

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Kommensales Flagellin schützt vor Inflammation – ein Vergleich
kommensaler Wildtyp Stämme mit dem probiotischen Stamm
Escherichia coli Nissle 1917

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Yao, Hans

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Maier
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Bohn

Tag der Disputation: 03.07.2026

Gewidmet an meine Eltern und meinen Bruder.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
2 Material und Methoden	23
2.1. Material.....	23
2.1.1. Geräte.....	23
2.1.2. Zelllinien.....	23
2.1.3. Mauslinien	24
2.1.4. Bakterien.....	24
2.1.5. Medien, Chemikalien und Agar.....	27
2.1.5.1. Medien	27
2.1.5.2. Chemikalien.....	27
2.1.5.3. Medienzusammensetzung.....	28
2.1.5.4. Agar	29
2.1.6. Antibiotika	30
2.1.7. TLR5 Ligand	30
2.1.8. Kits.....	30
2.1.9. Antikörper.....	30
2.2. Mikrobiologische Methoden.....	31
2.2.1. Kultivierung von Bakterien	31
2.2.2. Transformation von Bakterien.....	32
2.2.3. Quantifizierung von Bakterien	33
2.2.4. Trinkwasserzubereitung mit Bakterien für Mäuse	33
2.2.5. Erhebung der CFU (colony forming units) aus Mausexkrementen	34
2.2.6. Untersuchung des Schwärmverhalten von Bakterien.....	34
2.3. Zellbiologische Methoden	34
2.3.1. Zellkultivierung und Zellstimulation.....	34
2.3.2. Murine knochenmarksabgeleitete dendritische Zellen (<i>bone marrow derived dendritic cells (mBMDCs)</i>).....	36
2.3.2.1. Kultivierung und Differenzierung von mBMDCs.....	36
2.3.2.2. Stimulation von mBMDCs	37
2.3.2.3. Mausmodell mit DSS-induzierter Kolitis	39
2.3.2.4. Isolation der Lamina propria Zellen des Kolons	40

2.3.2.5.	Zytokinproduktion	41
2.3.2.6.	Histologischer Colitis Score	42
2.4.	Immunologische Methoden	43
2.4.1.	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
2.4.1.1.	Interleukin 8 (IL-8) ELISA.....	43
2.4.1.2.	IL-1 β , IL-6, IL-10, Tumor nekrose faktor α (TNF α) ELISA	43
2.4.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	43
2.4.3.	Durchflusszytometrie.....	43
3.	Ergebnisse.....	49
3.1.	Die Länge der <i>fliC</i> -Sequenz variiert in <i>E.coli</i> Isolaten gesunder Probanden .	49
3.2.	Ausgeprägte Unterschiede im Schwärmverhalten zwischen den unterschiedlichen <i>E.coli</i> -Isolaten.....	51
3.3.	<i>E.coli</i> Isolate zeigen ein variables TLR5-Rezeptoraktivierungspotenzial in hTLR5- und mTLR5-HEK-Zellen.....	53
3.4.	TLR5-abhängige und TLR2/4-abhängige Effekte ausgewählter <i>E.coli</i> Stämme in BMDCs.....	56
3.4.1.	Stimulation muriner BMDCs durch <i>E.coli</i> erhöht die TLR2/4 abhängige TNF- α Sekretion.	58
3.4.2.	BMDC-Maturation ist primär TLR2/4-abhängig und wird durch TLR5 moduliert61	
3.5.	Protektive Effekte können durch kommensale <i>E.coli</i> Stämme vermittelt werden - ein Vergleich mit EcN im DSS-Kolitis Model.....	64
3.5.1.	Kolonisierung der Versuchstiere durch Applikation von unterschiedlichen <i>E.coli</i> Bakterienstämme über das Trinkwasser	65
3.5.2.	Die Kolonisation mit <i>E.coli</i> zeigt positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer DSS-Kolitis.....	67
3.5.3.	Die Kolonisation mit <i>E.coli</i> zeigt positiven Einfluss auf die Ausprägung histologischer Schädigung in einer DSS-Kolitis	68
3.5.4.	Eine durch DSS induzierte Kolitis sorgt durch Zellschrumpfung (Shrinking) für eine Verkürzung der Kolonlänge im <i>in vivo</i> Mausmodell.....	69
3.5.5.	Eine Kolonisierung durch EcN oder CS238 pHP45 Ω catR führt während einer DSS-induzierten Kolitis zu einem erhöhten Vorkommen an neutrophilen Granulozyten im Kolongewebe	70
3.5.6.	Die Kolonisation mit EcN und CS238 pHP45 Ω catR zeigt ein Zytokinprofil mit reduzierter Sekretion proinflammatorischer Mediatoren mit gleichzeitiger Präsenz des antiinflammatorischen Zytokin IL-10.....	72
4.	Diskussion	75
4.1.	Charakterisierung der Isolate: <i>fliC</i> -Länge und Schwärmverhalten	75

4.2.	TLR5 Rezeptoraktivierung durch kommensale <i>E.coli</i> Stämme im Vergleich zu EcN76	
4.2.1.	Unterschiede zwischen muriner und humaner TLR5 Antwort.....	76
4.3.	Die regulatorische Rolle von TLR5 in der Modulation der TLR-vermittelten Inflamationsreaktion und Zytokinproduktion in murinen BMDC's nach Stimulation mit <i>E.coli</i> Isolaten.....	77
4.3.1.	Immunmodulatorische Funktion von TLR5	78
4.3.2.	Analyse der Maturation muriner BMDC's nach Stimulation mit <i>E.coli</i> Isolaten	79
4.4.	Vergleich anti-inflammatorischer Effekte zwischen kommensaler <i>E.coli</i> Stämme und EcN im <i>in vivo</i> DSS-Kolitis Mausmodell	82
5.	Limitationen.....	93
6.	Zusammenfassung	95
7.	Literaturverzeichnis	98
8.	Erklärung zum Eigenanteil	111
9.	Veröffentlichungen.....	112
10.	Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schwarmartige Ausbreitung der <i>E.coli</i> Stämme auf LB-Agarplatten	51
Abbildung 2 HEK 293 h/m TLR5 Stimulation mit <i>E.coli</i> Isolaten	55
Abbildung 3 Zytokinanalyse mittels ELISA	61
Abbildung 4 Stimulationsversuch muriner BMDCs	63
Abbildung 5 In vivo DSS-Kolitis Versuch	65
Abbildung 6 In vivo DSS-Kolitis	66
Abbildung 7 In vivo DSS-Kolitis	68
Abbildung 8 Histologische Beurteilung der DSS-induzierten Kolitis	68
Abbildung 9 Kolonlänge nach DSS-induzierter Kolitis	70
Abbildung 10 Immunzellpopulationen in Organproben nach DSS-induzierter Kolitis.	71
Abbildung 11 In vivo DSS Gewebeprobeanalyse der Zytokinsekretion mittels ELISA Analyseverfahren.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zelllinien	23
Tabelle 2 Mauslinien	24
Tabelle 3 Bakterien	24
Tabelle 4 Medien	27
Tabelle 5 Chemikalien	27
Tabelle 6 Medienzusammensetzung	28
Tabelle 7 Agar	29
Tabelle 8 Antibiotika	30
Tabelle 9 TLR5 Ligand	30
Tabelle 10 Kits	30
Tabelle 11 Antikörper	30
Tabelle 12 Mediumzusammensetzung Transformation	32
Tabelle 13 Verwendete Stimulanzen für HEK-Zell Stimulation	35
Tabelle 14 Verwendete Stimuli für Zellen der Mauslinien WT, TLR5-/- und TLR2/4-/-	37
Tabelle 15 DAI (Disease activity index) Score	40
Tabelle 16 Histological Colitis Score	42
Tabelle 17 Antikörper Mastermix für regulatorische T-Zellen	44
Tabelle 18 Kontrollfärbung für regulatorische T-Zellen	45
Tabelle 19 Antikörper Mastermix für Th1 Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen	45
Tabelle 20 Kontrollfärbung für Th1 Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen	46
Tabelle 21 Antikörper Mastermix für regulatorische DCs und Neutrophile Granulozyten	46
Tabelle 22 Kontrollfärbung für regulatorische DCs und Neutrophile Granulozyten	47
Tabelle 23 Bakteriencharakterisierung und fliC-Sequenzlänge	49

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
AS	Aminosäure
BMDC	<i>Bone marrow derived cell</i>
bp	Basenpaar
CD	Crohn Disease
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CS	Colitis Stammsammlung
CU	Colitis ulcerosa
DC	<i>Dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
<i>fliC</i>	Flagellin
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Zentrifugalbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H	Stunde
HEK	Human embryonic kidney cells
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>

ng	Nanogramm
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SPF	Spezifisch Pathogenfrei
SSC	<i>Side scatter</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Das Mikrobiom des Menschen

Der menschliche Körper ist von einer Vielzahl an Mikroorganismen besiedelt. Die Gesamtheit dieser Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren und ihrer genetischen Information wird als Mikrobiom bezeichnet¹. Vor der Geburt befinden sich Säugetiere zunächst physiologisch in einem weitestgehend keimarmen Zustand. Die Erstbesiedelung des menschlichen Körpers mit Mikroorganismen erfolgt während der Geburt, insbesondere durch den Kontakt des Neugeborenen mit der maternalen Vaginal- und Hautmikrobiota^{2,3}. Neugeborene, die vaginal entbunden wurden und gestillt werden, zeigen dabei eine Besiedelung mit *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp.^{4,5}, die typischerweise in der Muttermilch und vaginalen Mikrobiota vorkommen. Im Gegensatz dazu weisen durch Kaiserschnitt entbundene Kinder eine vermehrte Besiedelung mit Bakterien der Hautmikrobiota, wie zum Beispiel *Staphylococcus* spp. auf^{6,7}. Diese Unterschiede in der Erstkolonisation können die Entwicklung des Mikrobioms wesentlich beeinflussen und somit langfristige Auswirkungen auf die frühkindliche Gesundheit⁸, das Immunsystem und die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten⁹ haben.

Der menschliche Darm beherbergt auf einer durchschnittlichen Länge von fünf bis sieben Metern schätzungsweise etwa 10^{13} bis 10^{14} Bakterien. Damit entspricht die Anzahl der Bakterien ungefähr der Gesamtzahl menschlicher Körperzellen^{10,11}. Die nährstoffreiche und anaerobe Umgebung des Darms bietet den Mikroorganismen ein optimales Milieu zur Besiedelung¹¹. Zu den häufigsten Vertretern des Mikrobioms gehören *Bacteroidetes* spp., *Firmicutes* spp., *Proteobacteria* spp. und *Verrucomicrobia* spp.¹².

Funktionell lassen sich die Darmbakterien in zwei Hauptgruppen unterteilen: Symbionten und Pathobionten¹³. Symbionten sind kommensale Mikroorganismen, die in einem wechselseitigen Zusammenleben dem Wirt einen Nutzen bieten¹³. Ihre wichtigsten Funktionen umfassen die Verdauung unverdaulicher Nahrungsbestandteile in resorbierbare Produkte, die Verstärkung der intestinalen Mukusschicht¹⁴, den Schutz des Wirts vor Pathogenen durch Konkurrenz um Kolonisationsnischen und Nährstoffe, den Schutz des Wirts gegenüber einer Besiedelung durch pathogene Mikroorganismen^{15,16}, sowie die Modulation und Regulation der mukosalen Immunantwort^{11,17}. Insbesondere durch Produktion kurzkettiger Fettsäuren verbessern Symbionten die intestinale, epitheliale Barrierefunktion¹⁸.

Pathobionten sind dagegen Mikroorganismen mit potenziell pathogener Wirkung, die unter gesunden Bedingungen in geringer Zahl Bestandteil des Mikrobioms sein können. In

physiologischen Verhältnissen im gesunden Menschen koexistieren sie mit kommensalen Bakterien, ohne dabei krankheitsauslösende Effekte zu entfalten¹⁹.

Die kommensalen Mikroorganismen des Mikrobioms spielen eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Darmhomöostase und verhindern die unbeschränkte Vermehrung von Pathobionten durch immunmodulatorische Mechanismen und Kolonisationsresistenz. Unter bestimmten Bedingungen, etwa im Rahmen genetischer Prädisposition, immunologischer Dysregulation oder externer Einflüsse, können harmlose Pathobionten jedoch pathogen werden und zur Entstehung oder Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse beitragen^{17,20}.

Die Zusammensetzung des Mikrobioms ist dynamisch und wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst. Dazu zählen insbesondere Ernährung, Einsatz von Antibiotika und Medikamenten im Allgemeinen, hygienische Bedingungen sowie individuelle Lebensstilfaktoren^{9,21}. Eine Dysbiose, also eine nachteilige Veränderung der mikrobiellen Balance, kann sowohl Folge als auch Mitursache chronisch-entzündlicher Erkrankungen sein^{22–25}. Sie ist typischerweise mit einem Rückgang protektiver, kommensaler Bakterien und Zunahme potenziell pathogener Spezies assoziiert. Eine dadurch begünstigte, übermäßige Besiedlung mit Pathobionten kann zur Infiltration der intestinalen Mukosa führen und entzündliche Reaktionen verstärken und strukturelle Umbauprozesse des Darmgewebes auslösen^{26–29}. Da das Immunsystem in engem Kontakt mit dem intestinalen Mikrobiom steht, ist ein Verständnis seiner Barrieren und Reaktionsmechanismen entscheidend für das Verständnis der entzündlichen Prozesse bei übermäßiger Besiedelung durch Pathobionten.

1.2. Das Immunsystem des Menschen

Das menschliche Verdauungssystem weist eine Gesamtoberfläche von ca. 32m² auf und steht täglich im Kontakt mit einer Vielzahl an Mikroorganismen, Antigenen und Substanzen, die potenziell gesundheitsschädlich sein können³⁰. Zum Schutz vor diesen Einflüssen verfügt der Mensch über mechanische Barrieren und ein komplexes, mukosales und systemisches Immunsystem. Diese Barrieren und Immunmechanismen erkennen potenziell schädliche Substanzen und Mikroorganismen und sorgen für deren Abgrenzung und Eliminierung^{31,32}.

1.2.1 Die Schutzbarrieren des Darms

Zunächst folgt der Blick auf die mechanischen Schutzbarrieren des Darms. Die intestinale epitheliale Darmbarriere stellt neben der Haut eine der wichtigsten Barrieren zwischen dem

Körperinneren und der Außenwelt dar. Sie besteht aus einer Einzelschicht aus Epithelzellen, die über verschiedene Protein-Protein-Komplexe miteinander verbunden sind. Diese Strukturen gewährleisten sowohl mechanische Stabilität als auch eine selektive Durchlässigkeit für Nährstoffe, Elektrolyte und Flüssigkeiten aus dem Darmlumen^{33–37}. Zwischen den einzelnen Epithelzellen befinden sich drei zentrale Haftkomplexe: Desmosomen, Adherens Junctions (AJ) und Tight Junctions (TJ)³⁸. Sie vermitteln eine mechanische Verbindung³⁹ der Einzelzellen, grenzen den Interzellularraum ab und definieren die Zellpolarität in apikale und basale Anteile³³.

Diese Barriere reguliert nicht nur den para- und transzellulären Transport von Stoffen⁴⁰, sondern verhindert auch die unkontrollierte Translokation luminaler Mikroorganismen in extraintestinale Gewebe, wie mesenteriale Lymphknoten, Leber, Milz oder den Blutkreislauf^{41,42}.

Das mukosale Immunsystem bildet einen weiteren zentralen Bestandteil der intestinalen Schutzbarriere. Es besteht aus dem *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) und ist für die Erkennung pathogener Krankheitserreger sowie die Präsentation von Antigenen an verschiedene Immunzellen verantwortlich⁴³. Durch permanenten Kontakt zur Mikrobiota kommt es zu einer kontinuierlichen Modulation des Immunsystems und verhindert somit eine übermäßige Immunantwort gegen kommensale, intestinale Mikroorganismen⁴⁴.

Durch das Zusammenspiel pro- und antiinflammatorischer Reaktionen entsteht eine Balance aus Toleranz und mukosaler Immunität⁴⁵, die eine intestinale Homöostase ermöglichen^{46,47}.

Neben der angeborenen Immunabwehr durch physikalische Barrieren, wie die mukosale Barriere des Darms⁴⁸ und durch die Sekretion antimikrobieller Peptide, wie Defensinen⁴⁹, ist auch die adaptive (erworbene) Immunantwort von Bedeutung. Sie wird durch die Antigenpräsentation, sowie durch die Differenzierung von B- und T-Zellen ermöglicht⁵⁰.

Dies ist wichtig für das Immunsystem, damit zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterschieden werden kann^{32,51}. Pathogene werden anhand spezifischer molekularer Muster erkannt und nach der Erkennung durch eine gezielte Immunantwort eliminiert. Ein zentrales Bindeglied zwischen Mikrobiom und der Immunantwort sind die sogenannten Pattern-Recognition-Rezeptoren, die mikrobielle Strukturen erkennen und Immunreaktionen einleiten.

