{oo}	- / - / oo
- CD11c	0,8 \pm 0,6 ^{‡‡‡}	0,9 \pm 0,6 ^{aaa}	2,4 \pm 1 ^{‡‡‡ aaa ooo}	- / - / ooo
- CD11bGr1	2,6 \pm 1,8 ^{‡‡‡}	2,5 \pm 2,4 ^a	0,8 \pm 0,4 ^{‡‡‡ a ooo}	- / - / ooo
- B220	20 \pm 4,3 [‡]	22,2 \pm 9,5 ^a	16,1 \pm 3,5 ^{‡ a ooo}	- / - / ooo
- NK1.1	0,3 \pm 0,3	1 \pm 1	0,5 \pm 0,5	

FACS-Analyse Milz

(%/ + Zellen)

- CD4	9,7 \pm 3,7 [‡]	10,1 \pm 2,4 ^{a o}	19,6 \pm 10,6 ^{‡ a o}	- / o / o
- CD4/CD69	2,1 \pm 1,4 ^{‡‡‡}	2,2 \pm 1,4 ^{aaa}	5,4 \pm 1,6 ^{‡‡‡ aaa o}	- / - / o
- CD8	6,1 \pm 1,7 ^{‡‡‡}	6,4 \pm 2,7 ^{aaa}	12,7 \pm 4,5 ^{‡‡‡ aaa oo}	- / - / oo
- CD4/CD8-Quot.	1,8 \pm 0,4	1,7 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	
- CD11c	1,3 \pm 0,3* ^{‡‡‡}	1,8 \pm 0,4* ^{aaa}	2,8 \pm 0,4 ^{‡‡‡ aaa}	
- CD11bGr1	25,8 \pm 11,2 ^{‡‡‡}	23 \pm 12,8 ^a	13,5 \pm 5,5 ^{‡‡‡ a o}	- / - / o
- B220	25,4 \pm 11,6	28,2 \pm 6,9	21,9 \pm 10,3	
- NK1.1	3,4 \pm 2,8 ^{‡‡‡}	2,8 \pm 3,1 ^a	205 \pm 0,4 ^{‡‡‡ a ooo}	- / - / ooo

FACS-Analyse

Leber (%/ + Zellen)

- CD4	8,8 \pm 2,2* ^o	5,6 \pm 2,5*	7 \pm 4,1	o / - / -
- CD4/CD69	0,8 \pm 0,6	0,9 \pm 1,2	0,7 \pm 0,4	
- CD8	6,1 \pm 1,6 ^o	5,6 \pm 3,2	5,8 \pm 3,2	o / - / -
- CD4/CD8-Quot.	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 1,2	1,3 \pm 0,6	
- CD11c	2,9 \pm 1,5	2,3 \pm 0,9	3 \pm 1,7	
- CD11bGr1	38,7 \pm 9,1 ^{*** o}	60,5 \pm 12 ^{*** a ooo}	44,4 \pm 13,6 ^{a o}	o / ooo / o
- TCR $\gamma\delta$	3,6 \pm 3,9	2,3 \pm 1,8	3,5 \pm 3,4	
- NK1.1	1,7 \pm 0,9 ^{ooo}	1,8 \pm 0,9 ^{oo}	1,8 \pm 0,8 ^{oo}	ooo / oo / oo

FACS-Analyse IEL

(%/ + Zellen)

- CD4	2,7 ± 2,8	2 ± 2,6	0,8 ± 1
- CD4/CD69	1,4 ± 1,3	1,3 ± 1,5	0,7 ± 0,7
- CD8	2,8 ± 3,2	1,5 ± 1,8	0,9 ± 0,7
- CD4/CD8-Quot.	1 ± 0,5	1,1 ± 0,4 ^a	0,7 ± 0,3 ^a
- CD11c	0,6 ± 0,4	1 ± 0,9	1,5 ± 1,8
- CD11bGr1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3
- TCRγδ	4,9 ± 7,8	1 ± 0,8 ^{aa}	6,3 ± 4,7 ^{aa}
- NK1.1	6,1 ± 8,9	0,6 ± 0,3 ^a	4,4 ± 4,1 ^a

FACS-Analyse LPL

(%/ + Zellen)

- CD4	6,7 ± 5,6	5,3 ± 4,8	4,2 ± 3,9	
- CD4/CD69	6,3 ± 3,5	6,5 ± 4,9	5,6 ± 4,6	
- CD8	4,5 ± 1,7 ^o	3,6 ± 3,3	3,6 ± 2,8	o / - / -
- CD4/CD8-Quot.	1,3 ± 0,3	2,4 ± 2,2	1,1 ± 0,4	
- CD11c	1,5 ± 0,3 ^{‡o}	1,8 ± 1,4	3,3 ± 2 [‡]	o / - / -
- CD11bGr1	0,7 ± 0,4 ^{*‡o}	2,4 ± 1,4 [*]	1,5 ± 0,3 [‡]	o / - / -
- TCRγδ	1 ± 0,5	2,7 ± 2,4	2,6 ± 2,9	
- NK1.1	1,5 ± 2,1	2,4 ± 2,3	6,1 ± 2,3	

***E. coli* (KBE/ g**

Faeces) $1 \pm 9 \times 10^7$ ^{*** ‡} $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^8$ ^{***} $2 \times 10^5 \pm 3 \times 10^7$ [‡]

Translokation/

Tier (%)

- MLN	13/18 (72,2 %)	13/19 (68,4 %)	8/17 (47,1 %)
- Leber	3/18 (16,7 %)	4/19 (21,1 %)	8/17 (47,1 %)
- Milz	0/18 (0 %)	1/19 (6,7 %)	3/17 (15 %)
- Niere	1/18 (5 %)	1/19 (6,7 %)	3/17 (15 %)
- Blut	0/18 (0 %)	0/19 (0 %)	0/17 (0 %)

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 im murinen IL-10^{-/-}-Modell

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn werden von einer Zytokin-vermittelten Entzündung im Gastrointestinaltrakt hervorgerufen.⁵ Die Pathogenese ist nicht eindeutig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass es zu einer überschießenden Immunantwort gegen die Darmflora in genetisch prädisponierten Individuen kommt.¹ Die TLR detektieren molekulare Bestandteile von Darmbakterien und können je nach Zelltyp, anatomischer Lokalisation und Rezeptor auf unterschiedliche Weise reagieren.⁶¹

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TLR2 und TLR4 in der Immunantwort und Immunpathologie im murinen IL-10^{-/-}-Colitis-Modell untersucht. Da das Wirkungsspektrum der TLR sehr breit gefächert ist, kann ein Verlust dieser Rezeptoren auf verschiedene Weise zur Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen beitragen.^{58,65,70} Mögliche Mechanismen sind dabei Störungen der Darmbarriere, die Induktion von Apoptose und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, verminderte Geweberegeneration, reduzierte Produktion von Defensinen, Intoleranz gegenüber Nahrungs-Antigenen, bakterielle Translokation und Dissemination und eine gestörte Kooperation mit dem adaptiven Immunsystem.¹⁴⁵ Einige dieser Aspekte konnten in dieser Arbeit analysiert werden.

Da es in IL-10^{-/-} Tieren bei gleichzeitiger TLR4-Defizienz zu einem milderem Verlauf der Colitis kommt, weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass bakterielles LPS über TLR4 die Darmentzündung aggraviert. Dieser Befund bestätigt aktuelle Untersuchungen von Messlik und Mitarbeitern, die in Kooperation mit unserer Forschungsgruppe identische Beobachtungen gemacht haben.⁶⁹ Die Beurteilung des klinischen Zustandes der Mäuse im Alter von 4-5 Monaten zeigte, dass es den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen signifikant besser ging als den anderen beiden Genotypen. Zudem war das Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse signifikant länger als das der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. Eine Entzündung bewirkt eine Verkürzung der Darmlänge und damit eine Reduktion der Resorptionsfläche, wodurch sich wiederum die Energiegewinnung aus der Nahrung verschlechtert. Der bessere klinische Zustand sowie das längere Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen weisen darauf hin, dass das LPS Gram-negativer Darmbakterien über TLR4 die Entzündung in diesem Modell verstärkt.