1.2.2 Pattern- Recognition-Rezeptoren und ihre Liganden

Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), insbesondere Toll-Like Rezeptoren (TLRs), sind essenziell für die Erkennung mikrobieller Strukturen im menschlichen Körper. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und erkennen sowohl körperfremde Pathogene, sogenannte *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) oder auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), als auch körpereigene Zellbestandteile aus beschädigten oder abgestorbenen Zellen, die als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet werden⁵².

Nach Ligandenbindungen aktivieren PPRs intrazelluläre Signalwege, die zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, Typ-I-Interferon und weiterer Entzündungsmediatoren führen. Diese initiale Immunantwort dient nicht nur der akuten Pathogenabwehr, sondern bereitet auch die adaptive Immunreaktion für eine antigen-spezifische, angepasste Immunantwort vor⁵²⁻⁵⁴. TLRs finden sich sowohl auf Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise dendritischen Zellen, Makrophagen, als auch auf nicht-immunologischen Zellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen⁵². Alle TLRs bestehen aus einer Ektodomäne, die MAMPs wie Lipide, Lipoproteine, Proteine oder Nukleinsäuren erkennt, einer transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor)⁵⁵.

Nach Aktivierung kommt es beispielsweise über den durch das TLR-Adapterprotein MyD88 aktivierten Signalweg zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) oder MAP (*mitogen-activated protein*) und Kinase-Signalwege mit weiteren nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren, sind ausschlaggebend für das Ergebnis der Immunreaktion des angeborenen Immunsystems, da sie für die Expression und Regulation von Zytokinen wie IL-6, IL-1, IL-8, IL-19 und TNF, sowie von Chemokinen und Typ-1-Interferon verantwortlich sind^{52,56,57}. TLRs sind für die Erkennung von mikrobiellen Oberflächenstrukturen essenziell. Sie haben unterschiedliche Liganden, welche sie erkennen und dadurch stimuliert werden. TLR4 beispielsweise erkennt Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, während TLR2 zusammen mit TLR1 und TLR6 verschiedene Liganden wie Lipoproteine, Peptidoglycane und Lipoteichonsäure (eines der Hauptbestandteile der Zellwand grampositiver Bakterien) detektieren⁵⁸. Unter diesen Rezeptoren nimmt TLR5 in dieser Arbeit eine besondere Rolle ein, da er spezifisch das bakterielle Protein Flagellin erkennt.

1.2.3 TLR5

Der einzige, bis heute bekannte, natürliche Ligand des TLR5 Rezeptors ist das bakterielle Oberflächenprotein Flagellin. Das Protein Flagellin ist bei vielen gramnegativen und einzelnen grampositiven Bakterienarten zu finden⁵⁹. Es ist der Hauptbestandteil des bakteriellen Fortbewegungsapparates Flagellum, welches Bakterien dazu nutzen, um sich in flüssigem Medium oder auf Oberflächen fortzubewegen^{60–63}. Unter den, bei Menschen vorkommenden pathogenen Bakterienstämmen, besitzen beispielsweise *Salmonella spp.*, *Escherichia coli spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* und *Legionella spp.* diese Strukturen⁶⁴.

Das Flagellum ist ein komplexer Proteinapparat und besteht aus einem molekularen Komplex von bis zu 20-30.000 Proteinuntereinheiten und aus 30 unterschiedlichen Proteinen. Durch die rotierende Bewegung eines Basalkörpers werden die Flagellumfilamente in Bewegung gesetzt und fungiert als eine Art Propeller, der für den nötigen Antrieb sorgt, um die Bakterien fortzubewegen. Der Großteil dieser Untereinheiten, aus denen ein Flagellum zusammengesetzt ist, besteht aus einem langen end-zu-end Polymer des Proteins Flagellin (FliC)^{64,65}. FliC besteht aus den N- und C-Terminalen Domänen D0 und D1, die eine bedeutende Rolle in der TLR5 Rezeptorinteraktion und -aktivierung spielen^{66,67}. Diese strukturell homogenen Domänen werden auch als „conserved region“ bezeichnet⁶⁸. Darüber hinaus besteht FliC aus den weiteren Domänen D2 und D3, die hoch variabel aufgebaut und deswegen als „hypervariable regions“ (HVR) bezeichnet werden^{69,70}.

Die durch FliC aktivierten TLR5 Signalwege zeigen eine starke immunstimulatorische Wirkung und beinhalten ein erhebliches immunmodulatorisches Potenzial^{59,71,72}.

Die enge Kopplung zwischen Flagellin Variabilität und TLR5 Signalwegen legt nahe, dass die strukturellen Unterschiede der FliC die Immunantwort maßgeblich prägt. Gerade in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führt eine Dysbiose und ein Barriereverlust zu einer erhöhten Exposition gegenüber MAMPs, wodurch veränderte TLR5 Signale pro- oder antiinflammatorische Reaktionen modulieren können^{69,71}.

Der zentrale Fokus der vorliegenden Arbeit liegt darin zu prüfen, ob die Gesamtlänge und Struktur der *fliC*-Sequenzen die TLR5 Aktivierung und damit die stammspezifischen immunmodulatorischen Effekte kommensaler *E.coli* festlegt. Insbesondere der probiotische Stamm *E.coli* Nissle 1917 (EcN) spielt dabei eine zentrale Rolle. Im klinischen Kontext könnten chronisch entzündliche Darmerkrankungen Anwendungsgebiete für solch immunmodulatorische Effekte sein.

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa zählen zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die im englischen Sprachraum auch unter „Inflammatory bowel diseases“ (IBD) zusammengefasst werden⁷³. Laut Daten der „Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study“ aus dem Jahr 2017 sind rund 6,8 Millionen Patienten weltweit von einer CED betroffen, Inzidenz steigend^{74,75}. Dabei sind etwa 3,9 Millionen der Erkrankten Frauen und 3 Millionen Männer. Der Altersgipfel für Morbus Crohn liegt bei 18–35 Jahren (mit zweitem Peak 50–60 Jahre)^{76,77}, für Colitis ulcerosa im zweiten bis vierten Lebensjahrzehnt, mit zunehmender Inzidenz auch bei älteren Menschen^{78,79}. In Deutschland sind etwa 320.000 Patienten nachweislich betroffen⁸⁰. Die Dunkelziffer liegt jedoch laut einer Studie der Krankenkasse Barmer mit 420.000 – 470.000 Betroffenen wesentlich höher⁸¹. Ursprünglich gelten CED als eine Erkrankung wohlhabender Bevölkerungsschichten in Industrieländern mit hohem sozio-ökonomischen Standard^{82,83}. Erklärungsmodelle, wie die Hygienehypothese, vermuten, dass ein reduzierter Kontakt zu Mikroorganismen in der Kindheit zu einer inadäquaten Immunentwicklung führt. Auch eine ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung und zunehmende Urbanisierung galten als Risikofaktoren^{82–85}. Mittlerweile ist jedoch auch eine deutliche Zunahme an CED Erkrankungen in Ländern wie Südamerika, Osteuropa, Asien und weiten Teilen Afrikas zu beobachten⁷⁵.

Die beiden häufigsten Entitäten der CED sind Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Morbus Crohn betrifft meist das Ileum und das Kolon, wobei die Entzündung im gesamten Verdauungstrakt diskontinuierlich auftreten kann. Colitis Ulcerosa hingegen betrifft das Rektum und verläuft von dort aus kontinuierlich entlang des Kolons^{86,87}. Beide Krankheiten verlaufen typischerweise schubweise mit Remissions- und Rezidivphasen⁸⁷. Die Entzündungen bei Morbus Crohn manifestieren sich meist transmural, wohingegen die Entzündungen bei Colitis Ulcerosa mukosal limitiert ist⁸⁷. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei beiden Krankheitsbildern zwischen dem 16. und 35. Lebensjahr^{88,89}. Zu den Leitsymptomen zählen Durchfallepisoden, gastrointestinale Schmerzen, Hämatochezie sowie Obstipation^{86,87}.

Die Pathogenese der CED ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ursprünglich ging man von einer rein autoimmunologischen Genese aus, während man heute vielmehr eine

multifaktorielle Entstehung annimmt, bei der sowohl eine genetische Prädispositionen, als auch Umweltfaktoren die intestinale Mikrobiota und immunologische Dysregulation gleichermaßen beeinflussen^{86,87,90–92}.

Primäres Ziel der Therapie ist die Induktion und anschließende Erhaltung einer klinischen Remission^{93,94}, sowie Verhinderung von Komplikationen und operativen Eingriffen^{95–97}.

Aminosalicylate, wie Mesalazin, stellen die medikamentöse Basistherapie dar und gelten bei Colitis ulcerosa als Erstlinientherapie^{93,94,98}. Sie sind insbesondere während akuter Entzündungsphasen wirksam, zeigen jedoch im gesunden Darm keine präventive Wirkung⁹³. Gerade in Phasen der Remission kann eine Modulation der residualen Darmmikrobiota vor einem vorzeitigen Auftreten eines erneuten Schubes schützen^{93,99}.

Eine kausale Heilung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) ohne chirurgischer Proktoktomie (Entfernung von Kolon und Rektum) ist bislang noch nicht möglich. Der Fokus der aktuellen Forschung richtet sich zunehmend auf die Entwicklung neuer Therapieansätze, die darauf abzielen, Remissionsphasen zwischen akuten Schüben zu induzieren und zu verlängern, sowie entzündungsbedingte Folge- und Langzeitschäden zu reduzieren.

Im Rahmen der intensiven Erforschung des humanen Mikrobioms hat sich ein vielversprechendes neues Forschungsfeld eröffnet. Die Erkenntnis, dass das intestinale Mikrobiom eine zentrale Rolle in der Pathogenese von CED spielt, hat das Interesse an mikrobiommodulierenden Strategien gesteigert. Eine gezielte Modulation des Mikrobioms, beispielsweise durch den Einsatz von Probiotika oder fäkaler Mikrobiomtransplantationen (FMT), besitzt das Potenzial die intestinale Homöostase wiederherzustellen und entzündliche Prozesse zu beeinflussen^{69,93,99}.

Besonders hervorzuheben ist der Bakterienstamm *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), der sich in einzelnen Studien bei der Remissionserhaltung Mesalazin nicht unterlegen erwiesen hat und für die Therapie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zugelassen ist^{93,99}. Die probiotischen Effekte von EcN werden unter anderem auf seine Fähigkeit zurückgeführt, die epitheliale Barrierefunktion zu stabilisieren und immunmodulatorische Effekte auszuüben^{69,70,93,99}.

1.4 *Escherichia coli* Nissle 1917 - ein probiotischer Bakterienstamm

EcN ist ein nicht-pathogener, gramnegativer Bakterienstamm aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Aufgrund seiner probiotischen Eigenschaften wird er seit Jahrzehnten therapeutisch bei gastrointestinalen Erkrankungen, wie beispielsweise bei akuten Durchfallerkrankungen¹⁰⁰, unkomplizierter Divertikelkrankheit¹⁰¹ sowie insbesondere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa⁹⁹ eingesetzt.

Erstmals beschrieben und isoliert wurde EcN im Jahr 1917 vom deutschen Militärarzt Dr. Alfred Nissle. Einer Legende nach entnahm er den Stamm aus der Stuhlprobe eines Soldaten, der als einziger seiner Einheit trotz einer grassierenden Durchfallerkrankung gesund geblieben war¹⁰².

Obwohl EcN mittlerweile seit über 100 Jahren klinische Anwendung findet¹⁰³, ist der genaue Mechanismus seiner probiotischen Wirkung bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Seit 2005 ist EcN in Form des Präparats „Mutaflor®“ (Mutaflor 100 mg; Ardeypharm GmbH, Herdecke, Germany) zur Therapie von Colitis ulcerosa zugelassen.

Verschiedene experimentelle Untersuchungen haben mögliche Wirkmechanismen identifiziert, durch die EcN seine positiven Effekte in der Therapie von CED entfalten könnte. Es finden sich dabei unterschiedliche Bereiche, in denen EcN Krankheitsverläufe beeinflussen und in die Immunmodulation eingreifen könnte. Dazu zählt die Ausbildung von Biofilmen im intestinalen Lumen¹⁰⁴, die unter anderem die endogene Produktion antimikrobieller Peptide, wie Defensine, begünstigen^{104,105}. Defensine sind Peptide, die aus 30-50 Aminosäuren bestehen und eine wichtige Rolle in der Abwehr mikrobieller Erreger spielen¹⁰⁶. Darüber hinaus verstärkt EcN die Ausbildung von „tight junctions“ im intestinalen Epithel¹⁰⁷ durch Hochregulation und Stabilisierung zentraler Tight-Junction-Proteine¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, stimuliert die Sekretion weiterer antimikrobieller Proteine, wie Microcine und Bacteriocine¹¹⁰ und moduliert die Immunantwort¹¹¹. EcN reguliert die Expansion rekrutierter T-Zellen in der Mukosa und wirkt sich limitierend auf die intestinale Inflammation aus¹¹¹.

Insgesamt trägt EcN zur Erhaltung einer intestinalen, mikrobiellen Homöostase bei⁶⁹.

Unter anderem spielt das MAMP Flagellin und die damit verbundene TLR5 Rezeptoraktivierung eine tragende Rolle^{69,72,112}.

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass insbesondere die hypervariable Region (HVR) des bakteriellen Flagellins einen starken Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften der *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämmen nimmt⁶⁹.

Der symbiotische Stamm EcN besitzt eine auffallend längere HVR, verglichen mit anderen, nicht-symbiotischen *E. coli* Stämmen.

Die längere HVR korrelierte mit einer signifikant stärkeren TLR5-abhängigen Aktivierung von Signalkaskaden im Vergleich zu nicht-symbiotischen Stämmen⁶⁹.

Vor diesem Hintergrund stellen sich die Fragen, ob bestimmte Eigenschaften des Flagellins, insbesondere die Länge der *fliC*-Sequenz, das immunmodulatorische Potenzial von *E.coli*-Stämmen bestimmen.

Zusammenfassend lassen sich aus den gesammelten Beobachtungen die zentralen Fragenstellungen dieser Arbeit formulieren:

- Ist die Länge der *fliC*-Sequenz entscheidend für das TLR5-Aktivierungspotenzial?
- Besitzen auch andere *E.coli*-Stämme mit langer *fliC*-Sequenz ein vergleichbar hohes TLR5-Aktivierungspotenzial und probiotischen Eigenschaften?
- Rufen besonders kurze Flagellinstrukturen möglicherweise gegenteilige, proinflammatorische Effekte hervor?

1.5 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert durch Aktivierung von PRRs unmittelbar und unspezifisch auf das Eindringen mikrobieller oder viraler Bestandteile¹¹³. Anatomische und mechanische Barrieren, wie epitheliale Zellverbände, Zell-Zell-Kontakte und Muzinschichten bilden die erste Verteidigungslinie gegenüber lokal vorhandener Mikroorganismen im respiratorischen, intestinalen und urogenitalen Trakt³².

Darüber hinaus sorgt es mit löslichen Effektormolekülen, Entzündungsmediatoren, Enzymen und Sauerstoffradikalen für eine initiale Immunreaktion gegen translozierte Bakterien und mikrobielle oder virale Bestandteile^{31,32}. Die dabei freigesetzten Zytokine und Chemokine prägen das proinflammatorische Milieu, das die Differenzierung der adaptiven Immunantwort steuert und weitere Immunzellen rekrutiert. Zu den zentralen zellulären Akteuren des angeborenen Immunsystems zählen antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und

dendritische Zellen (DCs). Bei Kontakt mit Antigenen nehmen sie diese über Phagozytose auf, verarbeiten sie intrazellulär und präsentieren die Zellfragmente anschließend über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche^{32,54,114}. Dadurch initiieren sie die adaptive Immunantwort und fungieren als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität¹¹⁵.

Unreife DCs sind in der Lage, Pathogene mittels Endozytose aufzunehmen, zu prozessieren und Antigenpeptide an der Zelloberfläche zu präsentieren¹¹⁶. Nach Migration in sekundäre lymphatische Organe, wie mesenteriale Lymphknoten und Milz, präsentieren reife DCs diese Antigene naiven T- und B-Zellen, wodurch eine adaptive Immunantwort eingeleitet wird^{117,118}. Die Aktivierung dendritischer Zellen kann sowohl durch Pathogenkontakt^{116,119}, als auch durch Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen erfolgen.¹²⁰ In semi-mature und in unreifen Zuständen können DCs auch eine tolerogene Rolle einnehmen, in der sie sich durch eine reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86, sowie eine vermehrte Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10, auszeichnen^{115,116,121}. In dieser Funktion fördern sie die Induktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) und tragen zur peripheren Toleranz bei, indem sie inflammatorische T-Zell Antworten abschwächen oder verhindern^{121–123}. In Abwesenheit starker inflammatorischer Signale vermitteln semi-mature DCs eine anti-inflammatorische Immunantwort, fördern die Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen und sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt¹²⁴.