Histologisch zeigte sich bei den IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen eine im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Tieren signifikant stärkere Pathologie. Ein höherer histopathologischer Score wurde bei IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen festgestellt. Somit ist anzunehmen, dass die Aktivierung von TLR2 durch

Liganden aus der Darmflora die Inflammation supprimiert. Cario und Mitarbeiter⁶⁴ konnten zeigen, dass durch TLR2-Aktivierung die Epithelbarriere des Darmes aufrechterhalten wird und es zur Produktion der anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF β kommt. Dies sind zwei positive Wirkungen, die bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen entfallen. In einer umfassenden Studie in Maus-Modellen für chronische Colitis konnten weder protektive noch pathogene Wirkungen für TLR2 nachgewiesen werden.¹⁴⁶ Hierbei wurde jedoch nicht das Modell der IL10^{-/-} Maus untersucht. Als Teil unserer eigenen Vorarbeiten konnten Messlik⁶⁹ und Mitarbeiter keine Unterschiede in der Histopathologie bei IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im IL-10^{-/-}-Colitis-Modell nachweisen. Diese Diskrepanz ist durch das unterschiedliche Alter und Geschlecht der Tiere bedingt.¹⁴⁷

Da die Pathologie der IL-10^{-/-}-Colitis von T-Zellen vermittelt wird^{17,18}, wurden CD3⁺ T-Zellen im Colon immunhistochemisch gefärbt und quantitativ analysiert. Bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen konnten signifikant mehr CD3⁺ Zellen nachgewiesen werden als bei den Vergleichsgruppen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Erfassung des histopathologischen Scores. Im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant weniger B-Zellen nachgewiesen. B-Zellen sind nicht essentiell an der Pathogenese der IL-10-Colitis beteiligt.²² Sie sind weniger als Effektorzellen, die einen Gewebeschaden verursachen, sondern eher als Marker für die Aktivierung des Immunsystems anzusehen. Somit ist das Immunsystem im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen weniger stark aktiviert. Daraus ist zu schließen, dass bakterielles LPS via TLR4 die Entzündung verstärkt.

IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl MPO7⁺ Granulozyten im Colon auf. Dies beweist, dass Granulozyten ebenfalls an der Immunreaktion im IL-10^{-/-}-Modell beteiligt sind. Innerhalb der IL-10^{-/-}-Colitis-Gruppen zeigte sich zudem ein erhöhter Anteil von Granulozyten bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Mäusen. Diese Zellpopulation führt zu erhöhtem oxidativen Stress, der auch das Colonepithel schädigen kann.¹⁴⁸ Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse des histopathologischen Scores.

Die Foxp3-Expression in T-Zellen wird hauptsächlich durch IL-10 aufrechterhalten.¹⁴⁹ Im Colon der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich Foxp3. Da die untersuchten Tiere kein IL-10 produzieren, können Effekte der TLR2 und TLR4 bezüglich der Foxp3-Expression in diesem Modell nicht untersucht werden. Die Anzahl Foxp3⁺ Zellen im Colon der entzündeten Tiere lag dennoch über der der Wildtyp-Tiere,

weswegen andere Mechanismen der Foxp3-Induktion im Rahmen der Entzündung herangezogen werden müssen, wie z.B. durch CD103⁺ dendritische Zellen.¹⁵⁰

Die Colitis bewirkt einen verstärkten Untergang von Epithelzellen, der eine vermehrte Zellproliferation nach sich zieht.²¹ Gesunde Wildtyp-Mäuse wiesen im Vergleich zu allen Colitis-Mäusen sowohl mehr Caspase3⁺ apoptotische als auch mehr Ki67⁺ proliferierende Zellen im Colon auf. Sowohl IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} als auch IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigten eine verminderte Anzahl proliferierender Zellen im Colon. Da Ligandenbindung der TLR in den intestinalen Epithelzellen zu vermehrter Proliferation führt, fehlt dieser Stimulus bei den TLR-defizienten Tieren.⁶⁰ Im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden weniger apoptotische Zellen nachgewiesen als im Colon der IL10^{-/-} Mäuse. Dies bestätigt Untersuchungen bei IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen, wonach durch eine Western-Blot-Analyse bei IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen keine Caspase3 in den Epithelzellen des Colons nachgewiesen werden konnte.⁶⁹

In der vorliegenden Arbeit wurden im Colon naiver IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse verminderte Konzentrationen von IL-12p70 und IFN γ nachgewiesen. Diese Zytokine vermitteln eine Th1-basierte Immunantwort, die sowohl beim Morbus Crohn des Menschen als auch bei der murinen IL-10^{-/-}-Colitis an der Pathogenese beteiligt sind.^{23,24} Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entzündung durch eine Aktivierung von TLR4 verstärkt wird. Bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen bestand eine ähnliche Th1-Antwort wie bei den Kontrolltieren.

NO wird von NO-Synthasen in Epithel- und Immunzellen konstitutiv und induzierbar produziert. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass bei chronischen Formen der Colitis die induzierbare NO-Synthase hochreguliert wird und eine Inhibition dieses Enzyms eine Reduktion der Gewebeschädigung bewirkt.¹⁵¹ Die statistisch signifikant erhöhte NO-Konzentration im Colon der IL-10^{-/-} Mäuse deutet auf eine höhere Produktion dieses zytotoxisch wirkenden Gases und eine Beeinträchtigung der Integrität der Mukosa bei den IL-10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen.

IL-6 wird von Antigenpräsentierenden Zellen und CD4⁺ T-Zellen sowie von Epithelzellen und Myofibroblasten gebildet. Es induziert die Bildung von Akute Phase-Proteinen und besitzt weitere pro-inflammatorische Effekte.¹⁵² Das Fehlen von IL-6 sowie die Blockade des IL-6-Signalwegs führt im murinen Modell zu einer Abschwächung der Colitis.^{142,153} Über den IL-6-*trans*-Signalweg bewirkt es bei Morbus Crohn-Patienten eine Resistenz der T-Zellen gegenüber Apoptose.¹⁵⁴ Auf diese Weise trägt es zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung im Darm bei. IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen eine erhöhte IL-6-Konzentration im Darm auf. Somit bestand bei diesen Mäusen eine verstärkte

entzündliche Aktivität. In der akuten Entzündung führt IL-6 auch zur Aktivierung epithelialer Reparaturmechanismen.¹⁵⁵ Im chronischen Kontext des IL10^{-/-} Modells muss IL-6 jedoch als pro-inflammatorischer Faktor gesehen werden.

Auch TNF α wirkt pro-inflammatorisch und wurde in erhöhter Konzentration in entzündeten Darmabschnitten von CED-Patienten nachgewiesen.¹³ Anti-TNF α -Antikörper bewirken bei einigen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten eine Reduktion der Entzündung.¹⁵⁶ Die erhöhten TNF α -Konzentrationen im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse unterstützen das Bild der stärkeren Entzündung bei dieser Mauspopulation im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen.

IL-6 und TNF α führen zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gebiet. Die erhöhte Konzentration dieser Zytokine im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse steht in Einklang mit der dort ebenfalls signifikant erhöhten Zahl MPO7⁺ neutrophiler Granulozyten. Die erhöhte Zahl dieser Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in der Colonmukosa der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse deuten auf gesteigerten oxidativen Stress¹⁴⁸ und eine dadurch geschwächte Epithelbarriere. Zusätzlich war die Konzentration des Chemokins MCP-1 im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse erhöht. Auch in der inflammatorisch-aktiven Mukosa von CED-Patienten wurde eine erhöhte MCP-1-Expression nachgewiesen.¹⁵⁷ Bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen bestand ein gesteigertes Vermögen, Makrophagen in entzündete Gewebe zu rekrutieren. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Produktion pro-inflammatorisch wirkender Zytokine. Die erhöhten IL-6-, TNF α - und MCP-1-Konzentrationen sowie T-Zellen und Granulozyten-Populationen im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse stützen die Erkenntnis, dass die Detektion von TLR2-Liganden aus der Darmflora zu einer Reduktion der Entzündung führt.

Die IL-22-Konzentration im Colon war bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen erhöht. IL-22 wird vor allem von Th17-Zellen, aber auch von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen^{137,158} gebildet. Die IL-22-Konzentration ist in entzündeter Colonmukosa von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zu gesunder Colonmukosa erhöht.^{136,159} Es fördert zum einen die Entzündung indem es Darmepithelzellen und subepitheliale Myofibroblasten des Colons zur Produktion pro-inflammatorisch wirkender Zytokine wie TNF α und IL-6 veranlasst.^{136,159} Zum anderen schützt es die Epithelbarriere indem es Migration und Proliferation der Darmepithelzellen anregt und Defensine aus Panethzellen sowie Mucine aus Gobletzellen freisetzt.^{160,161} Die erhöhten IL-22-Werte im Colon der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse deuten auf ein erhöhtes entzündliches Geschehen bei diesen Tieren. Über die Stimulation der Produktion von IL-6 und TNF α kann IL-22 die Entzündung verstärken. Eine reaktive Hochregulierung aufgrund der stärkeren Entzündung und

ein Beitrag zur Regeneration des Epithels bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der IFN γ -, TNF α -, IL-6- und IL-22-mRNA-Expression zeigte nicht die gleichen Ergebnisse wie die Konzentrationsbestimmung dieser Zytokine auf Proteinebene. Die mRNA vieler pro-inflammatorischer Mediatoren ist kurzlebig. Sie wird stabilisiert und effektiv translatiert, wenn die Zellen mit TLR-Liganden, wie LPS und CpG stimuliert werden.¹⁶² Dennoch ist die IFN γ -, TNF α -, IL-6- und IL-22-mRNA-Expression der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöht. Dies zeigt, dass diese pro-inflammatorischen Zytokine an der Vermittlung der Darmentzündung im IL-10^{-/-}-Colitis-Modell beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied der MUC2-mRNA-Expression zwischen Wildtyp und IL-10^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit einer Arbeit von Schwerbrock⁴¹, bei der SPF IL-10^{-/-} Mäuse im 129-Sv/Ev-Hintergrund verglichen mit SPF Wildtyp-Tieren im BALB/c-Hintergrund gleiche MUC2-Syntheseniveaus zeigten. Da MUC2 von Becherzellen im Colon produziert wird und in die Bewertung der Histopathologie auch ein Verlust von Becherzellen miteinbezogen wurde, erwarteten wir aufgrund des höheren histopathologischen Scores der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse eine verminderte MUC2-mRNA-Synthese im Colon dieser Tiere, die jedoch nicht gezeigt werden konnte.

Pizarro¹⁶³ konnte erhöhte IL-18-Konzentrationen im Colon von Morbus Crohn-Patienten in aktivem Krankheitsstadium nachweisen. IL-18 wurde zunächst als ausschließlich pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin beschrieben.^{140,164} Neuere Studien beweisen jedoch, dass IL-18 ebenso eine wichtige protektive Rolle für intestinale Epithelzellen erfüllt. Es ist am Erhalt der Epithelintegrität beteiligt und aktiviert die Proliferation der Epithelzellen.^{141,165} IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu nicht entzündeten Wildtyp-Tieren geringere IL-18-mRNA-Konzentrationen im Colon auf. Dieses Ergebnis macht eine pro-inflammatorische Rolle für IL-18 im murinen IL-10-Colitis-Modell unwahrscheinlich. Ein Beitrag zum Erhalt der Epithelintegrität durch IL-18 ist hingegen denkbar.

IL-23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das im Colon von antigenpräsentierenden Zellen (APC) sezerniert wird. Es hemmt zum einen regulatorische T-Zellen, sodass deren Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β unterdrückt wird. Zum anderen stimuliert es Th17-Zellen, die daraufhin pro-inflammatorische Zytokine freisetzen.¹³⁹ Im Colon der IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden höhere IL-23-Konzentrationen im Vergleich zu den Wildtypen nachgewiesen, was auf eine Beteiligung dieses Zytokins an der Immunpathologie bei

diesen Tieren deutet. IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse zeigten das gleiche IL-23-Expressionsniveau wie die Wildtyp-Tiere. Somit ist IL-23 im hier verwendeten Modell an der Immunreaktion beteiligt. Die IL-23-Produktion ist dabei abhängig von der TLR2-Expression.

Die MLN stellen die erste Lymphknotenstation außerhalb des Darmes dar. Ein wesentlicher Teil der Immunreaktion spielt sich in diesem Kompartiment ab. Aktivierte APC wandern in die MLN und interagieren dort mit B- und T-Zellen. Bei Morbus Crohn Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen ein höherer Anteil von Th1- und Th17-Zellen in den MLN nachgewiesen werden.¹⁴⁴ Hinsichtlich der Th-Zellpopulation, die über die Expression von CD4 und CD4/CD69 in diesem Modell untersucht wurde, konnten zwischen den IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Der verminderte Anteil der natürlichen Killerzellen (NK1.1⁺) in den MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse unterstützt das im Colon vorgefundene Bild der milderen Colitis bei diesen Tieren. NK1.1 wird in Mäusen von NK Zellen und von NK T-Zellen exprimiert und wirkt bei mutierten und infizierten Zellen zytotoxisch.^{166,167} DC produzieren TLR-abhängig IL-12 und bewirken das Einwandern von NK Zellen in die Lymphknoten. Ihre Aktivierung führt über eine IFN γ -Produktion zur Initiierung einer Th1-Antwort.¹⁶⁸ Die niedrige IL-12-Konzentration im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse steht im Einklang mit dem verminderten Anteil natürlicher Killerzellen in den MLN dieser Tiere und weist wiederum auf eine Aggravation der Colitis durch TLR4-Aktivierung.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen ein größerer Anteil CD8⁺ T-Zellen. Dieser Unterschied wirkte sich auf den CD4⁺/CD8⁺-Quotienten aus, der bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen signifikant erniedrigt war. CD8 wird klassischerweise von zytotoxischen T-Zellen exprimiert. Es konnten jedoch auch CD8⁺ Zellen, die eine regulatorische Funktion besitzen, nachgewiesen werden.¹⁶⁹ Diese kommen in der Lamina propria von CED-Patienten vermindert vor.¹⁷⁰ Über die Existenz dieser Zellpopulation in murinen MLN ist bisher nichts bekannt. Das Vorkommen regulatorischer CD8⁺ Zellen in den MLN IL-10-defizienter Mäuse sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Ob es sich bei der analysierten Population CD8⁺ T-Zellen in den MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse um zytotoxische T-Lymphozyten handelt, ist unter Einbezug der klinischen, histologischen und Zytokinanalysen nicht eindeutig zu belegen.

In der Milz der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurde ein im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen signifikant geringerer Anteil natürlicher Killerzellen gemessen. Nach hämatogen erfolgtem Antigenstimulus kommt es zur Aktivierung von Immunzellen in der Milz. Somit ist

die systemische Immunantwort bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen weniger stark aktiviert.

Gegensätzlich dazu zeigten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse in der Milz einen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen erhöhten Anteil dendritischer und Th-Zellen. Th-Zellen werden durch IL-12 stimuliert, das von dendritischen Zellen produziert wird.¹⁷¹ Diese Ergebnisse deuten auf eine erhöhte systemische Immunantwort bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen hin, die in Widerspruch zu der geringen lokalen Entzündungsreaktion steht. Dieser Befund kann durch die Ergebnisse der bakteriellen Translokation erklärt werden. IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen die niedrigste Translokationsrate lebender Bakterien in die MLN auf. In Leber, Milz und Nieren konnten bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen jedoch häufiger Bakterien nachgewiesen werden, was eine systemische Reaktion provozieren kann.