Erworbenes Immunsystem

Das adaptive Immunsystem bildet die zweite Verteidigungslinie gegenüber pathogenen Mikroorganismen. Es reagiert im Gegensatz zum angeborenem Immunsystem zeitlich verzögert, jedoch spezifischer und besitzt die Eigenschaft zur Gedächtnisbildung⁵¹. Das adaptive Immunsystem besteht aus zwei Hauptkomponenten. Es wird unterschieden zwischen der humoralen Immunantwort, die durch Antikörper-produzierende B-Zellen erfolgt, sowie die zellvermittelte Immunreaktion durch T-Lymphozyten und insbesondere zytotoxischer T-Zellen^{51,125,126}. B- und T-Lymphozyten exprimieren spezifische Antigenrezeptoren, deren Spezifität sie durch somatische Rekombination entwickeln. Die Aktivierung erfolgt nach Antigenkontakt über Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und führt anschließend zur klonalen Expansion und Differenzierung^{127,128}.

Die Erkennung pathogen-infiltrierter Zellen durch T-Zellen erfolgt über Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren und sogenannte MHC (major histocompatibility complex) Moleküle³². Sie kommen ubiquitär auf annähernd allen kernhaltigen Zellen, einschließlich antigen-präsentierender Zellen vor^{127,129}. Der erste Kontakt mit einem Antigen wird als Priming bezeichnet. Hierbei kommt es durch Antigenkontakt zur Aktivierung und klonalen Expansion von naiven T-Zellen¹³⁰. Endogene Peptide werden über MHC-Klasse-I Moleküle an CD8⁺ zytotoxische T-Zellen präsentiert. Exogene Peptide werden über MHC-Klasse-II Moleküle an CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert^{32,129,131}. Die Corezeptoren CD4 und CD8 steuern die funktionelle Ausrichtung der T-Zellen nach deren Aktivierung und Differenzierung³².

Aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen (Th) modulieren durch Einfluss auf B-Zellen und weiterer Differenzierung in beispielsweise Th1, Th2 und Th17 Zellen die zelluläre und humorale Immunantwort. Abhängig vom vorhandenen Zytokinprofil differenzieren T-Zellen zu unterschiedlichen Th-Zellen. In einem von Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (IFN- γ) geprägten Milieu entstehen Th1-Zellen. Sie produzieren vor allem IFN- γ , IL-2 und TNF- α und fördern eine zellvermittelte Immunantwort^{132–134}.

Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird vor allem durch IL-4 und IL-6 begünstigt. Sie sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und fördern die humorale, antikörpervermittelte Antworten sowie die Rekrutierung von Eosinophilen^{32,132,133}.

Th17-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von TGF- β und IL-6^{32,135}. Sie produzieren IL-17A, IL-17F und IL-22 und wirken proinflammatorisch. Insbesondere fördern sie die Neutrophilen Rekrutierung und Aktivierung, stärken die Schleimhautbarriere und verstärken die Produktion von weiteren proinflammatorischen Mediatoren^{32,132,136,137}.

T-regulatorische Zellen (Treg) sind durch ihre Expression von CD4 und CD25 Oberflächenmoleküle und dem Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box P3) charakterisiert und wirken suppressiv auf andere T-Zellen. Sie sezernieren insbesondere IL-10 und TGF- β und dämpfen überschießende Immunantworten^{31,32,130,132,138}.

Die T-Zell-Aktivierung erfordert neben der Antigenerkennung über MHC-Rezeptoren zusätzliche, kostimulatorische Signale die beispielsweise über Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 vermittelt werden^{139,140}. Diese Signale entscheiden über das Ausmaß und die Qualität der Immunantwort und sind essenziell für die Unterscheidung zwischen Toleranz und Aktivierung^{140–143}.

Entzündungsmediatoren und Biomarker

Zytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF- α gelten als zentrale Mediatoren einer Inflamationsreaktion und werden häufig als Biomarker^{144,145} für die Aktivität entzündlicher Erkrankungen herangezogen^{146,147}. IL-6 hat sich in der klinischen Diagnostik und Verlaufsbeurteilung systemischer Entzündungen und Autoimmunerkrankungen bewährt^{148,149}. IL-1 β wird vorwiegend von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert und wirkt stark proinflammatorisch. Es induziert die Produktion von Prostaglandinen, IL-6 und fördert die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten^{32,150}. TNF- α wird überwiegend von Makrophagen freigesetzt, fördert Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung und bewirkt durch Ausschüttung weiterer Zytokine die Aktivierung von Akute-Phase Proteinen^{151–154}. Zu diesen Proteinen zählen mitunter das C-reaktive Protein (CRP)^{155,156}, Fibrinogen^{157,158}, Procalcitonin, Haptoglobin und Komplementfaktoren, wie C3 und C4^{155,158,159}. Weitere Folgen der pro-inflammatorischen Effekte einer erhöhten TNF- α Sekretion sind Fieber, Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und Stimulation von Makrophagen zur Phagozytose^{32,151}.

Die Aufrechterhaltung einer intestinalen Homöostase beruht auf einer feinen Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Eine Dysregulation ist häufig bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zu beobachten und kann sowohl zu ihrer Entstehung als auch zur Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen^{160,161}. Wird die epitheliale Barriere gestört, treffen luminal Antigene auf Immunzellen der Mukosa^{162,163} und triggern inadäquate Immunreaktionen^{162,164,165}. Es treffen Dysbiose und Barriestörung auf ein PRR-System, dessen Signalbalance durch stammspezifische Flagellin-Eigenschaften geprägt werden können (insbesondere TLR5). Wie bereits oben beschrieben, deuten Vorarbeiten darauf hin, dass bestimmte Eigenschaften, wie Länge und Zusammensetzung der hypervariablen Region, die Stärke und Qualität der TLR5-Aktivierung bestimmen und damit zwischen pro- und antiinflammatorischen Effekten unterscheiden können. Der Stamm EcN bietet in diesem Kontext ein bereits etabliertes Mittel mit probiotischen Eigenschaften. Daraus leiten sich die zentralen Fragen dieser Arbeit ab: Besteht ein Zusammenhang zwischen der *fliC*-Länge und dem TLR5-Aktivierungspotenzial verschiedener kommensaler *E.coli*-Stämme, und lassen sich hierdurch stammspezifische Unterschiede in der Immunmodulation, insbesondere im Rahmen eines *in vivo* Modelles der DSS-induzierten Kolitis erklären?

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Trotz einiger etablierter Therapieansätze bleibt die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen weiterhin eine Herausforderung. Probiotische Bakterienstämme, wie EcN zeigen vielversprechende Effekte und sind bereits als Therapie etabliert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht abschließend verstanden. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen kann die zukünftige Entwicklung gezielter probiotischer Strategien zur Erhaltung der intestinalen Homöostase und Modulation der Entzündungsreaktion erleichtern. Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Hypothese, dass die Länge des *fliC* die Stärke und Qualität der TLR5-Aktivierung determiniert und damit stammspezifische, immunmodulatorisch, potenziell protektive Effekte kommensaler *E.coli* wesentlich mitprägen. Im Zentrum dieser Arbeit steht die Untersuchung des TLR5-Rezeptoraktivierungspotenzials von EcN, sowie weiterer kommensaler *E.coli* Stämme aus Stuhlproben gesunder Probanden. Vor diesem Hintergrund untersucht diese Arbeit, ob die Länge der *fliC*-Sequenz mit der Stärke der TLR5-Aktivierung korreliert und ob diese Eigenschaften maßgeblich zu probiotischen Effekten beiträgt. Um diese Fragestellung zu klären erfolgt zunächst die Charakterisierung der Stämme hinsichtlich ihrer *fliC*-Länge und anschließend ihrer TLR5-Aktivierungsfähigkeit in einem HEK-Zellmodell. Auf Basis dieses Screenings werden zwei Isolate mit kontrastierender *FliC*-Länge und TLR5-Aktivität ausgewählt und in murinen, knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen (BMDCs) hinsichtlich Reifungsmarkern (CD40, CD80, CD86, MHC-II) und Zytokinausschüttung (TNF- α , IL-1 β , IL-6) untersucht. Zusätzlich werden Wildtyp (WT) und Knockout-Mäuse wie TLR2/4^{-/-}, sowie TLR5^{-/-}BMDCs verwendet, um die spezifische Rolle von TLR5 einzuordnen. Knockout-Mäuse sind genetisch veränderte Mauslinien, bei denen spezifische Gene gezielt inaktiviert wurden. Abschließend werden die ausgewählten Isolate in einem *in vivo* DSS-Kolitismodell untersucht, um zu prüfen, ob ein Isolat mit langer *fliC*-Sequenz und hoher TLR5-Aktivität (CS238) protektive Effekte entfaltet, die jenen von EcN ähneln, während ein Isolat mit kurzer *fliC*-Sequenz und niedriger TLR5-Aktivität (CS222) geringere oder gar negative Wirkungen zeigt.

Dieses Stufendesign erlaubt es, struktur-funktionelle Zusammenhänge entlang der Kette Flagellin > TLR-Signal > Immunantwort > klinische/histologische Effekte zu testen.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gebrauchswaren und Geräte	Hersteller
Photometer	Eppendorf, Hamburg Nr. 6131 04987
Inkubator	Heraeus, Heidelberg
ELISA Washer	TECAN M8/4R Columbus Plus F109204
Tecan Infinite M200	Tecan
BD LSRFortessa	BD LSRFortessa™ Cell Analyzer,
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss LSM 710
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Preciss, Frankreich
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg Research plus
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttelinkubator 37°C	Multitron, INFORS, Bottmingen
Sterile Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Vortexer	Multimed, Kirchheim u. Teck Heidolph Reax top
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 517 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge miniSpin plus	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Zelllinien

Tabelle 1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293-hTLR5 Zellen	Invivogen

HEK 293-mTLR5 Zellen	Invivogen
HEK 293-Zellen	Invivogen

2.1.3. Mauslinien

Tabelle 2 Mauslinien

Mäuse	Herkunft
C57BL/6NCrl	Charles River
TLR 5 ^{-/-}	Eigenzüchtung (Background C57BL/6)
TLR2 ^{-/-} x TLR4 ^{-/-}	Eigenzüchtung (Background C57BL/6)

Diese Studie wurde in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Basler Deklaration durchgeführt. Sämtliche Protokolle und Experimente mit Mäusen wurden von den zuständigen Prüfungskommissionen sowie den lokalen Behörden geprüft und genehmigt (H1/15, H1/17, §4 vom 09.01.2015 und §4 vom 14.06.2017).

2.1.4. Bakterien

Tabelle 3 Bakterien

Bakterienstamm	Herkunft
<i>E. coli</i> Nissle (EcN)	MUTAFLOr
CS 17 Ec.Δ FliC	<i>E. coli</i> Isolat, Dr. Tobias Oelschlaeger (Universität Würzburg, Institut für Molekulare Infektionsbiologie)
CS 220	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 221	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 222	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 223	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 224	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen

CS 225	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 227	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 228	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 231	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 233	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 234	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 235	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 236	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 238	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 239	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 240	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 241	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 242	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 243	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 244	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 245	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen

CS 246	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 247	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 248	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 249	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 250	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen
CS 211	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 213	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 215	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 216	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 217	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 218	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 219	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe von IBS Patient, Erlangen
CS 222 pHP45Ω catR	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen. Transformation mit Chloramphenicolresistenz
CS 238 pHP45Ω catR	<i>E. coli</i> Isolat aus Stuhlprobe gesunder Probanden, Tübingen. Transformation mit Chloramphenicolresistenz

Die verwendeten Stuhlproben von Probanden ohne CED wurden zwischen August und Oktober 2016 unter Mitarbeitenden und Studierenden des Universitätsklinikums Tübingen gesammelt. Die Proben wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme verarbeitet. Die verwendeten CED-Stuhlproben wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. Yurdagül Zop (Universitätsklinikum Erlangen) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten gesammelt und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren gelagert. Vor der Probenentnahme wurden alle Proband:innen aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einwilligung ab. Die Studienprotokolle wurden von den Ethikkommissionen des Universitätsklinikums Tübingen (043/2023BO2) und des Universitätsklinikums Erlangen (145_16 B) genehmigt.

2.1.5. Medien, Chemikalien und Agar

2.1.5.1. Medien

Tabelle 4 Medien

Medium	Herkunft
Gibco® DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher
Gibco® RPMI Medium 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Thermo Fisher
Gibco® HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution	Thermo Fisher
Luria-Bertani (LB) Medium	BD Bioscience
Brain-Heart Infusion (BHI) Medium	BD Bioscience
Fc-Rezeptor-Block	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen

2.1.5.2. Chemikalien

Tabelle 5 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
------------	----------

Collagenase	Sigma Aldrich
<i>Dextran Sulfate Sodium Salt</i> (DSS) Chargennummer: Q3526	MPbio
DMSO	Roth
DNase	Sigma Aldrich
EDTA	Biochrom
Fetales Kälber Serum (FCS)	Sigma Aldrich
Gibco® DPBS Dulbecco's phosphate-buffered salina	Thermo Fisher
Gibco® PBS phosphate-buffered salina	Thermo Fisher
GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen
Gibco Hepes	Thermo Fisher
Lysozym	Sigma Aldrich
Non-Essential Aminoacids	Biochrom
β-Mercaptoethanol (50 µM)	Biochrom
Streptavidin	Roche
PFA 4%	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen
Saponin (1 g auf 100 ml PBS)	Sigma Aldrich
Sodium Pyruvat	Biochrom
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tween 20	Biochrom

2.1.5.3. Medienzusammensetzung

Tabelle 6 Medienzusammensetzung

Chemikalie	Herkunft
Separation Medium	HBSS 5 %FCS

	2 mM EDTA
Digestion Medium	M RPMI 1640 10 % FCS 58.27 µl DNase (27460 U/ml) 300 µl Collagenase (0,1 g/ml)
DC-Medium	RPMI 1640 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0.5 % β-Mercaptoethanol 1 % non-essential amino acids GM CSF
Wash Buffer	PBS 1 % FCS Cytokine Medium
HBSS	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0.1 % Gentamycin

2.1.5.4. Agar

Tabelle 7 Agar

Agar	Herkunft
Chloramphenicol-LB	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen
Endo-Agar	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen
Kanamycin-LB	Hausinterne Produktion, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen
LB	BD Bioscience

2.1.6. Antibiotika

Tabelle 8 Antibiotika

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma Aldrich
Blasticidin	10 µg/ml	Invivogen
Chloramphenicol	50 µg/ml	Sigma Aldrich
Gentamycin	10 µg/ml	Sigma Aldrich
Kanamycin	50 µg/ml	Sigma Aldrich
Normocin™	100 µg/ml	Invivogen
Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml	Biochrome
Vancomycin	100 µg/ml	Sigma Aldrich

2.1.7. TLR5 Ligand

Tabelle 9 TLR5 Ligand

TLR 5 Ligand	Hersteller
FLA-ST S. Typhimurium Flagellin Ultrapure	Invivogen

2.1.8. Kits

Tabelle 10 Kits

Kit	Hersteller
Maus IL-10 ELISA Set	BD OptEIA™
Maus IL-1β ELISA Set	BD OptEIA™
Maus IL-6 ELISA Set	BD OptEIA™
Maus TNF α ELISA Set	BD OptEIA™
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher

2.1.9. Antikörper

Tabelle 11 Antikörper

Antigen	Reaktivität	Fluorophor	Klon	Hersteller
---------	-------------	------------	------	------------

CD103	Maus	BV 510	M290	BD Bioscience
CD11b	Maus	FITC	M1/70	BD Bioscience
CD11c	Maus	PE-Cy7	HL3	BD Bioscience
CD11c	Maus	APC	HL3	BD Bioscience
CD19	Maus	BV421	1D3	BD Bioscience
CD25	Maus	PerCP-Cy5.5	PC61	BD Bioscience
CD3	Maus	APC	145-2C11	BD Bioscience
CD4	Maus	BV605	RM4-5	BD Bioscience
CD4	Maus	APC-H7	GK1.5	BD Bioscience
CD40	Maus	BV421	3/23	BD Bioscience
CD80	Maus	PerCP Cy5.5	16-10A1	BD Bioscience
CD86	Maus	PE-Cy7	GL1	BD Bioscience
FoxP3	Maus	AF647	MF23	BD Bioscience
Gr1	Maus	PE	RB6-8C5	BD Bioscience
IFN-γ	Maus	PE-Cy7	XMG1	BD Bioscience
IL10	Maus	PE	JES5-16E3	BD Bioscience
IL17a	Maus	APC-Cy7	TC11-18H10	BD Bioscience
IL4	Maus	PE	11B11	BD Bioscience
MHC-II	Maus	APC	M5/114.15.2	BD Bioscience
MHC-II	Maus	FITC	2G9	BD Bioscience

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung von Bakterien

Für die Anzucht der Bakterien wurde jeweils eine Einzelkolonie aus dem Agar in einem Gesamtvolumen von 5 ml LB-Medium angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Im Falle der Notwendigkeit wurden stammspezifische Selektivantibiotika, in der in Tabelle 8 angegebenen Endkonzentration zugesetzt. Am Folgetag wurde eine Subkultur im Verhältnis 1:100 mit frischem LB-Medium hergestellt und bei 37 °C in kontinuierlicher Bewegung im Schüttelinkubator für 2,5 h inkubiert. Die entstandene Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4000 g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde

zur weiteren Verarbeitung und Quantifizierung in sterilem PBS gelöst, (1 ml für Zellstimulation, 5ml für Trinkwasserherstellung) der restliche Überstand wurde verworfen.

2.2.2. Transformation von Bakterien

Zur Markierung ausgewählter Bakterienstämme (Unterscheidbarkeit zur endogenen Darmmikrobiota) wurden chemisch kompetente Bakterien erzeugt und anschließend mit einem Resistenzplasmid transformiert. Dazu wurden insgesamt vier Arbeitslösungen hergestellt.

Tabelle 12 Mediumzusammensetzung Transformation

Medium	Zusammensetzung
Transformations Arbeitslösung I 1M CaCl₂ (1 Liter)	111g CaCl ₂ + 1 Liter destilliertes Wasser. Durch ein 0,22m Sieb filtriert
Transformations Arbeitslösung II 0,1M CaCl₂ (1 Liter)	100ml 1M CaCl ₂ Lösung + 900 ml destilliertes Wasser. Durch ein 0,22m Sieb filtriert
Transformations Arbeitslösung III 50% Glycerol (500ml)	50ml Glycerol + 50 ml destilliertes, autoklaviertes Wasser
Transformations Arbeitslösung IV 0,1M CaCl₂ + 15% Glycerol (1 Liter)	100ml 1M CaCl ₂ + 300ml 50% Glycerol + 600ml destilliertes Wasser.

Die ausgewählten Stämme *E. coli* CS222 und *E. coli* CS 238 wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde eine Einzelkolonie in 4 ml LB Medium über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag mit 400 ml frischem LB Medium in einem 2-Liter Erlenmeyer Kolben bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach 2-3 h wurde eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4-0,6 erreicht und die Zellen in 16 x 50 ml Falcons verteilt und für 20 min auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 4°C für 10min und 3000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets pro Stamm gepoolt, in 24 ml eiskaltem 0,1M CaCl₂ gelöst und für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Bakterien wiederholt bei 4°C für 10 min und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 6,4 ml kaltem

0,1M CaCl₂ + 15% Glycerol resuspendiert. Jeweils 100 µl der Bakterienlösung wurde in eiskalte 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die kompetenten Zellen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die Transformation der Bakterien mit dem Antibiotikaresistenzplasmid gegen Chloramphenicol wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Die Plasmidlösung mit dem Vektor pHP45omega-Cm der Firma ATCC wurde vorsichtig hinzupipettiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Im weiteren Schritt wurden die Zellen bei 42 °C für 45 sec. einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. 1 ml frisches LB-Medium wurde dazugegeben und die Zellen bei 37 °C für 2 h schüttelnd inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 100 µl der Lösung auf eine Chloramphenicol-LB Agarplatte ausplattiert und der Rest der Lösung bei 5000 g, 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand, bis auf 100 µl abgenommen. Das Pellet wurde in 100µl LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren Chloramphenicol-LB Platten ausplattiert. Diese wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend aus den Kolonien Bakterienstocks nach 2.2.1. hergestellt.

2.2.3. Quantifizierung von Bakterien

Bei der Benutzung von Bakterien für Experimente wurde eine Bakterienkonzentration entsprechend einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 10 für *in vitro* Versuche bzw. 1 und 100×10^5 Bakterien pro ml für *in vivo* Versuche benötigt. Die benötigte Bakterienmenge setzt sich hierbei aus der Anzahl der Zellen x MOI x Anzahl der Wells zusammen (MOI = Bakterienzahl pro Well / Zellzahl pro Well). Die aus einer Subkultur gewonnenen Bakterien wurden im Verhältnis 1:20 mit sterilem PBS verdünnt und bei einer Optischen Dichte von 600nm gemessen. Dabei gilt der Wert 1 bei OD₆₀₀ = 5×10^5 Bakterien pro ml als Konstante.

2.2.4. Trinkwasserzubereitung mit Bakterien für Mäuse

Für die Kolonisation über das Trinkwasser wurden die jeweiligen *E.coli*-Stämme aus einer Übernachtskultur in eine Subkultur überführt und mit zugesetztem Selektivantibiotika kultiviert. Die so entstandenen Kulturen wurden anschließend pelletiert und zweimal in sterilem PBS gewaschen, um Nährmedium und Selektivantibiotika zu entfernen. Es wurden pro Käfig mit fünf Mäusen 200 ml autoklaviertes Trinkwasser in sterilen Trinkflaschen vorgelegt und die

benötigte Bakterienmenge zugesetzt, sodass eine Konzentration von 1×10^8 Bakterien/ml in 200 ml vorlag.

2.2.5. Erhebung der CFU (colony forming units) aus Mausexkrementen

Frische Kotpellets der Mäuse wurden zur Erhebung der CFU vor und nach der Kolonisierung gesammelt, gewogen und in 1000 µl sterilem PBS aufgelöst. In 1:10 Verdünnungsstufen wurden die Stuhlösungen auf LB Agar Platten mit Selektivantibiotika (Chloramphenicol) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt.

2.2.6. Untersuchung des Schwärmverhalten von Bakterien

Für die Erfassung der Swarming-Motilität (schwarmartiges Ausbreitungsverhalten) wurden LB-Agarplatten mit 0,5 % Agar gegossen und unter einer Sterilbank vorgetrocknet. Übernachtskulturen der Bakterien wurden zuvor vorbereitet. Anschließend wurden jeweils 5 µl der Übernachtskultur in die Mitte der Agarplatte oberflächlich zentral aufgetragen und für 5 min zum Trocknen gestellt. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Bakterienhöfe vermessen und fotodokumentiert.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Zellkultivierung und Zellstimulation

HEK 293 Zellen, die den humanen oder murinen TLR5 überexprimieren, wurden mit *E.coli* Isolaten aus Stuhlproben gesunder Probanden stimuliert. Die kryokonservierten Zelllinien wurden zunächst in T25 Zellkulturflaschen kultiviert und nach der dritten Passage in T175 Flaschen überführt. Bei jedem Umsetzen der Zellen in neue T175-Zellkulturflaschen wurden die Selektivantibiotika Normocin (2 µl/ml) und Blasticidin (1 µl/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst und in 50 ml Falcons überführt. Zellen der gleichen Zelllinie wurden gepoolt und bei Raumtemperatur bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem HEK-Medium gelöst. Die Zellen wurden mit Trypanblau, einem Farbstoff zur Bestimmung der Zellviabilität gefärbt und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Kammern}} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} = \text{Zellen/ml}$$

Es wurden 2×10^5 Zellen/Well in 24-well Platten in einem Volumen von 1 ml/Well inklusive Selektivantibiotika ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Stimulation erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit HEK Medium ohne Selektivantibiotika. Nach 1h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit den jeweiligen Bakterienstämmen mit einer MOI von 10 oder mit ultrapurem Flagellin von *S. Typhimurium* als Positivkontrolle mit einer Zielkonzentration von 100 ng/μl in einem Gesamtvolumen von 1 ml/Well stimuliert. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde jeweils 2,5 μl Gentamycin pro Well pipettiert, um das Bakterienwachstum zu stoppen. Anschließend wurden die Platten für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, bei RT, 1000 g und 5 min zentrifugiert und anschließend in 2 ml Eppendorfgefäße bei -20 °C zur Lagerung eingefroren.

Tabelle 13 Verwendete Stimulanzen für HEK-Zell Stimulation

Stimulanz	Konzentration im Well
Flagellin UP	Konzentration (100 ng/μl)
<i>EcN</i>	MOI 10
<i>EcN</i> delta FliC	MOI 10
CS 222	MOI 10
CS 238	MOI 10
CS 228	MOI 10
CS 224	MOI 10
CS 233	MOI 10
CS 247	MOI 10
CS 250	MOI 10
CS 248	MOI 10
CS 221	MOI 10
CS 220	MOI 10
CS 243	MOI 10
CS 223	MOI 10

CS 227	MOI 10
CS 239	MOI 10
CS 234	MOI 10
CS 246	MOI 10
CS 244	MOI 10
CS 225	MOI 10
CS 235	MOI 10
CS 236	MOI 10
CS 231	MOI 10
CS 240	MOI 10
CS 249	MOI 10
CS 245	MOI 10
CS 241	MOI 10
CS 242	MOI 10
CS 222 pHP45Ω catR	MOI 10
CS 238 pHP45Ω catR	MOI 10

2.3.2. Murine knochenmarkabgeleitete dendritische Zellen (*bone marrow derived dendritic cells (mBMDCs)*)

2.3.2.1. Kultivierung und Differenzierung von mBMDCs

Zur Untersuchung des Einflusses der Bakterienstämme auf die Maturation unreifer BMDCs und deren Immunantwort, wurden aus Knochenmarkzellen murine BMDCs differenziert.

Hierfür wurden die muriner knochenmarkabgeleiteter dendritische Zellen (BMDCs) von Wildtyp-Mäusen sowie von TLR5 Knock-out- und TLR2/4 Knock-out-Mäusen (TLR2/4^{-/-} und TLR5^{-/-}) verwendet. Die Mäuse wurden durch CO₂ Zufuhr und zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden Femur und Tibia entnommen, vollständig von Muskel- und Bindegewebe befreit, an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark mithilfe einer sterilen Kanüle mit PBS ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde in sterilem PBS gesammelt, die Zellsuspension anschließend durch ein 100µm Sieb filtriert und bei RT für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10ml vorgewärmten DC-Medium aufgelöst. Die Zellen der gleichen Mauslinie wurden zusammengeführt und mit

Trypanblau gefärbt. Die lebenden (ungefärbten) Zellen wurden ausgezählt, in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Petrischale in einem Volumen von 10 ml Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach vier Tagen wurden jeweils 10ml angewärmtes DC Medium hinzugefügt, um die Zellkultur mit frischen Nährstoffen zu versorgen. An Tag 6 der Kultivierung erfolgte ein weiterer Mediumswechsel. Dazu wurde aus jeder Petrischale 10ml des alten Mediums entnommen und in 50 ml Falcons gepoolt. die Falcons wurden bei 400 g für 5 min zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in DC Medium resuspendiert, auf die Petrischalen verteilt und jeweils 10 ml frisches DC Medium hinzugefügt. Parallel wurden am selben Tag Übernachtskulturen der für die Versuche vorgesehenen Bakterienstämme angesetzt, um die anschließenden Stimulationsexperimente vorzubereiten.

2.3.2.2. Stimulation von mBMDCs

Am siebten Kultivierungstag wurden die mBMDCs vorsichtig mit sterilen Zellschabern aus den Petrischalen gelöst und die Zellsuspension in 50 ml Falcons gesammelt. Zellen einer Mauslinie wurden gepoolt und anschließend bei 400 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem DC Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter denselben Bedingungen wurde das entstandene Pellet erneut in 10 ml DC Medium resuspendiert und die Zellen gezählt. Zur Vorbereitung auf die Stimulation der Zellen mit Bakterien wurden die Zellen in 12-Well Platten in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml pro Well ausgesät. Um Bakterienwachstum zu vermeiden und die MOI konstant zu halten, wurden 1 µl Gentamicin pro Well zugesetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden die Zellen für 24 h nach Tabelle 12 mit Bakterienstämmen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen erneut mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Ein letztes Mal wurde bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in 2ml Eppendorfgefäße für spätere ELISA-Analysen bei -20 °C eingefroren. Die Zellpellets wurden für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

Tabelle 14 Verwendete Stimuli für Zellen der Mauslinien WT, TLR5^{-/-} und TLR2/4^{-/-}

Stimulanz	Konzentration
Flagellin Ultrapure	100 ng/ml
Flagellin Ultrapure	1000 ng/ml

<i>EcN</i>	MOI 10
<i>EcN</i>	MOI 1
<i>EcN</i> delta FliC	MOI 10
<i>EcN</i> delta FliC	MOI 1
CS 222	MOI 10
CS 222	MOI 1
CS 238	MOI 10
CS 238	MOI 1
MOCK	/

2.3.2.3. Mausmodell mit DSS-induzierter Kolitis

Zur Untersuchung der Mechanismen, die zur Pathogenese und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beitragen können, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, die akute oder chronische Entzündungsprozesse des Darms nachbilden. Eines der am häufigsten verwendeten Modelle ist die durch Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) induzierte Kolitis im Mausmodell. Dieses Modell zeichnet sich vor allem durch seine Reproduzierbarkeit, ihrer Einfachheit in der Ausführung und den Ähnlichkeiten zu humanen entzündlichen Darmerkrankungen aus¹⁶⁶. DSS ist ein sulfoniertes Polysaccharid mit einer Molekülgröße zwischen 5-1400 kDa. Der genaue Mechanismus einer durch DSS induzierten Kolitis ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die Gabe von DSS führt jedoch zu einer Schädigung der epithelialen Darmbarriere, wodurch die Permeabilität für luminale Bakterien in tiefere Darmschichten erhöht wird¹⁶⁷ und mikrobiell getriggerte Entzündungsreaktionen in der Mukosa ausgelöst werden können. Durch dieses Modell ist es möglich, die Prozesse des angeborenen Immunsystems unter reproduzierbaren, definierten Rahmenbedingungen zu untersuchen. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich weibliche Mäuse gleichen Alters und ähnlichen Gewichts (durchschnittlich 19-21g) verwendet. Nach der Akklimatisierungsphase wurden die Tiere in vier Gruppen mit jeweils fünf Tieren aufgeteilt. Bei der Gruppenaufteilung wurde darauf geachtet, dass die Mäuse durch individuelle, äußerliche Merkmale wie Pigmentierung des Schwanzes eindeutig unterscheidbar waren. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierhaltungseinrichtung der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Tübingen.

Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe und erhielt über den Verlauf des Experiments ausschließlich DSS im Trinkwasser, beginnend am Tag 7. Die Gruppen 2, 3 und 4 erhielten ab Tag 7 ebenfalls 2,5% DSS im Trinkwasser, wurden jedoch zusätzlich mit unterschiedlichen *E.coli* Stämmen kolonisiert:

Gruppe 2: *E.coli* Nissle 1917

Gruppe 3: *E.coli* Isolat CS 222 pHP45Ω catR

Gruppe 4: *E.coli* Isolat CS 238 pHP45Ω catR

Die Bakterien wurden in einer Konzentration von 5×10^8 Bakterien/ml im Trinkwasser verabreicht. Die Tiere der Gruppen 2, 3 und 4 erhielten bereits drei Tage vor Beginn der DSS-Gabe kontinuierlich das bakterienhaltige Trinkwasser, um eine stabile Besiedelung des Darms zu gewährleisten. Die Trinkwasserlösung wurde in allen Gruppen alle 2-3 Tage frisch angesetzt.

Am Tag vor einem Trinkwasserwechsel wurden Übernachtkulturen der Bakterien nach 2.2.4. vorbereitet. Ab Tag 7 erfolgte die tägliche Erhebung des Disease-Activity-Index^{168,169} (DAI) entsprechend Tabelle 14, ergänzt durch die tägliche Gewichtskontrolle. An Tag 2 und Tag 8 wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt und am Tag 10 ausgeschleust. (Abbildung 5)

Tabelle 15 DAI (Disease activity index) Score

Kriterium	Beurteilung			
Haltung	Normal	Leichte Einschränkung Bewegung Aktivität	Starke Einschränkung Bewegung Aktivität	Schonhaltung und kaum Bewegung oder Aktivität
	0,0	1,0	2,0	3,0
Fell	Glatte Fell	Leicht zerfranst	Stark zerfranste Fell	
	0,0	2,0	3,0	
Blut im Stuhl	Kein		Blut im Stuhl	
	0,0		3,0	
Stuhl-konsistenz	Normal	Weich	Dünneflüssig	Wässrig
	0,0	1,0	2,0	3,0
After	Normal	Entzündet	Blutig	Stark Blutig
	0,0	1,0	2,0	3,0

Am Tag der Präparation wurden die Mäuse ein letztes Mal gemäß des DAI Score beurteilt und das Gewicht dokumentiert. Anschließend wurden die Tiere durch CO₂ Zufuhr und Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Die Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen und das Kolon in seiner ganzen Länge abgesetzt. Milz und Lymphknoten wurden in 15ml Falcons mit PBS/FCS auf Eis gelagert. Die Kolonlänge wurde vollständig gemessen.

2.3.2.4. Isolation der Lamina propria Zellen des Kolons

Aus den gewonnenen Kolonpräparaten wurden von oral nach aboral jeweils ein Kolonstück für histologische Schnitte und ein Kolonstück (0,5 cm) zur Bestimmung der Zytokinkonzentration

entnommen. Zusätzlich wurden zwei Stuhlproben aus dem Kolon entnommen. Das restliche Kolon wurde der Länge nach aufgeschnitten, in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS + 1 % FCS gesäubert und in etwa 1,5 cm lange Stücke geschnitten. Die Stuhlproben wurden auf antibiotikahaltigen Endoplaten ausplattiert, um die Menge der über das Trinkwasser verabreichten Bakterien in koloniebildenden Einheiten (CFU) zu bestimmen.

Die Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden durch ein 100 μm Sieb filtriert, in einem 50 ml Falcon gesammelt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml HBSS Medium resuspendiert und für weitere Analysen bei 4 °C gelagert.