Die Zellmarker CD11b und Gr1 kommen auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vor.¹⁷² Obwohl es bei IL-10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen zu einer höheren bakteriellen Translokation in die MLN kam, zeigten sich keine Unterschiede des Anteils neutrophiler Granulozyten in diesem Kompartiment. In der Milz der IL-10^{-/-} Mäuse konnten keine lebenden Bakterien nachgewiesen werden. Dennoch fand sich bei diesen Tieren im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen ein höherer Anteil neutrophiler Granulozyten in der Milz. Somit bewirkt das Fehlen von TLR2 bzw. TLR4 einen erniedrigten Anteil von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der Milz.

Die Darmflora verändert sich im Rahmen einer Colitis. Da Epithelzellen zugrunde gehen, können Nährstoffe nicht resorbiert werden und stehen den Bakterien im Lumen zur Verfügung. Diese vermehren sich aufgrund des erhöhten Nährstoffangebotes und es kommt zu einer veränderten Zusammensetzung der Darmflora. *E. coli* ist ein Bakterium, das davon besonders profitiert und sich rasant vermehrt.^{37,38} Hohe *E. coli*-Konzentrationen im Darm der Mäuse deuten auf eine verstärkte Entzündungsreaktion hin. Zusätzlich ist *E. coli* in der Lage die Entzündung zu stimulieren.¹⁷³ Bei allen IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen konnten mindestens 10⁴ KBE *E. coli* pro Gramm Faeces nachgewiesen werden, was für eine starke Entzündung bei diesen Tieren spricht. Darmbakterien können das Epithel durchdringen, wenn die Darmbarriere gestört ist und eine Immunreaktion in Gang setzen bzw. verstärken. Eine höhere Translokationsrate in die MLN der IL-10^{-/-} Mäuse spricht für eine stärkere Störung der Darmbarriere bei diesen Tieren. Die MUC2-Expression im Darm der IL-10^{-/-} Mäuse unterschied sich jedoch nicht von der der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse, sodass andere Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere verringert sein müssen, wie z.B. die Defensin- oder IgA-Produktion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im chronischen Colitis-Modell der IL-10^{-/-}-Maus bakterielles LPS via TLR4 zu einer verstärkten Entzündung führt während TLR2-Liganden eine mildernde Wirkung besitzen. Durch die genetisch bedingte TLR2- bzw. TLR4-Defizienz fehlen diese Rezeptoren in allen Zellen. Je nach Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, erfüllen TLR protektive Funktionen wie die Stimulation der Epithelproliferation und damit der Regeneration oder sie wirken pro-inflammatorisch.^{60,145} Durch selektives Ausschalten der betreffenden Gene z.B. ausschließlich in hämatopoetischen Zellen oder ausschließlich in Epithelzellen ist es möglich, die Funktion der TLR in den einzelnen Kompartimenten zu untersuchen.¹⁴⁶

Für das Adapterprotein MyD88 konnte gezeigt werden, dass bei fehlendem MyD88-Signal in hämatopoetischen Zellen keine *Helicobacter hepaticus*-induzierte Colitis bei vorhandenem MyD88-Signal im Epithel ausgelöst werden konnte.¹⁷⁵ Diese Studie wird durch Ergebnisse gestützt, nach denen die chronische Entzündung im Modell der IL10^{-/-} Maus durch Aktivierung von NF-κB hauptsächlich in myeloiden Zellen und nicht in Epithelzellen vermittelt wird.¹⁷⁶ Auch für die TLR2 und TLR4 erscheint eine Untersuchung der Funktion in den einzelnen Zellkompartimenten sinnvoll, um die Pathogenese der Colitis aufklären und Therapieansätze entwickeln zu können.

5.2 Von *C. jejuni* hervorgerufene Veränderungen im murinen IL10^{-/-}-Modell

Nach gastrointestinalen Infekten kommt es zu einer erhöhten Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Menschen.^{102,103} Des Weiteren konnten Durchfallerreger im Stuhl von CED-Patienten mit aktivem Krankheitsgeschehen nachgewiesen werden.^{104,106} Um die Auswirkungen eines Darmpathogens auf eine bestehende Colitis zu untersuchen, wurden IL-10^{-/-} Mäuse mit *C. jejuni* infiziert. Dieser Erreger wurde gewählt, da er weltweit als einer der häufigsten bakteriellen Durchfallerreger gilt.¹⁷⁷ Es gibt nur wenige Tiermodelle, in denen die Immunantwort gegen *C. jejuni* untersucht werden kann (siehe 1.8). Mäuse, denen das TLR-Adapterprotein MyD88 fehlt¹²⁸, sind empfänglich für eine *C. jejuni*-Infektion. Hieraus ergibt sich, dass TLR-Signalwege wichtig für die Begrenzung dieser Infektion sind. *C. jejuni* exprimiert Liganden für TLR2 und TLR4, wie das Lipoprotein JlpA und LOS.^{178,179} Es gibt jedoch beträchtliche Strukturunterschiede z.B. der LOS zwischen den verschiedenen Stämmen sowie innerhalb eines Stammes.^{180,181} Die Veränderung der exprimierten Oberflächenstrukturen ist eine wichtige Strategie für das Bakterium, um dem Immunsystems des Wirts zu entgehen und sich seiner Umwelt anzupassen. Dadurch ist es möglich, dass nicht alle *C. jejuni* Typen in der Lage sind, als TLR4-Agonisten zu fungieren. Die Ergebnisse zur Aktivierung von TLR durch *C.*

jejuni gehen in der Literatur auseinander.^{113,122,181,182} Um die Funktion der TLR im Rahmen von *C. jejuni*-Infektionen in diesem Modell zu untersuchen, wurden neben IL-10^{-/-} Mäusen auch IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse infiziert. Durch den Vergleich der infizierten und naiven Mäuse sowie der infizierten Tiere untereinander ist es möglich, Erkenntnisse zur Rolle von TLR2- bzw. TLR4-Liganden im Rahmen der Immunantwort gegenüber *C. jejuni* zu gewinnen. *C. jejuni* konnte nach Infektion der IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Faeces der Tiere über mehrere Tage hinweg nachgewiesen werden. Dabei kam es im Median zu einer vergleichbaren Konzentration von *C. jejuni* im Colon der IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tiere. IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse wiesen eine an Tag 3 und 5 p.i. signifikant erhöhte *C. jejuni*-Konzentration im Colon auf. Diese war jedoch an Tag 4 p.i. nicht nachweisbar und ist aufgrund des geringen Unterschiedes von maximal einer logarithmischen Stufe nicht als biologisch relevant anzusehen. Bei den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen verminderte sich die Anzahl der Tiere, bei denen *C. jejuni* nachgewiesen werden konnte von d3 bis d5 p.i.. Auch die mediane Konzentration nahm ab. Die Ursache dafür ist nicht geklärt, kann jedoch in der Kolonisationsresistenz durch die Darmflora begründet liegen. Bei Wildtyp-Tieren kommt es nicht zu einer *C. jejuni*-Kolonisation, während bei IL-10^{-/-} eine durch die Entzündung veränderte Darmflora vorliegt¹³⁰, die eine vorübergehende Kolonisation ermöglicht. Auch Mäuse mit einer reduzierten Diversität der Darmflora können von *C. jejuni* kolonisiert werden.¹³¹

Die Bewertung des Colons der infizierten Tiere mit dem OVA-Colitis-Score erbrachte im Vergleich mit den naiven Tieren keinen Unterschied. Mansfield und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass IL-10^{-/-} Mäuse nach Infektion mit *C. jejuni* erkranken und histologisch Pathologien erkennbar sind.¹³⁰ Obwohl der OVA-Score einige Aspekte des histologischen Scores aus der Arbeit von Mansfield¹³⁰ umfasst, konnte bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäusen kein Anstieg des Scores festgestellt werden. So wie bei den naiven Tieren, wurden auch bei den infizierten Tieren die IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse mittels OVA-Score signifikant besser bewertet als die IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen im Colon signifikant weniger CD3⁺ T-Zellen auf als IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} sowie IL-10^{-/-} Mäuse. Da die Immunantwort gegen *C. jejuni* auch von Th1-Zellen vermittelt wird¹²⁴, scheint es bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen zu einer weniger starken Immunreaktion zu kommen. Diese Aussage lässt sich jedoch nicht ohne Einschränkungen machen, da sich die Anzahl der T-Zellen zwischen infizierten und naiven Mäusen nicht signifikant unterschieden hat. Die klinische Beurteilung der Tiere zeigte bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen eine signifikante Verschlechterung und weist eher auf eine negative Wirkung der TLR4-Defizienz bei *C. jejuni*-Infektion hin, wobei es den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im naiven Zustand besser ging als den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen.

Bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen zeigte sich ein Anstieg der apoptotischen Zellen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen. Somit führt das Fehlen von TLR2 zu vermehrter Apoptose bei *C. jejuni*-Infektion. Friis¹²¹ konnte nachweisen, dass *C. jejuni* die IL-6-Sekretion in intestinalen Epithelzellen über TLR2 bewirkt. In dieser Arbeit zeigten infizierte IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse, nicht aber infizierte IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse im Colon einen Anstieg der IL-6-Proteinkonzentrationen. Somit konnte erstmals in einem *in vivo* Modell gezeigt werden, dass die durch *C. jejuni* ausgelöste IL-6-Sekretion TLR2-abhängig verläuft. Die verminderte IL-6-Konzentration und die vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen im Darm der infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse könnten im Zusammenhang stehen, da IL-6 eine anti-apoptotische Wirkung besitzt.¹⁵⁴

Bei infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen wurden signifikant weniger proliferierende Zellen nachgewiesen als bei infizierten IL-10^{-/-} Mäusen. Wie schon bei den naiven Tieren macht sich auch hier eine verminderte Epithelproliferation durch den TLR-Defekt bemerkbar.⁶⁰ Eine Reduktion der proliferierenden Zellen wäre auch bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen zu erwarten gewesen. Dieser Unterschied deutet sich auch an, wird jedoch nicht signifikant. Die Infektion mit *C. jejuni* führt sowohl bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen als auch bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen naiven Genotypen zu einem Anstieg der proliferierenden Zellen im Colon. Dieser Anstieg ist bei den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen nicht signifikant, jedoch tendenziell zu erkennen. Die Infektion mit *C. jejuni* führt im hier verwendeten Modell zu einer Erhöhung proliferierender Zellen im Colon.

Frühere Studien^{123,124} zeigen Hinweise auf eine Beteiligung dendritischer Zellen bei der Abwehr einer *C. jejuni* Infektion. Dendritische Zellen nehmen die Bakterien auf und produzieren pro-inflammatorische Zytokine.¹²³ Zum einen wird IL-12 produziert, was die Differenzierung CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen bewirkt, zum anderen werden TNF α und IL-6 produziert, welche neutrophile Granulozyten und Makrophagen anlocken.¹³⁰ In der Lamina propria infizierter IL-10^{-/-} Mäuse konnte ein höherer Anteil dendritischer Zellen nachgewiesen werden als bei den naiven IL-10^{-/-} Mäusen. Jedoch zeigte nur die IL-6-Proteinkonzentration im Colon infizierter IL-10^{-/-} Mäuse einen Anstieg im Vergleich zu naiven IL-10^{-/-} Mäusen. IL-6-, TNF α - und IFN γ -mRNA-Analysen ergaben im Gegensatz dazu eine Reduktion dieser Zytokine bei den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen. Auf Proteinebene ergaben sich keine unterschiedlichen TNF- α -, IFN γ - und IL12-p70 Konzentrationen bei den infizierten IL-10^{-/-}

Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen. Die Ergebnisse früherer Studien lassen sich somit nicht eindeutig bestätigen.

Innerhalb der infizierten Gruppen zeigte sich bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} Mäusen ein größerer Anteil dendritischer Zellen in der Lamina propria und damit eine stärkere Immunreaktion gegen *C. jejuni*. Auch in den MLN der infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden signifikant mehr dendritische Zellen nachgewiesen als in den MLN der naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} sowie der infizierten IL10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. Durch *C. jejuni* aktivierte dendritische Zellen induzieren eine Th1-Antwort.¹²⁴ Auch der Anteil der CD4⁺ Th-Zellen war bei den infizierten IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} sowie den infizierten IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen erhöht. Somit scheint der Verlust von TLR4 bei einer Infektion mit *C. jejuni* in der Lamina propria und in den MLN zu einer vermehrten Aktivierung dendritischer Zellen und in den MLN zu einer stärkeren T-Zellantwort zu führen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Studie von Rathinam¹²², bei der eine *C. jejuni*-induzierte Aktivierung dendritischer Zellen TLR4-abhängig verläuft. In dieser Studie wurde jedoch ein anderer *C. jejuni*-Stamm verwendet, dessen Oberflächenstrukturen vermutlich andere Rezeptoren aktiviert (siehe dazu Beginn 5.2 sowie¹⁸⁰).

Iovine¹⁸³ konnte in einem *in vitro*-Modell zeigen, dass NO eine Rolle in der Abwehr *C. jejunis* spielt. Dies bestätigte sich in einem *in vivo* Modell nach intraperitonealer Infektion von Mäusen mit *C. jejuni*.¹⁸⁴ Bei den hier untersuchten IL10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen, die p.o. mit *C. jejuni* infiziert wurden, zeigte sich hingegen kein Anstieg der NO-Konzentration im Colon.

Die IL-18-mRNA-Expression im Colon der infizierten Mäuse war im Vergleich zu den naiven Mäusen reduziert. Schon die IL-18-Expression der naiven Tiere war im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Tieren vermindert. Studien unserer Forschungsgruppe mit gnotobiotischen IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen, die ausschließlich mit *C. jejuni* bzw. *E. coli* rekolonisiert wurden, zeigten bei den mit *C. jejuni* kolonisierten Tieren ebenfalls eine Reduktion der IL-18-Expression im Vergleich zu den mit *E. coli* assoziierten Mäusen (Dissertation von Lea-Maxie Haag, unveröffentlicht). Diese Verminderung der IL-18-Expression macht eine Beteiligung von IL-18 an der Pathogenese der IL-10^{-/-}- und der Campylobacter-Colitis unwahrscheinlich.

In die Bekämpfung einer *C. jejuni*-Infektion wird auch das adaptive Immunsystem mit eingebunden. Antikörper gegen verschiedene bakterielle Komponenten konnten im menschlichen Serum nachgewiesen werden.¹⁸⁵ Im Colon der infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse konnten im Vergleich zu den naiven Tieren mehr B-Zellen

nachgewiesen werden, was für die Beteiligung einer adaptiven Immunantwort im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion spricht. Der bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen verringerte Anteil B220⁺ Zellen im Colon spricht für eine TLR4-abhängige Aktivierung der B-Zellen. Bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Tieren wurde auch in den MLN ein geringerer Anteil B-Zellen im Vergleich zu den IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen gefunden. Allerdings zeigte sich in diesem Kompartiment kein durch die Infektion hervorgerufener erhöhter Anteil an B-Zellen. Auch in der Milz wurden keine Unterschiede der B-Zellpopulationen zwischen naiven und infizierten Tieren festgestellt, sodass die B-Zellantwort gegenüber *C. jejuni* in diesem Modell auf das mukosale Immunsystem begrenzt ist.

Infizierte IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wiesen signifikant mehr Th-Zellen, aktivierte Th-Zellen und zytotoxische T-Zellen in der Milz auf als naive IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse sowie infizierte IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. Damit kam es bei diesen Tieren zu einer stärkeren systemischen Immunantwort gegenüber *C. jejuni* als bei den Vergleichstieren. Gestützt wird dies durch einen erhöhten Anteil dendritischer Zellen in der Milz der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Dendritische Zellen aktivieren T-Zellen bei einer *C. jejuni*-Infektion.^{123,124} Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen tragen zur Immunantwort gegen *C. jejuni* bei.¹⁸⁶ Die Beteiligung dieser Zellen an der Immunantwort gegen *C. jejuni* wird ebenso in der Leber ersichtlich. Es kommt bei den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen zu einem erhöhten Anteil von Th-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen.