Die gereinigten Kolonsegmente wurden in 50 ml Flaschen mit 30 ml vorgewärmten Separationsmedium gegeben und bei 37 °C für 20 min unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebesuspensionen gevortext und durch ein 100 μm Zellsieb filtriert, um die Epithelzellen zu entfernen. Der Durchfluss wurde verworfen, während die im Sieb gesammelten Darmstücke erneut in 30 ml frischem Separationsmedium inkubiert wurden (zweimalige Wiederholung, jeweils 20 Minuten bei 37 °C).

Die so behandelten Gewebestücke wurden anschließend mechanisch zerkleinert und in 50 ml Flaschen mit vorgewärmten RPMI Medium + 10 % FCS, Collagenase und DNase gegeben, um das Gewebe enzymatisch weiter zu zerkleinern und um letztendlich die Lamina propria Zellen des Kolons zu gewinnen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C unter konstantem Rühren wurde die entstandene Zellsuspension erneut durch ein 100 μm Zellsieb filtriert. Diesmal wurde der Durchfluss gesammelt, mit gekühltem HBSS Medium auf 50 ml aufgefüllt und bei 400 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde mit 50 ml kaltem HBSS Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Zellzahlbestimmung in 1ml HBSS Medium gelöst und für weitere Analysen bei 4 °C gelagert. Die Lamina propria Zellen für die T-Zellfärbung wurden in T-cell activation cocktail inkubiert und anschließend bis zur weiteren Analyse gekühlt gelagert.

2.3.2.5. Zytokinproduktion

Um die Zytokinproduktion der Darmzellen der unterschiedlichen Gruppen zu vergleichen wurde jeder Maus jeweils ein Stück Colon entnommen und in 1 ml Zytokinmedium auf einer 12-well Platte inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und bei RT, bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Beim entstandenen Überstand wurde der Proteingehalt mithilfe des

Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt und anschließend in 2 ml Eppendorfgefäße bei -20 °C für weitere Analysen eingefroren.

2.3.2.6. Histologischer Colitis Score

Am Tag der Ausschleusung wurden den Mäusen das Kolon entnommen und histologische Schnitte in H&E Färbung gefertigt (Abbildung 7B). Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mikroskopisch und die Bewertung anhand eines standardisierten Histological Colitis Score (HCS)^{170,171}. In die Bewertung flossen die Integrität der Kryptenarchitektur, das Vorliegen von Ulzerationen sowie das Ausmaß der mukosalen Infiltration durch Entzündungszellen ein. Der niedrigste Score lag in jeder Kategorie bei 0 Punkten (physiologischer Zustand) und maximal bei 3 Punkten (stark entzündlich verändert). (vgl. Tabelle 16)

Tabelle 16 *Histological Kolitis Score*

Kriterium	Score (0–3)	Beschreibung
Architektur der Krypten	0	Intakt – keine Veränderungen
	1	Leichte Veränderungen, geringfügige Verzerrung
	2	Deutliche Veränderung, mehrere Krypten betroffen
	3	Massive Zerstörung oder Verlust der Kryptenstruktur
Mukosale Entzündungszellen	0	Keine Infiltrate – normales Erscheinungsbild
	1	Leichte Infiltration – vereinzelte Entzündungszellen
	2	Mäßige Infiltration – diffuse Zellansammlungen in der Mukosa
	3	Stark ausgeprägte Infiltration – dichte Zellinfiltrate auf ganzer Fläche
Ulzera / Erosionen	0	Keine Erosionen oder Ulzera
	1	Leichte Erosion – wenige oberflächliche Läsionen
	2	Ausgeprägte Ulzera – tiefer oder größer, mehrere Bereiche betroffen
	3	Massive Ulzeration – weitflächige Erosionen über große Abschnitte

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.4.1.1. Interleukin 8 (IL-8) ELISA

Der Capture-Antikörper wurde in Binding-Solution gelöst und jeweils 50µl pro well in eine 96-well-Platte mit Flachboden von Nunc pipettiert und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Eine 96-well Platte wurde mit 50µl Capture-Antikörper pro well über Nacht bei 4°C gecoatet. Am nächsten Tag wurde die Platte gewaschen und mit Blocking Puffer für 1-2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und Standard und Proben aufgetragen und für weitere 2h inkubiert. Der Detection-Antikörper wurde vorbereitet und nach einem weiteren Waschvorgang auf die Platte aufgetragen. Nach 1h Inkubationszeit und einem Waschzyklus wurde die Konjugatlösung aufgetragen und die Platte erneut für 1h inkubiert und anschließend gewaschen, bevor die Substratlösung hinzugegeben wurde. Nach 20-60min bei 37°C und Dunkelheit wurde die optische Dichte im ELISA Infinite F50 Absorbance Microplate Reader bei einer Referenzwellenlänge von 405nm gemessen.

2.4.1.2. IL-1 β , IL-6, IL-10, Tumor nekrose faktor α (TNF α) ELISA

Die ELISAs wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um die aus der Lamina propria des Kolons isolierten Zellen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu charakterisieren. Dabei erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Immunzellpopulationen, einschließlich regulatorischer T-Zellen (Tregs) sowie Th1-, Th2- und Th17-Zellen und neutrophiler Granulozyten. Die Zellen wurden zunächst anhand ihrer zellulären Größe und Granularität vorselektiert und anschließend mithilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper gegen populationsspezifische Oberflächenmarker und intrazelluläre Proteine gefärbt.

Durch die kombinierte Analyse dieser Parameter konnten die unterschiedlichen Zellpopulationen eindeutig klassifiziert und quantifiziert werden.

Zellfixierung

Bevor die Zellen in 300 µl FC-Block Lösung resuspendiert wurden, um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche zu blockieren, wurden die Zellen bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Zu jedem Eppendorfgefäß mit Zellen wurde 1,5 ml PBS/FCS hinzugegeben und ein weiteres Mal bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, jedes Pellet in 200 µl Cytofix/Cytoperm zur Fixierung resuspendiert und anschließend für 20 min bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift, bei dem in jedes Eppendorfgefäß 1,5 ml PBS/FCS pipettiert und ein letztes Mal bei 400 g für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 200 µl Perm/Wash Medium bis zur Färbung im Kühlschrank gelagert.

Zellfärbung

Zur Färbung der Zellen wurden diese durchmischt und gleichmäßig in einem Volumen von 100 µl auf 96-V-Bottom Platten verteilt. Der Antikörper-Mastermix wurden nach den Tabellen 17, 19 und 21 angesetzt und 50 µl in jedes Well pipettiert, mit Ausnahme der Wells mit Kontrollzellen. Kontrollzellen wurden nach den jeweils einzelnen, in Tabelle 18, 20 und 22 aufgeführten Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 150 µl Perm/Wash resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die entstandenen Zellpellets wurden in 80 µl PBS/1%FCS resuspendiert, in FACS-Tubes überführt und am gleichen Tag analysiert.

Tabelle 17 Antikörper Mastermix für regulatorische T-Zellen

Medium/Antikörper	Konzentration [µl pro Sample]
PBS/FCS	-
CD19 BV421	0,5
CD4 BV605	0,5
FoxP3 AF647	1

CD25 PerCP-Cy5.5	0,5
IL10 PE	1

Tabelle 18 Kontrollfärbung für regulatorische T-Zellen

Name	Zellen	CD19 BV421	CD4 BV605	FoxP3 AF647	CD25 PerCP- Cy5.5	IL10 PE
K1	Pool	-	-	-	-	-
K2	Pool	0,5	-	-	-	-
K3	Pool	-	0,5	-	-	-
K4	Pool	-	-	0,5	-	-
K5	Pool	-	-		0,5	-
K6	Pool	-	-	-	-	0,5
K7	Pool	-	0,5	0,5	0,5	0,5
K8	Pool	0,5	-	0,5	0,5	0,5
K9	Pool	0,5	0,5	-	0,5	0,5
K10	Pool	0,5	0,5	0,5	-	0,5
K11	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	-

Tabelle 19 Antikörper Mastermix für Th1 Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen

Medium/Antikörper	Konzentration [µl pro Sample]
PBS/FCS	-
CD19 BV421	0,5
CD4 BV605	0,5
IL17A APC-Cy7	1
IFN γ PE-Cy7	1
IL4 PE	1
CD3 APC	0,5

Tabelle 20 Kontrollfärbung für Th1 Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen

Name	Zellen	CD19 BV421	CD4 BV605	IL17A APC-Cy7	IFNγ PE Cy7	IL4 PE	CD3 APC
K1	Pool	-	-	-	-	-	-
K2	Pool	0,5	-	-	-	-	-
K3	Pool	-	0,5	-	-	-	-
K4	Pool	-	-	0,5	-	-	-
K5	Pool	-	-	-	0,5	-	-
K6	Pool	-	-	-	-	0,5	-
K7	Pool	-	-	-	-	-	0,5
K8	Pool	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K9	Pool	0,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5
K10	Pool	0,5	0,5	-	0,5	0,5	0,5
K11	Pool	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5
K12	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
K13	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-

Tabelle 21 Antikörper Mastermix für regulatorische DCs und Neutrophile Granulozyten

Medium/Antikörper	Konzentration [μl pro Sample]	
PBS/FCS	-	
CD11c PE-Cy7	0,5	
CD11b FITC	0,5	
MHC-II APC	0,5	
CD103 BV510	0,5	
Gr1 PE	0,5	
CD4 APC-H7	0,5	
CD19 BV421	0,5	

Tabelle 22 Kontrollfärbung für regulatorische DCs und Neutrophile Granulozyten

Name	Zellen	CD11c PE-Cy7	CD11b FITC	MHC-II APC	CD103 BV510	Gr1 PE	CD4 APC-H7	CD19 BV421
K1	Pool	-	-	-	-	-	-	-
K2	Pool	0,5	-	-	-	-	-	-
K3	Pool	-	0,5	-	-	-	-	-
K4	Pool	-	-	0,5	-	-	-	-
K5	Pool	-	-	-	0,5	-	-	-
K6	Pool	-	-	-	-	0,5	-	-
K7	Pool	-	-	-	-	-	0,5	-
K8	Pool	-	-	-	-	-	-	0,5
K9	Pool	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K10	Pool	0,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K11	Pool	0,5	0,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5
K12	Pool	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5	0,5
K13	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5
K14	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
K15	Pool	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-

Als Kontrollfärbung dienten ungefärbte Zellen sowie gefärbte Zellen mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff (single stain control). Als weitere Kontrolle diente eine Färbung nach FMO Schema (fluorescence minus one). Zunächst wurden im Forward-Side-Scatter (FSC vs. SSC) Zelltrümmer von intakten Zellen getrennt. Anschließend erfolgte die Ausschlusskontrolle von Dubletten durch den Vergleich der Signalhöhe (FSC-H) mit der Fläche unter der Signalkurve (FSC-A). Alle weiteren Analysen erfolgten ausschließlich mit viablen Zellen. Unter Verwendung der jeweiligen FMO-Kontrollen wurden populationsspezifische Marker präzise definiert und die entsprechenden Subpopulationen identifiziert. Die populationsspezifischen Marker wurden nach Literatur und Herstellerangaben ausgewählt. Die resultierenden Zellpopulationen wurden quantitativ ausgewertet, wobei sowohl absolute Zellzahlen als auch prozentuale Anteile berechnet wurden. Die Datenanalyse erfolgte mit den Programmen FlowJo V10 (BD Biosciences) und GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Die statistische Analyse und grafische

Darstellung der Ergebnisse erfolgte in GraphPad Prism. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA zum Vergleich der verschiedenen Gruppen; ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Länge der *fliC*-Sequenz variiert in *E.coli* Isolaten gesunder Probanden

Da angenommen wird, dass die Länge der *fliC*-Sequenz bei *E.coli* Stämmen einen wesentlichen Einfluss auf deren probiotisches Potenzial im Menschen haben kann⁶⁹, wurden zunächst unterschiedliche *Escherichia coli* Stämme (Tabelle 23) aus Stuhlproben gesunder Probanden isoliert und von Thomas Hagemann, Doktorand der Arbeitsgruppe Frick, mittels MALDI-TOF-Analyse und 16S-rRNA-PCR analysiert. Zur Charakterisierung der Flagellin-aminosäuresequenz erfolgte eine Analyse der Sequenzen mithilfe der „Bacterial Analysis Pipeline“ des „Center for genomic epidemiology“ (CGE). Die Flagellin-Gene (*fliC*) wurden anschließend mithilfe der Software Artemis durch BLAST-Analysen identifiziert und extrahiert. Ziel war es, die vollständige Aminosäuresequenz des Flagellins der einzelnen Isolate zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Die Analysen zeigten, dass die Länge der *fliC*-Sequenzen zwischen den einzelnen Isolaten stark variierte. Insgesamt lag die Länge zwischen 349 und 597 Aminosäuren. Die *fliC*-Sequenzlänge des probiotischen Referenzstamm EcN betrug 595 Aminosäuren.

Die Stämme CS221, CS223, CS227, CS233, CS234, CS235, CS238, CS239, CS240, CS241, CS242, CS246, CS247, CS248, CS249 und CS250 wiesen *fliC*-Sequenzlängen zwischen 500 und 597 Aminosäuren auf und lagen damit im oberen Längenbereich aller untersuchten Stämme. Die Stämme CS224, CS225 und CS244 lagen mit einer *fliC*-Sequenzlänge zwischen 400 und 500 Aminosäuren im mittleren Längenbereich. Die übrigen Stämme CS222, CS228, CS231, CS236, CS243 und CS245 lagen mit zwischen 300 und 400 Aminosäuren im unteren Längenbereich.

Tabelle 23 Bakteriencharakterisierung und fliC-Sequenzlänge Benennung nach Stammsammlung des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen (CS-Nummer) und offizieller Bakterienstammbezeichnung nach „Centrum for Genomic Epidemiology (CGE)“. Die durch die Durchführung einer Ganzgenomsequenzierung (WGS) erhaltenen Sequenzdaten wurden mithilfe der bakteriellen Analyse-Pipeline des CGE ausgewertet.

Isolat	Bakterienstamm nach CGE	Genetisch codierte Resistenzen	Größe des Flagellins (AS)
EcN	<i>E.coli</i> Nissle 1917	Chloramphenicol	595
CS221	<i>E.coli</i> [ST-73]	/	597
CS222	<i>E.coli</i> [ST-10]	Aminoglykosid, Sulfonamid, β -Lactam	349
CS223	<i>E.coli</i> [ST-69]	Tetrazyklin, β -Lactam	554

CS224	<i>E.coli</i> [ST-5308]	/	486
CS225	<i>E.coli</i> [ST-10]	/	420
CS227	<i>E.coli</i> [ST-399]	/	595
CS228	<i>E.coli</i> [ST-10]	/	349
CS231	<i>E.coli</i> [ST-10]	/	349
CS233	<i>E.coli</i> [ST-73]	Aminoglykosid, Sulfonamid	595
CS234	<i>E.coli</i> [ST-95]	/	585
CS235	<i>E.coli</i> [ST-394]	β -Lactam	554
CS236	<i>E.coli</i> [ST-131]	Aminoglykosid, Makrolid, Sulfonamid, Trimethoprim, Tetrazyklin, β -Lactam	349
CS238	<i>E.coli</i> [ST-1249]	/	550
CS239	<i>E.coli</i> [ST-95]	Aminoglykosid, Sulfonamid, β -Lactam	585
CS240	<i>E.coli</i> [ST-127]	/	555
CS241	<i>E.coli</i> [ST-127]	Tetracycline	555
CS242	<i>E.coli</i> [ST-3075]	Trimethoprim, Tetracycline, Phenicol	570
CS243	<i>E.coli</i> [ST-131]	Aminoglykosid, Makrolid, Sulfonamid, Trimethoprim, Tetrazyklin, β -Lactam	349
CS244	<i>E.coli</i> [ST-8184]	/	436
CS245	<i>E.coli</i> [Unknown ST]	/	349
CS246	<i>E.coli</i> [ST-95]	/	585
CS247	<i>E.coli</i> [ST-73]	/	597
CS248	<i>E.coli</i> [ST-5296]	/	576
CS249	<i>E.coli</i> [ST-95]	/	585
CS250	<i>E.coli</i> [ST-1249]	/	550

3.2. Ausgeprägte Unterschiede im Schwärmverhalten zwischen den unterschiedlichen *E.coli*-Isolaten

Für wachsende Bakterienkolonien ist die Fähigkeit sich auf Oberflächen oder Flüssigkeiten auszubreiten essenziell, um sich entlang des Nährstoffangebotes fortzubewegen, die Kolonie zu vergrößern oder neue Nischen zu besiedeln⁶². Dabei wird zwischen Fortbewegung in flüssigem Medium (Schwimmen) und Fortbewegung auf Oberflächen (Schwärmen) unterschieden^{61,62,172}. Voraussetzung für beide Formen der Fortbewegung ist die Ausbildung von funktionsfähigen Flagellen^{9,10}. Zur Überprüfung der Flagellenfunktionalität wurde ein sogenanntes ‚Swarming Assay‘ durchgeführt. Hierbei wurden die *E.coli* Stämme auf 0,3% LB-Agar Platten aufgetragen und nach 24 h Inkubation das Ausbreitungsverhalten durch Messung des Schwarmhofs erfasst (Abb. 1).

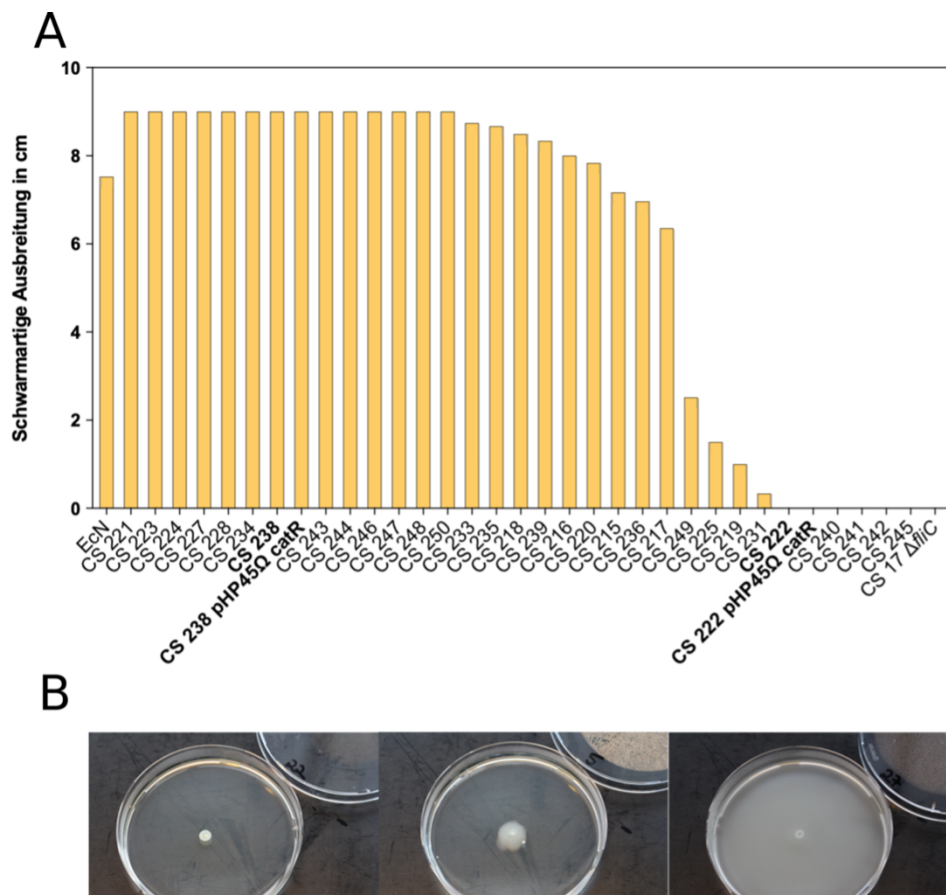


Abbildung 1 Schwarmartige Ausbreitung der *E.coli* Stämme auf LB-Agarplatten **A** Untersuchung des schwarmartigen Ausbreitungsverhaltens der *E.coli* Stämme in cm nach 24 h Inkubation auf 0,3% LB-Agar Platten. Ergebnisse beruhen auf 5 Replikate pro Stamm, gezeigt ist der Median. **B** Exemplarische Beispiele von niedrigem, mittlerem und hohem Schwärmverhalten auf 0,3 % LB-Agar Platten

Alle aus den Stuhlproben der gesunden Probanden isolierten Stämme, sowie auch EcN wurden untersucht. Dieser zeigte mit durchschnittlich 7,5cm einen ausgeprägten Schwarmhof und zählt damit zu den Stämmen mit hohem Schwärmverhalten. Als eine Negativkontrolle diente der Stamm CS17 Δ *fliC*, bei dem das *fliC*-Gen deletiert wurde und somit keine Flagellenbildung erfolgt. CS17 Δ *fliC* zeigte erwartungsgemäß kein Schwärmverhalten.

Die *Abbildung 1 A* verdeutlicht die erheblichen Unterschiede im Schwärmverhalten zwischen den einzelnen Stämmen. Die Durchmesser der Schwärme variierten zwischen 0 cm (keine Ausbreitung, Verharren der Bakterien am Inokulationspunkt) und bis zu 9cm (maximaler Durchmesser der Agarplatte).

Eine vollständige Ausbreitung bis zum Rand der Agarplatten (9cm) zeigten die Stämme CS221, CS223, CS224, CS227, CS228, CS234, **CS238**, **CS238 pHP45 Ω catR**, CS243, CS244, CS246, CS247, CS248 und CS250.

Ein mittleres Schwärmverhalten mit einem Schwarmhof-Durchmesser von durchschnittlich 6-8,5cm wiesen die Stämme CS233, CS235, CS218, CS239, CS216, CS220, CS215, CS236 und CS217 auf.

Ein niedriges Schwärmverhalten mit durchschnittlichen Schwärmen von 0,5-3cm zeigten die Stämme CS249, CS225, CS219 und CS231.

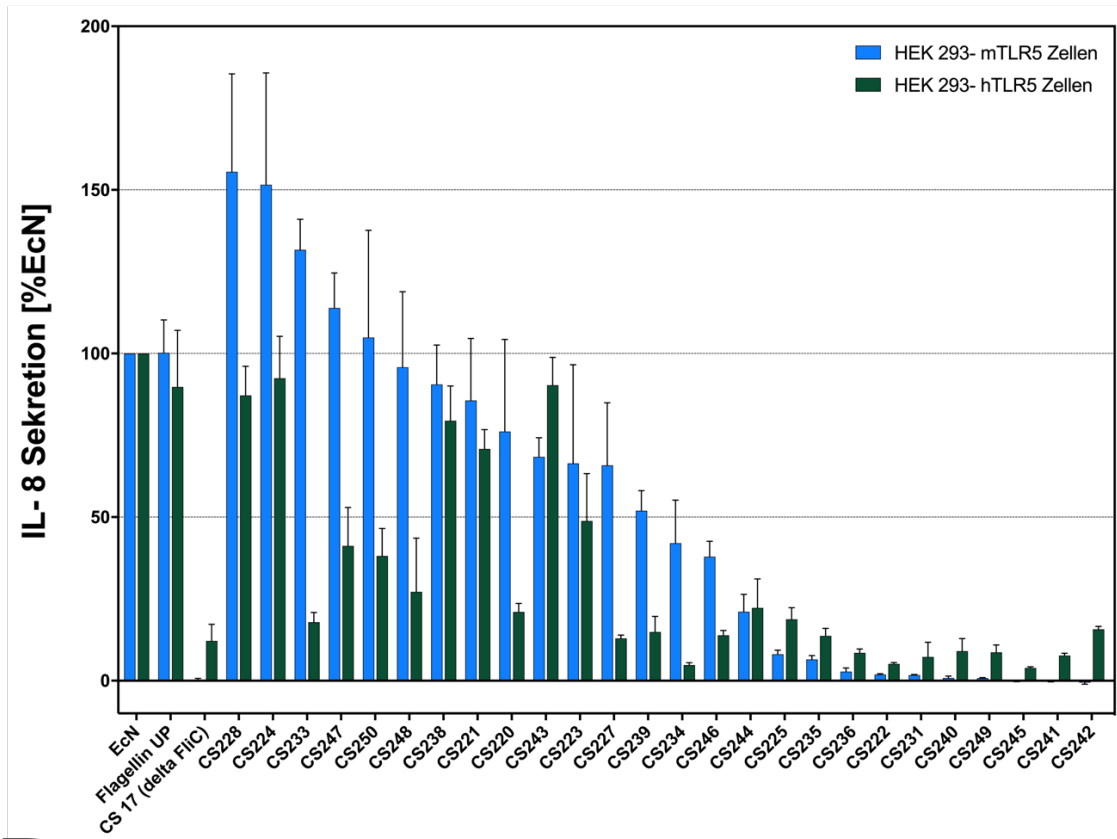
Kein Schwarmverhalten zeigen die Stämme **CS222**, **CS222 pHP45 Ω catR**, CS240, CS241, CS242, CS245, sowie die Negativkontrolle CS17 Δ *fliC*.

Ein Vergleich der Originalstämme mit ihren Chloramphenicol-resistenten Klonen (CS222 pHP45 Ω catR und CS238 pHP45 Ω catR) ergab keine Unterschiede im Schwärmverhalten. Während CS238 und CS238 pHP45 Ω catR ein ausgeprägtes Schwärmverhalten zeigten, wiesen CS222 und CS222 pHP45 Ω catR keinerlei Schwärmaktivität auf. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Transformationsvorgang mit dem Chloramphenicolresistenz-Plasmid das Schwärmverhalten beeinflusst.

3.3. *E.coli* Isolate zeigen ein variables TLR5-Rezeptoraktivierungspotenzial in hTLR5- und mTLR5-HEK-Zellen

Das bakterielle Protein Flagellin ist ein natürlicher Ligand des TLR5. Nach Bindung an TLR5 werden Signalkaskaden ausgelöst, welche unter anderem den NF- κ B Signalweg aktivieren^{56,72,105}. Die Bindung von Flagellin bewirkt über Dimerisierung des Rezeptors und der Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 die Auslösung von Signalkaskaden, die über die Aktivierung von IRAK-Kinasen und TRAF6 zur Translokation von NF- κ B führt. Dies resultiert in der Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie beispielsweise Interferon- γ und Interleukinen, sowie weiteren proinflammatorischen Zytokinen, welche eine Modulation der Immunantwort bewirken^{52,56}. Diesen Ablauf machten wir uns zunutze, um das TLR5-Rezeptoraktivierungspotenzial der verschiedenen *E.coli* Stämme miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden humane und murine HEK-Zellen verwendet, welche TLR5 überexprimieren. Die Stimulation durch die *E.coli* Stämme resultierte über Aktivierung des NF- κ B Signalweg in einer IL-8-Sekretion, die als funktioneller Read-out für die TLR5-Aktivierung diente. Zur Stimulation wurden die zuvor isolierten *E.coli*-Stämme aus den Stuhlproben gesunder Probanden eingesetzt (Tabelle 13). Die TLR5-HEK-Zellen wurden gemäß Abschnitt 2.2.1 angezüchtet, ausgesät und anschließend über 24 Stunden mit den jeweiligen Bakterienstämmen stimuliert. Nach der Stimulation wurde der Zellüberstand entnommen und die IL-8 Konzentration mittels ELISA-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse (Abbildung 2A) wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf den Wert des Referenzstammes EcN normiert. Dadurch war ein direkter Vergleich des TLR5-Aktivierungspotenzials der kommensalen Stämme mit EcN möglich.

A



B

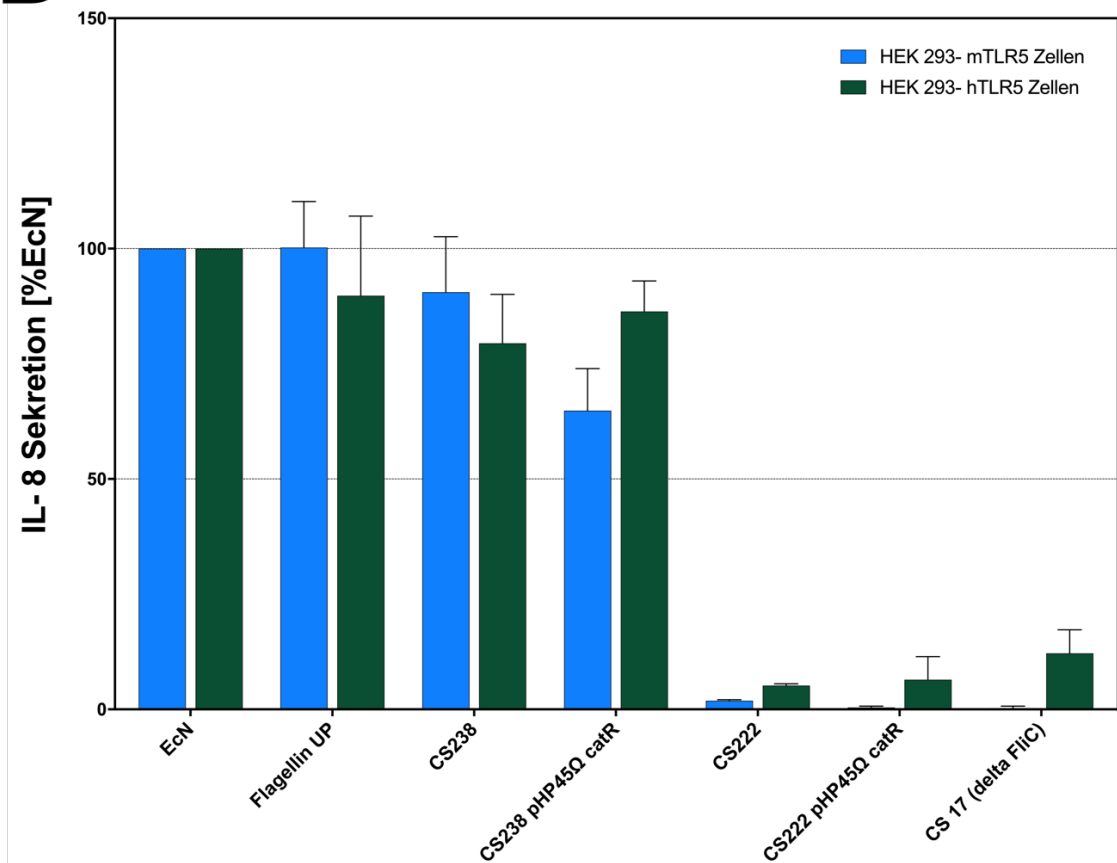


Abbildung 2 HEK 293 h/m TLR5 Stimulation mit *E.coli* Isolaten | HEK 293 Zellen mit überexprimierten humanen (hTLR5) oder murinen (mTLR5) TLR5 wurden mit *E.coli* Isolaten aus Stuhlproben gesunder Probanden (MOI 10) sowie mit ultrapurem (UP) Flagellin von *Salmonella* Typhimurium in einer Konzentration von 100 µg/ml stimuliert. Nach 24h Inkubation wurden die Überstände abgenommen und die IL-8 Konzentration mittels ELISA-Analyse bestimmt. Anzahl der Replikate = 5, dargestellt wird der Durschnitt, die Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung. **A** IL-8-Konzentrationen auf EcN normiert. **B** Vergrößerte Darstellung ausgewählter Isolate, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit oder Abweichung im Vergleich zu EcN hinsichtlich der IL-8-Sekretion für weiterführende *in vitro* und *in vivo* Versuchen ausgewählt wurden, einschließlich der mit Chloramphenicolresistenz transformierten Varianten.

Die Stimulation der mit TLR5-überexprimierten HEK-Zellen mit unterschiedlichen *E.coli* Isolaten führte zu variablen IL-8-Konzentrationen in den abgenommenen Zellüberständen. Es konnten sowohl Stämme identifiziert werden, die eine höhere, als auch solche, die eine niedrigere IL-8-Sekretion im Vergleich zum Referenzstamm EcN induzierten. Die Stimulation mit Flagellin ultrapure (UP) zeigte ein vergleichbar hohes Signal wie EcN. Der als Negativkontrolle eingesetzte Stamm CS17Δ*fliC* wies bei den murinen TLR5-HEK-Zellen kein Signal auf und zeigte bei den humanen TLR5-HEK-Zellen lediglich ein sehr niedriges Signal.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der IL-8 Sekretion bei Verwendung identischer *E.coli* Stämme als Stimulanz zwischen den murinen und humanen TLR5-HEK-Zellen. Trat generell ein erhöhtes Signal auf, zeigten sich die Signale der murinen höher als der humanen TLR5-HEK-Zellen. Umgekehrt lagen bei niedrigem Signal im Vergleich die Signale der humanen höher als der murinen TLR5-HEK-Zellen. Die Auswahl der Stimulanzen für weiterführende Untersuchungen wurde anhand der IL-8-Signale getroffen (Abb.2B). Für die weiteren Versuche wurden insgesamt sieben Stimulanzen ausgewählt: *Flagellin UP*, CS17Δ*fliC*, CS238, CS222, die mit Chloramphenicolresistenz transfizierten Klone CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR und EcN. Diese Stämme wurden in den anschließenden *in vitro* und *in vivo* Versuchen (3.4 und 3.5) weiterverwendet.

Die Transformation der Stämme CS222 und CS238 mit einer Chloramphenicolresistenz diente zur besseren Selektivität und Nachverfolgung der Kolonisation im *in vivo* Versuch. Der Vergleich, zwischen den prä- und posttransfizierten Stämme zeigt, dass die Übertragung der Resistenz keinen Einfluss auf das TLR5-Aktivierungspotenzial hat. CS222 und CS238 unterscheiden sich hinsichtlich der IL-8-Sekretion nicht von ihren transfizierten Derivaten.