Bei den infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen kam es im Vergleich zu den naiven Gruppen häufiger zu Translokationen lebender Bakterien in die MLN, Leber, Milz und Nieren. Dabei konnte kein lebender *C. jejuni*, sondern Bakterien der Darmflora nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien, nach denen *C. jejuni* zu einer transzellulären Translokation kommensaler Bakterien über lipid rafts führt.¹⁰⁵ Ein weiterer Mechanismus besteht in der Reduktion der MUC2-Expression im Darm. Infizierte Mäuse wiesen im Vergleich zu naiven Tieren eine verminderte MUC2-Expression im Colon auf. Somit vermindert *C. jejuni* die schützende Schleimschicht, die den Kontakt der Darmbakterien mit dem Epithel begrenzt. In der Folge können Bakterien leichter an das Epithel gelangen und translozieren.

In der Leber der infizierten IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse konnte im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen ein signifikanter Anstieg neutrophiler Granulozyten festgestellt werden. Der höchste Anteil der Neutrophilen zeigte sich bei den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen. Dies kann durch eine Immunantwort gegenüber den in die Leber translozierten Bakterien erklärt werden, da eine der Hauptaufgaben dieser

Zellpopulation in der Beseitigung eingedrungener Mikroorganismen besteht.¹⁸⁷ Obwohl es bei 47,1% der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse und damit bei doppelt so vielen Tieren im Vergleich zu den beiden anderen infizierten Gruppen zu einer Translokation von Bakterien in die Leber kam, lag der Anteil der neutrophilen Granulozyten unter dem der IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse. Es translozierten mehr Bakterien in die MLN der infizierten IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse als in die MLN der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Erwartungsgemäß zeigte sich bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen in den MLN ein geringerer Anteil neutrophiler Granulozyten.

Im DSS-Colitis Modell konnte bewiesen werden, dass intraepitheliale $\gamma\delta$ T-Zellen den Übertritt von Bakterien durch geschädigtes Epithel begrenzen und dessen Heilung stimulieren.^{188,189} Im hier verwendeten IL-10^{-/-}-Colitis Modell wurden im Colon der IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen mehr $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen. IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen eine geringere bakterielle Translokation in die MLN sowie weniger Epithelschäden, was die Ergebnisse früherer Studien zur Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen bestätigt.

In den Lymphozyten der Lamina propria kam es bei den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den naiven IL-10^{-/-} Mäusen. Beim Vergleich der infizierten Gruppen untereinander wiesen IL-10^{-/-} Mäuse die niedrigsten Werte dieser Zellpopulation auf. Somit zeigt sich in der Lamina propria der infizierten Mäuse erwartungsgemäß eine Antwort des angeborenen Immunsystems gegenüber *C. jejuni*, die durch einen TLR-Defekt verstärkt wird.

In der Milz und in der Leber wurde bei allen infizierten Gruppen im Vergleich zu den naiven Gruppen ein geringerer Anteil natürlicher Killerzellen nachgewiesen. Dies macht eine Beteiligung dieser Zellpopulation bei einer systemischen Antwort gegen *C. jejuni* unwahrscheinlich. Natürliche Killerzellen können pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IFN γ , produzieren und zur Abwehr von Krankheitserregern beitragen.¹⁶⁸ Ihre Rolle im Rahmen von Infektionen mit *C. jejuni* ist bisher wenig erforscht. Avril¹⁹⁰ konnte zeigen, dass natürliche Killerzellen das LOS von *C. jejuni* erkennen. Eine mögliche Bedeutung im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Auch das Ausbleiben von Veränderungen des Anteils natürlicher Killerzellen in den MLN durch die Infektion mit *C. jejuni* macht eine Beteiligung an der Immunabwehr im hier untersuchten Modell unwahrscheinlich.

Bei starker Entzündung im Darm kommt es zu einer Vermehrung bestimmter vom erhöhten Nährstoffangebot besonders profitierender Bakterien, zu denen auch *E. coli* zählt.³⁷ Infizierte IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigen eine niedrigere *E. coli* Konzentration im Colon

als naive IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse. Bei den infizierten IL-10^{-/-} Mäusen ist kein signifikanter Unterschied feststellbar, jedoch weisen mehr naive als infizierte IL-10^{-/-} Mäuse *E. coli* im Colon auf. Somit zeigen mit *C. jejuni* infizierte Mäuse in diesem Modell eine Verminderung der *E. coli*-Konzentration im Colon. Da sich die Darmflora von Tier zu Tier in gewissen Grenzen unterscheidet, wäre eine Untersuchung des Verlaufs der *E. coli*-Konzentration bei den gleichen Tieren von einem naiven Ausgangszustand hilfreich gewesen, um zu beurteilen, inwiefern sich die *C. jejuni*-Infektion auf die *E. coli*-Konzentration im Darm der Tiere auswirkt. Die Konzentration der infizierten Mäuse untereinander kann als vergleichbar angesehen werden, wobei sich zeigt, dass die TLR2-Defizienz bei infizierten Mäusen zu einer höheren *E. coli*-Konzentration im Colon führt.

6 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltrakts. Die IL-10^{-/-} Maus entwickelt eine chronische Th1-basierte Colitis und wurde hier als Modell verwendet, um die Rolle von TLR2 und TLR4 - Rezeptoren des angeborenen Immunsystems - bei der Colitis zu untersuchen.

IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse zeigten eine schwächere Ausprägung der Colitis im Vergleich zu IL-10^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäusen. IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse wurden klinisch besser beurteilt und wiesen weniger apoptotische sowie B-Zellen im Colon auf. Die IFN γ - und IL-12p70-Konzentrationen im Colon waren vermindert. Somit verstärkt bakterielles Lipopolysaccharid, das über TLR4 wahrgenommen wird, die Entzündungsreaktion. Die Untersuchung eines TLR4-Antagonisten im Colitis-Modell erscheint sinnvoll. IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} Mäuse zeigten eine stärkere Entzündung. Dieses Ergebnis spiegelte sich vor allem im erhöhten histopathologischen Score, der größeren Anzahl von T-Zellen sowie erhöhter pro-inflammatorischer Zytokinkonzentrationen im Colon wider. Eine mögliche positive Wirkung von TLR2-Liganden auf die IL-10^{-/-}-Colitis sollte untersucht werden.

Das Darmpathogen *C. jejuni* konnte in IL-10^{-/-}, IL-10^{-/-}/TLR2^{-/-} und IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen den Gastrointestinaltrakt kolonisieren, führte jedoch nicht zu einer histologisch erkennbaren Exazerbation der Colitis. Die Infektion bewirkte einen Anstieg der B-Zellen und eine verringerte Mucin2-Expression. Die resultierende Veränderung der Schleimschicht trug zu einer vermehrten bakteriellen Translokation bei. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Antigenstimulus in der Mukosa, der in genetisch empfindlichen Individuen als Initiator einer ungebremsten Entzündungsreaktion dienen kann.

Alle infizierten Genotypen wiesen im Vergleich zu den naiven Gruppen eine verminderte Anzahl natürlicher Killerzellen in Milz und Leber auf. Dieses Resultat macht eine Beteiligung der natürlichen Killerzellen an der Immunantwort gegen *C. jejuni* unwahrscheinlich. Bei den IL-10^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen kam es zu einer verstärkten adaptiven und verminderten angeborenen systemischen Immunantwort. Eine *in vitro* früher beschriebene TLR2-abhängige Induktion der IL-6-Produktion durch *C. jejuni* konnte erstmals *in vivo* bestätigt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C - Grad Celsius

Abb. - Abbildung

A - Adenosin

AIEC - adherent-invasive *Escherichia coli*

APC - Antigen-Presenting-Cell (eng.), Antigenpräsentierende Zelle

APC - Allophycocyanin

Aqua dest. - destilliertes Wasser

ATG16L1 - autophagy-related 16-like protein1 (eng.)