Zur genaueren Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Stärke der TLR5-Rezeptoraktivierung und den protektiven Effekten auf intestinale Entzündungsreaktion, wurden, unter Miteinbeziehen der Länge der *fliC*-Sequenz, zwei Isolate für weiterführende Versuche ausgewählt. Der Stamm CS238 wurde auf Grund der hohen IL8-Sekretion (hohes TLR5-Aktivierungspotenzial, langer *fliC*-Sequenz) und CS222 aufgrund seiner niedrigen IL8-Sekretion (niedriges TLR5-Aktivierungspotenzial, kurze *fliC*-Sequenz) ausgewählt.

Ziel war es, durch diese Auswahl gezielt die Unterschiede der TLR5-Aktivierungspotenziale und die damit verbundene immunologischen Wirkung aufzuzeigen und die Ergebnisse in direkten Vergleich zum probiotischen Effekt von EcN zu setzen.

3.4. TLR5-abhängige und TLR2/4-abhängige Effekte ausgewählter *E.coli* Stämme in BMDCs

Nach der Charakterisierung der *E.coli*-Stämme und Untersuchung auf ihr TLR5-Aktivierungspotenzial in überexprimierten TLR5-HEK-Zellen, bestand der nächste Schritt darin, deren Wirkung auf primäre Immunzellen zu untersuchen. Es wurden hierzu murine knochenmarksabgeleitete dendritische Zellen (BMDCs) verwendet. Diese spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase.^{50,115,118} Nach Stimulation der BMDCs mit den ausgewählten *E.coli*-Isolaten wurde die Expression der Reifungsmarker CD40, CD80, CD86 sowie des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (MHC-II) mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Anhand der Expression dieser Oberflächenmarker kann auf den Reifegrad und Aktivierungsstatus der dendritischen Zellen geschlossen werden. Zur Erhaltung dieser Homöostase unterscheidet das intestinale Immunsystem zwischen kommensalen und pathogenen Mikroorganismen. Dabei kommen dendritische Zellen (DCs) als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eine entscheidende Rolle zu.^{116,175}

Im Rahmen der Antigenerkennung durch BMDCs kommt es nach Kontakt mit bakteriellen Komponenten zur Endozytose, Antigenprozessierung und Präsentation über MHC-II. Dieser Prozess wird begleitet von einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86, welche essenziell für die Aktivierung naiver T-Zellen sind^{115,176,177}.

Die Reifung dendritischer Zellen geht außerdem mit einer vermehrten Expression von Chemokinrezeptoren sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 β ,

TNF- α und IL-12 einher. Reife DCs induzieren eine inflammatorische Immunantwort. Im Gegensatz dazu können semi-mature oder unreife dendritische Zellen, die geringere Mengen an MHC-II und kostimulatorischen Molekülen exprimieren, eine tolerogene Immunantwort etwa durch Induktion regulatorischer T-Zellen fördern.

Die Verwendung von BMDCs ermöglicht es, die Effekte der *E.coli*-Stämme auf vollständig immunkompetente Zellen mit physiologischer Rezeptorexpression zu analysieren.¹¹⁵

Da der Schwerpunkt auf der Untersuchung des TLR5-Aktivierungspotenzials lag, wurden neben Wildtyp-BMDCs aus B6-Mäusen auch BMDCs aus Knock-out-Mäusen verwendet.

Zum Einsatz kamen TLR5^{-/-} Mäuse zur Analyse der Effekte, die unabhängig von TLR5, aber über TLR2 und TLR4 vermittelt werden und die Effekte einer Abwesenheit von TLR5 zeigen. Ergänzend wurden auch TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} - Doppel-Knockout Mäuse verwendet, zur isolierten Untersuchung von TLR5-vermittelten Effekten. Durch diese Kombination von BMDCs aus Knock-Out-Mäusen konnten TLR5-abhängige und TLR2/4-abhängige Signale voneinander abgegrenzt werden. Die Wildtyp BMDCs dienten als Kontrollgruppe.

Die BMDCs wurden aus dem Oberschenkelknochen der Mäuse gewonnen (vgl.2.3.2.1) und anschließend *in vitro* mit unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen sowie mit einem Flagellin Präparat (ultrapure) in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert, um dosisabhängige Effekte erfassen zu können. Im Anschluss an eine 24-stündige Stimulationszeit wurden die Zellüberstände abgenommen und auf die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine untersucht. Dabei wurden mittels ELISA-Analyse die Konzentration von IL-6, IL-1 β und TNF- α bestimmt. Diese Zytokine wurden vorab ausgewählt, da sie als pro-inflammatorische Zytokine, während der inflammatorischer Phase bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt sekretiert werden¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Ergänzend zur Zytokinmessung wurde die Maturation der BMDCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurde die Expression der Reifungsmarker CD40, CD80, CD86 und MHC-Klasse-II erfasst, um die Aktivierungs- und Reifestadien nach der Stimulation zu beurteilen. Durch diese kombinierten Untersuchungen sollte nicht nur die direkte proinflammatorische Wirkung der *E.coli*-Stämme untersucht werden, sondern auch deren immunmodulatorischen Einfluss und potenzielle Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Zellen erfasst werden.

3.4.1. Stimulation muriner BMDCs durch *E.coli* erhöht die TLR2/4 abhängige TNF- α Sekretion.

Die ELISA-Analyse der Zellkulturüberstände nach der Stimulation zeigten unterschiedlich hohe TNF- α Konzentrationen sowohl innerhalb der einzelnen Mausgenotypen (Wildtyp, TLR5^{-/-} und TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-} BMDCs), als auch zwischen den beiden Stimulationskonzentration MOI 1 und MOI 10 (Abbildung 3 A).

Bei einer Stimulationskonzentration von MOI 10 ergaben sich bei TLR5^{-/-}-BMDCs nach Stimulation mit EcN und CS 222 im Vergleich zur Stimulation mit CS238 signifikant höhere TNF- α Signale. In TLR2/4^{-/-} BMDCs kam es in Abwesenheit von TLR2/4 zu keinen TNF- α Wert über das MOCK-Niveau hinaus. Die somit als TLR2/4-abhängig anzusehenden Signale von EcN und CS222 stimulierten Zellen fielen signifikant höher aus, als die von CS238 stimulierten Zellen. Unter den *E.coli*-Stimulanzen zeigte sich unter Stimulation mit CS238 die niedrigste TNF- α -Konzentration. Das MOCK-Signal lag als negative Kontrolle erwartungsgemäß niedrig, ebenso zeigte die Stimulation mit dem Flagellinpräparat niedrige Werte. Bei Abwesenheit von TLR5 (TLR5^{-/-}-BMDCs) zeigte sich eine signifikant höhere TNF- α Sekretion im Vergleich zu Wildtyp und TLR2/4^{-/-} BMDCs bei Stimulation mit EcN, Flagellin UP, CS222 und CS238. Die Daten zeigen, dass die TNF- α Sekretion wesentlich über TLR2/4 vermittelt wird und durch TLR5 nach Kontakt mit Bakterien supprimiert wird. In TLR2/4^{-/-} BMDCs findet nahezu keine TNF- α Produktion statt, während in TLR5^{-/-}-BMDCs verstärkt TNF- α freigesetzt wird.

In der Analyse der IL-6 Sekretion zeigten sich bei Wildtyp BMDCs und TLR5^{-/-}-BMDCs vergleichbar hohe Werte. Das Signal in TLR2/4^{-/-} BMDCs (TLR5-vermittelt) war geringer. Zwischen den unterschiedlichen *E.coli*-Stimulanzen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der IL-6-Sekretion gemessen werden. Die Höhe der IL-6-Sekretion blieb unabhängig von der eingesetzten Bakterienkonzentration (MOI 1 vs. MOI 10) konstant. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den TLR2/4^{-/-} BMDCs eine deutliche Steigerung der IL-6-Sekretion bei Verwendung einer höheren MOI (MOI 10) im Vergleich zu einer niedrigeren Konzentration (MOI 1). Die Analyse der IL-1 β Konzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausgenotypen und den verwendeten Stimulanzen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die TNF- α -Sekretion der BMDCs nach Stimulation überwiegend über TLR2/4-abhängige Signalwege vermittelt wird und durch TLR5-abhängige Signalwege diese Signalwege gehemmt werden können. In den Wildtyp-BMDCs mit vollständiger Rezeptorausstattung (TLR2, TLR4 und TLR5) fällt die TNF- α -Sekretion im Vergleich zu TLR5^{-/-}-BMDCs insgesamt geringer aus. Zudem führte eine höhere bakterielle Konzentration (MOI 10) zu einer stärkeren TNF- α -Sekretion im Vergleich zu einer niedrigeren MOI, was auf eine dosisabhängige Antwort hinweist. Eine ebenfalls dosisabhängige Antwort zeigte sich bei der IL-6 Sekretion in den TLR2/4^{-/-} BMDCs. Die alleinige Stimulation mit einem Flagellinpräparat zeigte insgesamt niedrigere Werte als die Stimulation mit Bakterien.

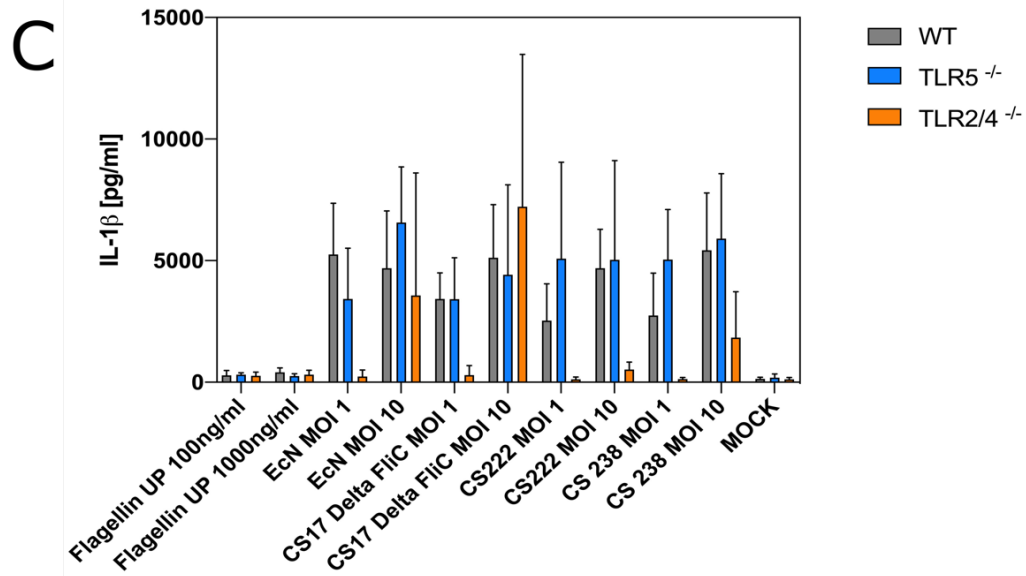
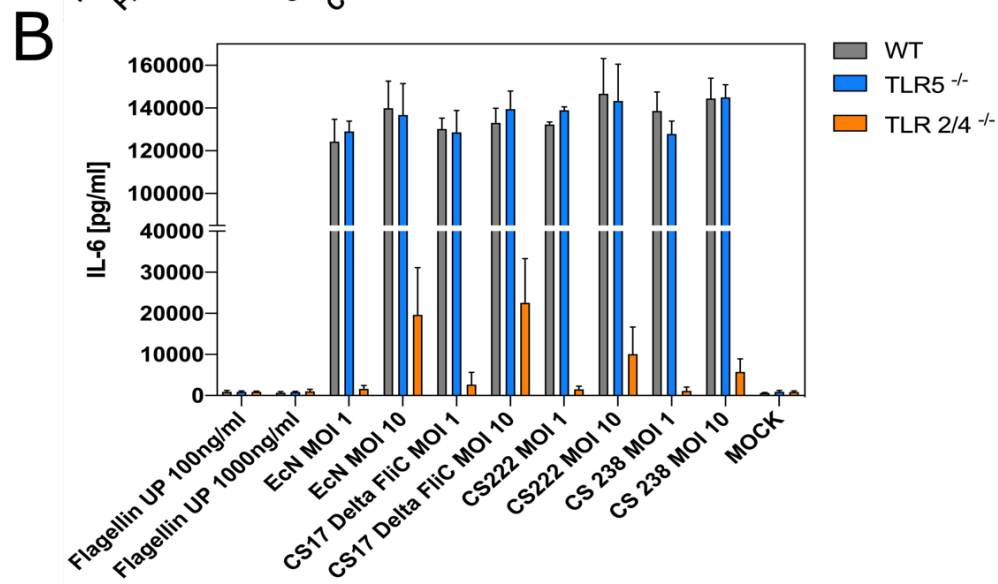
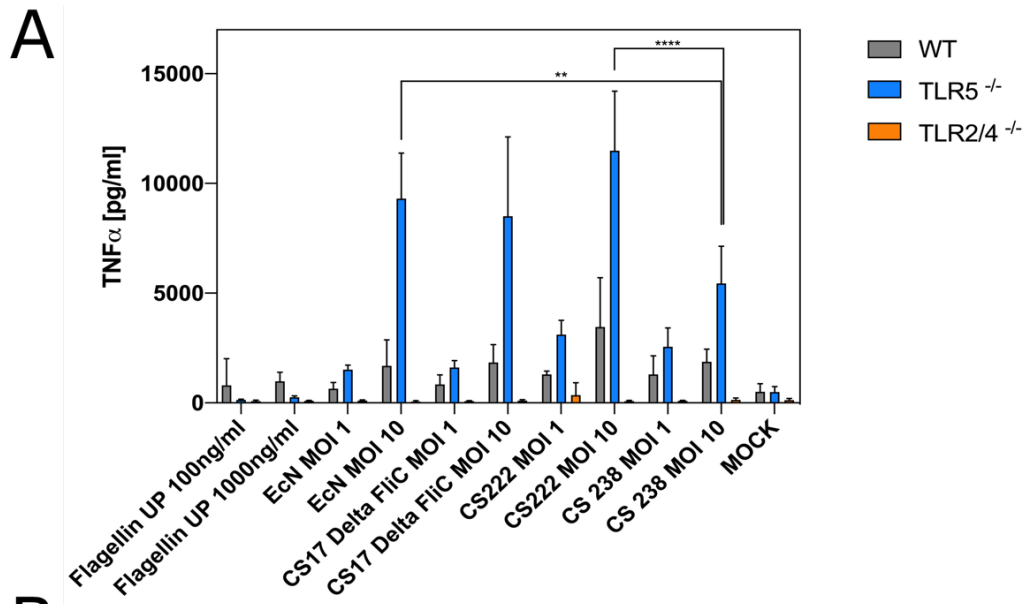


Abbildung 3 Zytokinanalyse mittels ELISA | Stimulation muriner BMDCs mit *E.coli* Stämmen mit einer MOI von 1 und 10 und dem Flagellinpräparat Flagellin UP in unterschiedlichen Stimulationskonzentrationen. ELISA Read-out der Zytokine TNF- α (A), IL-6 (B) und IL-1 β (C).

Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. Die Balken zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 5) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. * p $\leq$ 0,05; ** p $\leq$ 0,01; *** p $\leq$ 0,001; **** p $\leq$ 0,0001. Verwendete Probenarten: Zellkulturüberstände, Stimulationszeit über 24h.

3.4.2. BMDC-Maturation ist primär TLR2/4-abhängig und wird durch TLR5 moduliert

Die Maturation der dendritischen Zellen stellt neben der Zytokinsekretion einen wichtigen, zentralen Parameter zur Beurteilung der Immunmodulation nach bakterieller Stimulation dar. Um die Maturation zu analysieren wurden die Maturationsmarker CD40, CD80, CD86 und MHC-II an der Oberfläche der stimulierten BMDCs mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Diese Oberflächenmoleküle sind essenziell für die Antigenpräsentation und die Aktivierung naiver T-Zellen, wodurch unter anderem die adaptive Immunantwort eingeleitet wird^{51,116,175}. Die verwendeten Stimulanzien wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen (MOI 1 und MOI 10) eingesetzt, um dosisabhängige Effekte der Maturation zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der BMDCs mit den verschiedenen *E. coli*-Stämmen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Maturationsmarker CD40, CD80, CD86 und MHC II in Abhängigkeit der Stimulanz hervorrief. Unabhängig vom verwendeten Stamm war das Ausmaß der Maturation vergleichbar, was darauf hinweist, dass die unterschiedlichen Isolate ähnliche Effekte auf die dendritischen Zellen ausübten. Ebenso führte die Variation der Stimulationskonzentration (MOI 1 oder MOI 10) nicht zu signifikanten Unterschieden in der Höhe der Maturationsmarker. Eine höhere bakterielle Konzentration korrelierte somit nicht mit einer verstärkten Maturation der BMDCs.

Ein auffälliges Ergebnis zeigte sich jedoch bei Betrachtung der Unterschiede in der Expression der Maturationsmarker zwischen den Mausgenotypen (BMDCs (TLR2/4^{-/-}-BMDCs, TLR5^{-/-}-BMDCs und WT). Bei näherer Betrachtung der CD40 Expression zeigten sich beim TLR2/4 abhängigen Signal (TLR5^{-/-}-BMDCs) die höchsten Signale. Diese Expression war signifikant höher im Vergleich zu den Wildtyp-BMDCs. Die niedrigsten Werte wurden hingegen bei den TLR2/4^{-/-}-BMDCs beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die CD40-Expression überwiegend

TLR2/4-abhängig reguliert wird und eine TLR5-Aktivierung eine hemmende Komponente bewirken kann. In den TLR5^{-/-}-BMDCs zeigten sich die niedrigsten CD40-Werte.