BSA - Bovines Serum Albumin

C. jejuni - *Campylobacter jejuni*

CARD-15 - Caspase-Recruitment-Domain 15 (eng.)

CD - Cluster of Differentiation (eng.)

CED - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

CNA - Colistin/ Nalidixin Säure-Agar

CpG - Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin

C - Cytosin

d - Tag

DC - Dendritic Cells (eng.), dendritische Zellen

DNA - Desoxyribonukleinsäure

DSS - Dextran-Natrium-Sulfate (eng.)

E. coli - *Escherichia coli*

FITC - Fluoreszeinisothiocyanat

Foxp3 - Forkhead box P3 (eng.)

g - Erdbeschleunigung

g - Gramm

GALT - Gut-associated lymphoid tissue (eng.)

$\gamma\delta$ TCR - $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor

G - Guanosin

HE - Hämatoxylin-Eosin

IFN - Interferon

Ig - Immunglobulin

IL - Interleukin

IRGM - immunity-related GTPase family (eng.)

k - Kilo

KBE - Kolonie-bildende Einheit

LOS - Lipooligosaccharid
LPS - Lipopolysaccharid
m - milli
MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1 (eng.)
MDP - Muramyl-dipeptid
MgCl₂ - Magnesiumdichlorid
MLN - mesenteriale Lymphknoten
MPO7 - Myeloperoxidase 7
MUC2 - Mucin 2
MyD88 - Myeloid differentiation primary-response protein 88 (eng.)
n - Anzahl
NF-κB - Nuclear-Factor-Kappa B
NK Zellen - Natürliche Killerzellen
NO - Stickstoffmonoxid
NOD - Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (eng.)
p - p-Wert
PAMP - Pathogen-associated molecular pattern (eng.)
PE - Phycoerythrin
PBS - Phosphate buffered saline (eng.)
PCR - Polymerase-chain-reactio (eng.), Polymerasekettenreaktion
PRR - Pattern recognition receptor (eng.)
REG3 - Regenerating islet-derived proetin (eng.)
RNA - Ribonukleinsäure
SPF - spezifisch pathogenfrei
t - Thymidin
TGFβ - Tumor growth factor β (eng.)
TIR - TOLL/IL-1-Rezeptor entsprechende Region
TIRAP - TIR domain containing adaptor protein (eng.)
TLR - Toll-like Receptor (eng.), Toll-ähnlicher Rezeptor
TNFα - Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAM - TRIF-related adaptor molecule (eng.)
TRIF - Toll-Receptor associated Activator of Interferon (eng.)

8 Literatur

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427-434.
2. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577-594.
3. Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2002;359:331-340.
4. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521-533.
5. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347:417-429.
6. Loftus EVJ. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126:1504-1517.
7. Hanauer SB, Present DH. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*. 2003;3:81-92.
8. Hanauer SB. Review article: evolving concepts in treatment and disease modification in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27 Suppl 1:15-21.
9. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:458-466.
10. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117:514-521.
11. Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2001;17:307-312.
12. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997;150:823-832.
13. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58:1152-1167.
14. Schmidt C, Giese T, Ludwig B et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:16-23.

15. Fuss IJ, Strober W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S31-3.
16. Heller F, Florian P, Bojarski C et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005;129:550-564.
17. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:495-549.
18. Davidson NJ, Fort MM, Muller W et al. Chronic colitis in IL-10^{-/-} mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. *Int Rev Immunol.* 2000;19:91-121.
19. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
20. Unutmaz D, Pulendran B. The gut feeling of Treg cells: IL-10 is the silver lining during colitis. *Nat Immunol.* 2009;10:1141-1143.
21. Kuhn R, Lohler J, Rennick D et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75:263-274.
22. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM et al. T helper cell 1-type CD4⁺ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184:241-251.
23. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest.* 1996;98:1010-1020.
24. Davidson NJ, Hudak SA, Lesley RE et al. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* 1998;161:3143-3149.
25. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:367-374.
26. Sartor RB. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol.* 1997;148:567-576.
27. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1998;66:5224-5231.
28. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I et al. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut.* 1996;38:365-375.

29. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1995;102:448-455.
30. Casellas F, Borrueal N, Papo M et al. Antiinflammatory effects of enterically coated amoxicillin-clavulanic acid in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 1998;4:1-5.
31. Sutherland L, Singleton J, Sessions J et al. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut.* 1991;32:1071-1075.
32. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol.* 1998;12:53-56.
33. Steinhart AH, Feagan BG, Wong CJ et al. Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2002;123:33-40.
34. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122:44-54.
35. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004;53:1-4.
36. Neut C, Bulois P, Desreumaux P et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:939-946.
37. Erridge C, Duncan SH, Bereswill S et al. The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5. *PLoS One.* 2010;5:e9125.
38. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;127:412-421.
39. Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1277-1283.
40. 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;131:117-129.
41. Schwerbrock NM, Makkink MK, van der Sluis M et al. Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:811-823.

42. Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW et al. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*. 1999;44:387-393.
43. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:411-420.
44. Putsep K, Axelsson LG, Boman A et al. Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *J Biol Chem*. 2000;275:40478-40482.
45. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:20858-20863.
46. Parisien A, Allain B, Zhang J et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol*. 2008;104:1-13.
47. Suzuki K, Meek B, Doi Y et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1981-1986.
48. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. 2000;288:2222-2226.
49. Casola S, Rajewsky K. B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;308:155-171.
50. Tsuji M, Suzuki K, Kitamura H et al. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*. 2008;29:261-271.
51. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*. 2008;9:769-776.
52. He B, Xu W, Santini PA et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007;26:812-826.
53. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
54. Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2009;21:185-193.

55. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4:1144-1150.
56. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* 2001;2:835-841.
57. Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85:143-156.
58. Cario E. Therapeutic impact of toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: a multiple-edged sword. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:411-421.
59. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S62-6.
60. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:131-144.
61. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2007;Chapter 14:Unit 14.12.
62. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118:229-241.
63. Gibson DL, Ma C, Rosenberger CM et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol.* 2008;10:388-403.
64. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 2007;132:1359-1374.
65. Fukata M, Michelsen KS, Eri R et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1055-65.
66. 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.
67. Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG et al. A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2005;174:6416-6423.
68. Depaolo RW, Tang F, Kim I et al. Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2008;4:350-361.

69. Messlik A, Schmechel S, Kisling S et al. Loss of Toll-like receptor 2 and 4 leads to differential induction of endoplasmic reticulum stress and proapoptotic responses in the intestinal epithelium under conditions of chronic inflammation. *J Proteome Res.* 2009;8:4406-4417.
70. Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity.* 2006;25:319-329.
71. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2003;124:521-536.
72. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE et al. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ.* 1996;312:95-96.
73. Orholm M, Binder V, Sorensen TI et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:1075-1081.
74. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29:990-996.
75. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001;357:1925-1928.
76. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:599-603.
77. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:603-606.
78. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 2005;54:1182-1193.
79. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:955-962.
80. Girardin SE, Boneca IG, Viala J et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003;278:8869-8872.
81. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2002;277:41701-41705.
82. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC et al. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003;124:993-1000.

83. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM et al. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol.* 2004;14:2217-2227.
84. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology.* 2003;124:140-146.
85. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3455-3460.
86. Monteleone G, Biancone L, Marasco R et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology.* 1997;112:1169-1178.
87. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol.* 2004;5:800-808.
88. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ et al. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity.* 2006;25:473-485.
89. Strober W, Kitani A, Fuss I et al. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S5-9.
90. Watanabe T, Asano N, Murray PJ et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest.* 2008;118:545-559.
91. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18129-18134.
92. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:363-391.
93. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:89-116.
94. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007;39:207-211.
95. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun.* 2007;8:387-397.

96. Franke A, Balschun T, Karlsen TH et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet.* 2008;40:1319-1323.
97. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 2006;314:1461-1463.
98. Franke A, Balschun T, Karlsen TH et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet.* 2008;40:713-715.
99. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 2007;39:830-832.
100. Mendoza JL, Lana R, Diaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15:417-422.
101. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH et al. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2001;29-40.
102. Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006;130:1588-1594.
103. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA et al. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2008;135:781-786.
104. Stallmach A, Carstens O. Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8:213-218.
105. Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog.* 2009;1:2.
106. Singh S, Graff LA, Bernstein CN. Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD? *Am J Gastroenterol.* 2009;104:1298-313; quiz 1314.
107. Black RE, Levine MM, Clements ML et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis.* 1988;157:472-479.
108. Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:665-679.
109. Crushell E, Harty S, Sharif F et al. Enteric campylobacter: purging its secrets? *Pediatr Res.* 2004;55:3-12.
110. van Spreeuwel JP, Duursma GC, Meijer CJ et al. *Campylobacter colitis*: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut.* 1985;26:945-951.

111. Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect.* 1999;1:1023-1033.
112. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:868-876.
113. Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW et al. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:123-129.
114. 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-Barre syndrome, by horizontal exchange. *Infect Immun.* 2004;72:1162-1165.
115. Yu RK, Usuki S, Ariga T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. *Infect Immun.* 2006;74:6517-6527.
116. Pithadia AB, Kakadia N. Guillain-Barre syndrome (GBS). *Pharmacol Rep.* 2010;62:220-232.
117. Pope JE, Krizova A, Garg AX et al. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;37:48-55.
118. Peterson MC. Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults. *Scand J Rheumatol.* 1994;23:167-170.
119. McSweegan E, Walker RI. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect Immun.* 1986;53:141-148.
120. Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000;68:6535-6541.
121. 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.
122. Rathinam VA, Appledorn DM, Hoag KA et al. *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.
123. Hu L, Bray MD, Osorio M et al. *Campylobacter jejuni* induces maturation and cytokine production in human dendritic cells. *Infect Immun.* 2006;74:2697-2705.
124. 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.

125. Newell DG. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2001;57S-67S.
126. Field LH, Underwood JL, Pope LM et al. Intestinal colonization of neonatal animals by *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Infect Immun.* 1981;33:884-892.
127. 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.
128. Watson RO, Novik V, Hofreuter D et al. A MyD88-deficient mouse model reveals a role for Nrp1 in *Campylobacter jejuni* infection. *Infect Immun.* 2007;75:1994-2003.
129. Fox JG, Rogers AB, Whary MT et al. Gastroenteritis in NF-kappaB-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.
130. 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.
131. Chang C, Miller JF. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect Immun.* 2006;74:5261-5271.
132. Merlin T, Sing A, Nielsen PJ et al. Inherited IL-12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the Lps(d) C57BL/10ScCr mouse. *J Immunol.* 2001;166:566-573.
133. Werts C, Tapping RI, Mathison JC et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2001;2:346-352.
134. 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.
135. 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.
136. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology.* 2005;129:969-984.
137. Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:367-380.

138. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-452.
139. Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ et al. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 2008;226:147-159.
140. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G et al. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13249-13254.
141. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity.* 2010;32:367-378.
142. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K et al. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med.* 2004;14:191-196.
143. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008;5:e54.
144. Sakuraba A, Sato T, Kamada N et al. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2009;137:1736-1745.
145. Cario E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24:725-732.
146. Boulard O, Asquith MJ, Powrie F et al. TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation. *Eur J Immunol.* 2010;40:516-524.
147. Kim SC, Tonkonogy SL, Karrasch T et al. Dual-association of gnotobiotic IL-10^{-/-} mice with 2 nonpathogenic commensal bacteria induces aggressive pancolitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1457-1466.
148. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2007;42:787-798.
149. 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.
150. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo 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.
151. Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology.* 2004;113:427-437.

152. Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S43-6.
153. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol.* 2000;164:4878-4882.
154. Atreya R, Mudter J, Finotto S et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000;6:583-588.
155. Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med.* 2002;8:1089-1097.
156. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353:2462-2476.
157. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P et al. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol.* 1996;59:804-812.
158. Sanos SL, Bui VL, Mortha A et al. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46⁺ cells. *Nat Immunol.* 2009;10:83-91.
159. 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.
160. 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.
161. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity.* 2008;29:947-957.
162. Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol.* 2005;6:1198-1205.
163. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol.* 1999;162:6829-6835.
164. 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.

165. 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.
166. Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today*. 1996;17:71-76.
167. Ryan JC, Turck J, Niemi EC et al. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J Immunol*. 1992;149:1631-1635.
168. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004;5:1260-1265.
169. Cortesini R, LeMaoult J, Ciubotariu R et al. CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev*. 2001;182:201-206.
170. Brimnes J, Allez M, Dotan I et al. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2005;174:5814-5822.
171. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995;154:5071-5079.
172. Shojaei F, Ferrara N. Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res*. 2008;68:5501-5504.
173. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA et al. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology*. 2005;128:891-906.
174. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:478-485.
175. Asquith MJ, Boulard O, Powrie F et al. Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;139:519-29, 529.e1-2.
176. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA et al. Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15058-15063.
177. Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA et al. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:505-518.
178. Jin S, Song YC, Emili A et al. 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.

179. Moran AP. Structure and conserved characteristics of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *J Infect Dis.* 1997;176 Suppl 2:S115-21.
180. Karlyshev AV, Ketley JM, Wren BW. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29:377-390.
181. de Zoete MR, Kestra AM, Roszczenko P et al. Activation of human and chicken toll-like receptors by *Campylobacter* spp. *Infect Immun.* 2010;78:1229-1238.
182. Al-Sayeqh AF, Loughlin MF, Dillon E et al. *Campylobacter jejuni* activates NF-kappaB independently of TLR2, TLR4, Nod1 and Nod2 receptors. *Microb Pathog.* 2010;49:294-304.
183. Iovine NM, Pursnani S, Voldman A et al. Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 2008;76:986-993.
184. Tarantino M, Dionisi AM, Pistoia C et al. Involvement of nitric oxide in the control of a mouse model of *Campylobacter jejuni* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56:98-101.
185. Kaldor J, Pritchard H, Serpell A et al. Serum antibodies in *Campylobacter* enteritis. *J Clin Microbiol.* 1983;18:1-4.
186. Vuckovic D, Abram M, Bubonja M et al. Host resistance to primary and secondary *Campylobacter jejuni* infections in C57Bl/6 mice. *Microb Pathog.* 2006;40:35-39.
187. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM et al. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol.* 2001;69:698-704.
188. Chen Y, Chou K, Fuchs E et al. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14338-14343.
189. Ismail AS, Behrendt CL, Hooper LV. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol.* 2009;182:3047-3054.
190. Avril T, Wagner ER, Willison HJ et al. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *Infect Immun.* 2006;74:4133-4141.

Lebenslauf

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, **Otto B**, Kühl AA, Loddenkemper C, Göbel UB, Heimesaat MM. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. PLoS One. 2010 Dec 3;5(12):e15099.

Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, **Otto B**, Kühl AA, Dasti JI, Zautner AE, Muñoz M, Loddenkemper C, Groß U, Göbel UB, Heimesaat MM. Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the „Ménage à Trois" of Campylobacter jejuni, Microbiota and Host Innate Immunity. PLoS One. 2011;6(6):e20953.

Danksagung

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

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Stefan Bereswill für die freundliche Überlassung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank richtet sich an Dr. Markus Heimesaat, ohne dessen Hilfe bei der Planung, Datenerhebung und Auswertung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Melba Munoz danke ich für die geduldige Anleitung und Einarbeitung in immunologische Methoden. Dr. André Fischer möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

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

Mein Dank richtet sich außerdem an Dr. Anja Kühl und Simone Spieckermann für die praktische Arbeit bei der Herstellung der histologischen Schnitte.

Lea-Maxie Haag gilt mein besonderer Dank für die große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

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

Dem Graduiertenkolleg „Immucoco“ des Sonderforschungsbereichs 633 danke ich für das umfassende Lehrangebot und die finanzielle Unterstützung.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Bettina Otto, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von Komponenten des angeborenen Immunsystems im murinen Colitis-Modell 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.“

18.11.2010

Datum

Unterschrift