Bei der CD80-Expression zeigte sich ein ähnliches Muster. Wildtyp- und TLR5^{-/-}-BMDCs exprimierten vergleichbar hohe Mengen an CD80, während die TLR2/4^{-/-}-BMDCs signifikant niedrigere Werte aufwiesen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulanzen (*E. coli*-Stämme) waren, wie bereits bei CD40, nicht signifikant ausgeprägt.

Die Expressionsmuster von CD86 und MHC II folgten einem vergleichbaren Verlauf. Die niedrigsten Expressionslevel wurden in den TLR2/4^{-/-}-BMDCs beobachtet, während Wildtyp- und TLR5^{-/-}-BMDCs ähnliche Werte aufwiesen. Die Stimulation mit unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen führte auch hier zu keinen signifikanten Unterschieden. Auffallend war die geringe CD40-Expression bei der Stimulation mit ultrapurem Flagellin (UP) im Vergleich zu den bakteriellen Stämmen. Die Stimulation mit Flagellin allein reichte offenbar nicht aus, um eine vergleichbare Maturation der BMDCs wie die der *E. coli*-Stämme zu induzieren. Dies zeigte sich bei allen untersuchten Markern.

In der Gesamtschau zeigen die Ergebnisse eine Abhängigkeit der Maturation der BMDCs vom Vorhandensein funktioneller TLR2- und TLR4- Rezeptoren. Das Fehlen der TLR2/4-Rezeptoren führte zu einer deutlich reduzierten Expression der untersuchten Maturationsmarker. Umgekehrt scheint der Verlust des TLR5-Rezeptors in TLR5^{-/-}-BMDCs die Expression von CD40 zu fördern, was auf eine kompensatorische Hochregulation der TLR2/4-Signalwege hindeuten könnte. Die Stimulation mit verschiedenen *E. coli* Stämmen führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Maturation. Auch der Vergleich zwischen niedriger (MOI 1) und hoher Bakterienkonzentration (MOI 10), ergab keine signifikanten Unterschiede in der Maturation.

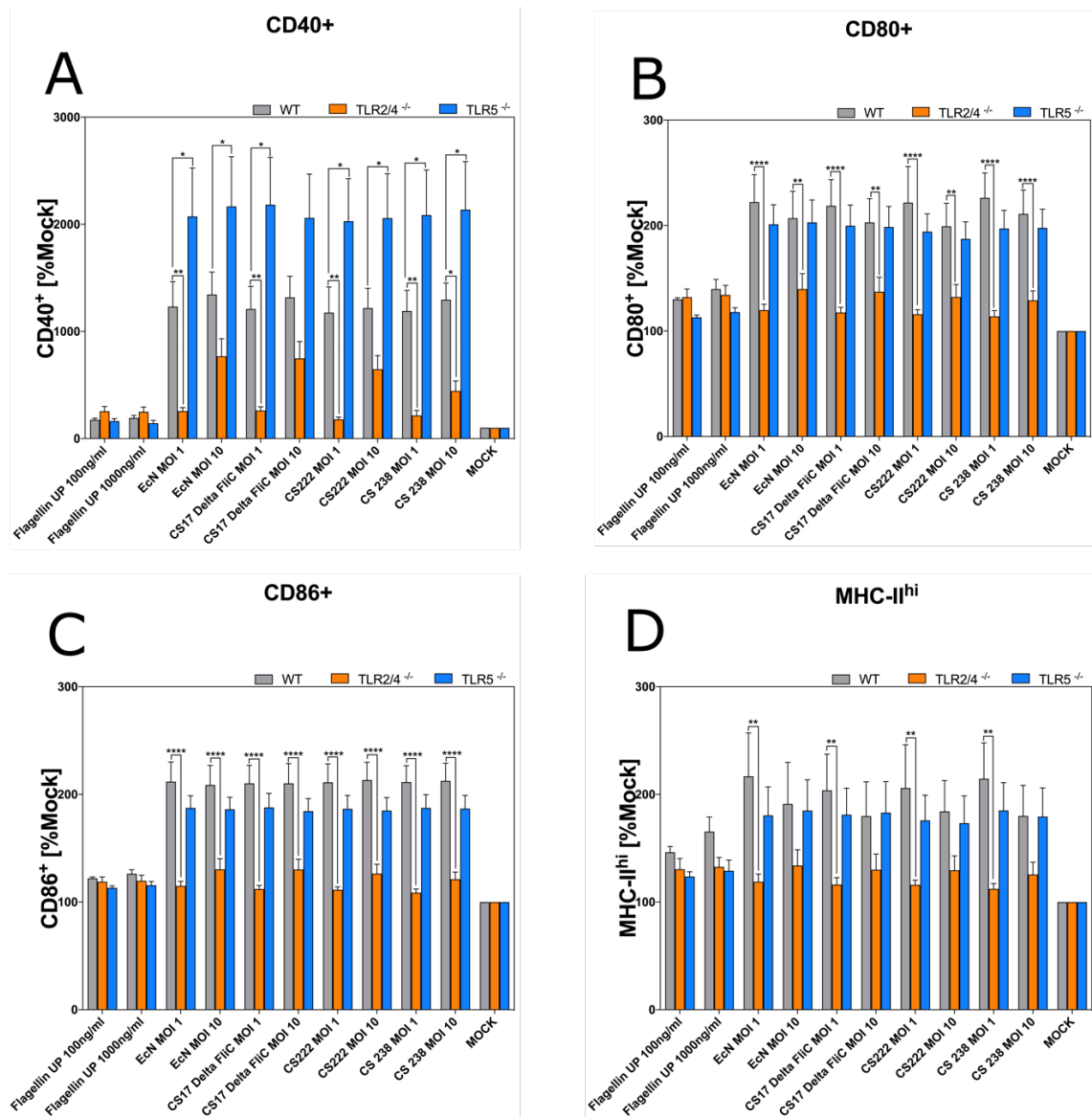


Abbildung 4 Stimulationsversuch muriner BMDCs | Durchflusszytometrische Analyse der Maturation von murinen BMDCs nach Stimulation mit unterschiedlichen *E.coli* Stämmen in MOI 1 und MOI 10 und dem Flagellinpräparat Flagellin UP in unterschiedlichen Stimulationskonzentrationen. Analyse der Zellen auf CD40, CD80, CD86 und MHC II Expression mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. Die Balken zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 5) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. * p <= 0,05; ** p <= 0,01; *** p <= 0,001; **** p <= 0,0001. Verwendete Probenarten: Zellen aus murine BMDCs. Stimulationszeit von 48h.

3.5. Protektive Effekte können durch kommensale *E.coli* Stämme vermittelt werden - ein Vergleich mit EcN im DSS-Kolitis Model

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften ausgewählter *E.coli* – Stämme *in vivo*, wurde das etablierte DSS-Kolitismodell ausgewählt¹⁶⁶. Im Fokus standen die zuvor charakterisierten Isolate CS238 pHP45 Ω catR (hohe TLR5-Aktivierung *in vitro*) und CS222 pHP45 Ω catR (niedrige TLR5-Aktivierung *in vitro*). Diese wurden mit EcN und einer DSS-only Kontrollgruppe verglichen. Ziel war es, den Einfluss der Bakterienstämme auf den Krankheitsverlauf und die Entzündungsaktivität im akuten Kolitismodell zu untersuchen.

Insgesamt wurden vier Gruppen mit jeweils 5 Mäusen gebildet. 3 Tage vor Beginn der DSS-Applikation, erfolgte zunächst die orale Kolonisierung der Tiere mit den jeweiligen Bakterienstämmen über das Trinkwasser. Anschließend erhielten alle Gruppen 2,5% DSS über das Trinkwasser zur Induktion einer Kolitis (Abbildung 5). Die erfolgreiche bakterielle Kolonisierung wurde anhand der CFU-Bestimmung aus Stuhlproben auf antibiotikaselektiven Platten überprüft. Die Tiere wurden täglich anhand des Disease Activity Index (DAI) beurteilt, welcher die Parameter Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und rektale Blutung beurteilte. Zusätzlich wurde täglich das Körpergewicht gemessen und am Tag 10 nach Versuchsbeginn die Tiere ausgeschleust und präpariert. Zur Beurteilung der Entzündungsschwere wurden nach der Präparation die Kolonlänge gemessen, histologische Schnitte erstellt, Zytokinanalysen aus Kolonproben angefertigt, sowie eine durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellpopulation aus Kolon- und mesenterialen Lymphknotenproben durchgeführt.

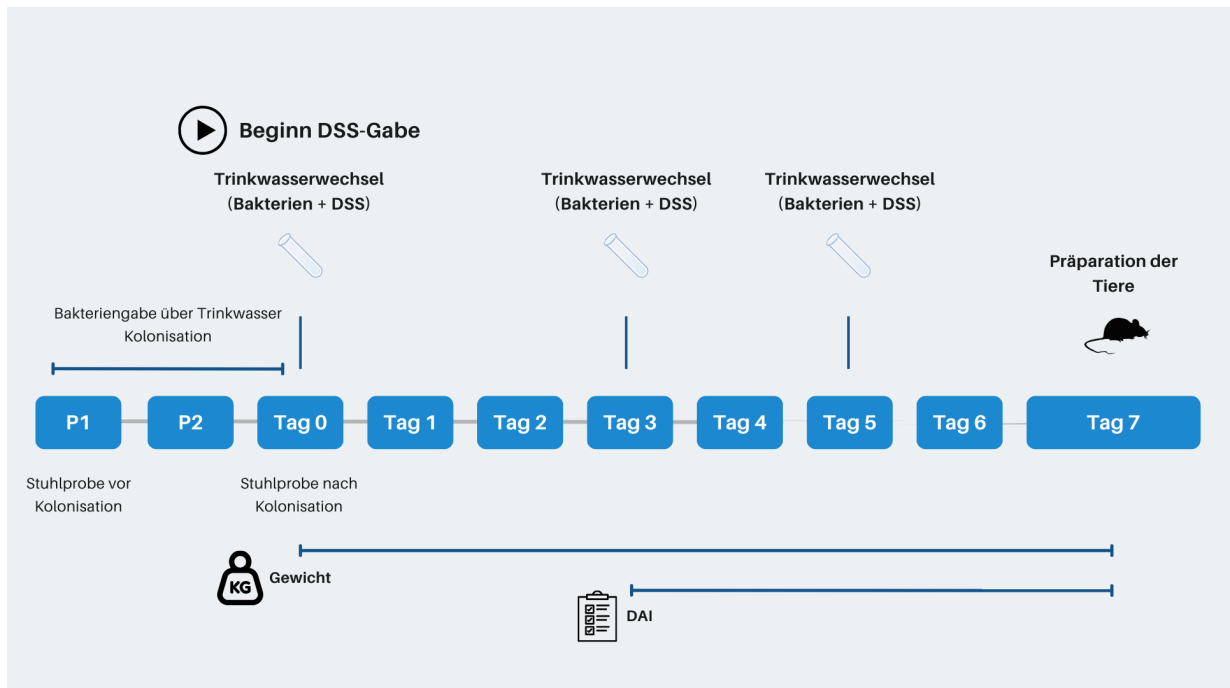


Abbildung 5 *In vivo* DSS-Kolitis Versuch | Zeitstrahl Ablauf des *in vivo* DSS-Versuch, Kolonisation der Versuchstiere mit Bakterien vor Beginn der DSS-Gaben (P1-Tag 0) mit Abnahme von Stuhlproben vor und nach Kolonisation. Beginn der DSS-Applikation über das Trinkwasser mit Beginn Tag 0 bis zum Präparationstag an Tag 7. Tägliche Gewichtsbestimmung von Tag 0 bis Tag 7. Erhebung des DAI an Tag 3,4,5,6 und 7.

3.5.1. Kolonisierung der Versuchstiere durch Applikation von unterschiedlichen *E.coli* Bakterienstämme über das Trinkwasser

Zunächst wurden die in 4 Versuchsgruppen aufgeteilten SPF WT Mäuse mit EcN, CS238 pHP45Ω catR oder CS222 pHP45Ω catR (siehe 2.3.2.3) in einer Konzentration von 1×10^8 Bakterien/ml in 200 ml für 3 Tage über das Trinkwasser kolonisiert. Die verabreichten Bakterienstämme wurden zuvor mit Antibiotikaresistenzgenen gegen Chloramphenicol transformiert. Der verwendete EcN Stamm besaß im Antibiogramm eine natürliche Chloramphenicolresistenz, die sich durch Ausplattierung auf Selektivagarplatten mit Chloramphenicol bestätigte. Über den Zeitraum von 7 Tagen erhielten die Mäuse anschließend 2,5% DSS-Lösung über das Trinkwasser, um eine Kolitis auszulösen. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse, die ausschließlich DSS und keine Bakterien über das Trinkwasser erhielten (DSS-Only).

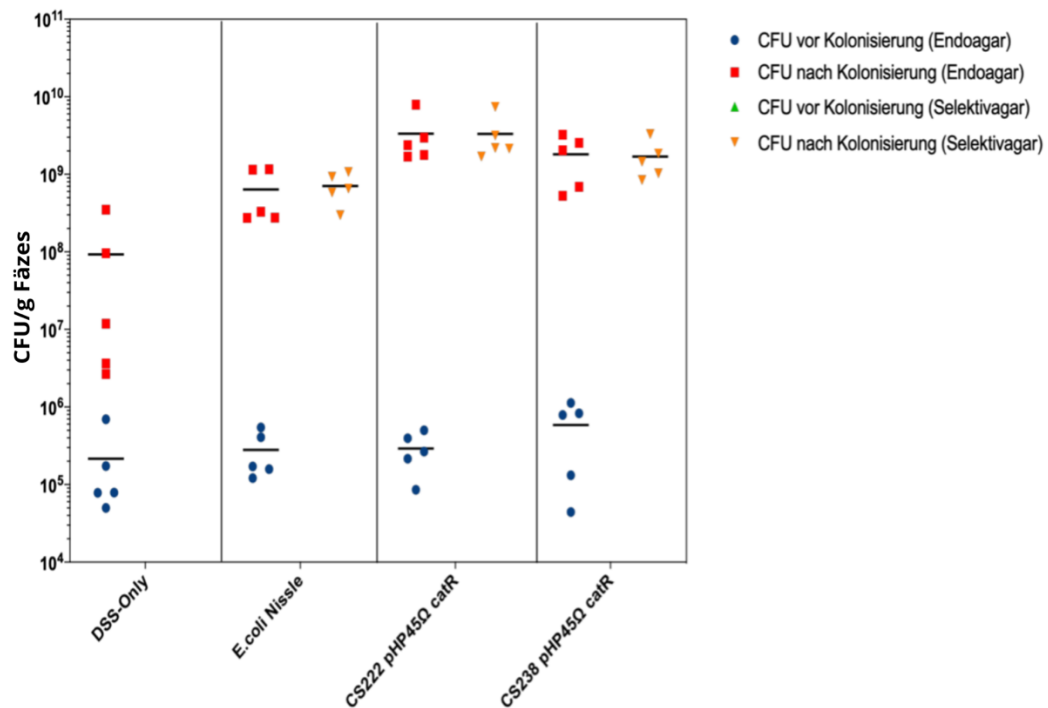


Abbildung 6 *In vivo* DSS-Kolitis | CFU (Colony forming units) zur Beurteilung und Vergleich der Kolonisierung vor und nach Gabe von EcN, CS238 pHP45Ω catR und CS222 pHP45Ω catR in einer Konzentration von 1×10^8 Bakterien/ml im Trinkwasser. Es konnte **keine** CFU vor Kolonisierung auf Selektivagar gemessen werden (grünes Dreieck). Durch Nachweis der Besiedelung auf Selektivagar nach Kolonisation in den Gruppen EcN, CS238 pHP45Ω catR und CS222 pHP45Ω catR konnte eine positiv verlaufene Kolonisierung nachgewiesen und auf eine geplant verlaufene Transformation der *E.coli* Stämme CS222 und CS238 mit einer Antibiotikaresistenz gegenüber Chloramphenicol geschlossen werden.

Um die erfolgreiche Kolonisierung nachzuweisen, wurden von jeder Maus vor und nach Kolonisation Stuhlproben gesammelt. Die Stuhlproben wurden auf Endoagarplatten und Selektivplatten mit Chloramphenicol ausplattiert. Die Kolonisationsdichte wurde durch Zählung koloniebildender Einheiten (CFU) in CFU/g Fäzes bestimmt (Abbildung 6). Vor Beginn der Kolonisierung fanden sich auf den Endoagarplatten bereits endogene Enterobakterien von 10^5 CFU/g Fäzes. Auf den Selektivagarplatten wurde zu diesem Zeitpunkt kein bakterielles Wachstum beobachtet, was das Fehlen Chloramphenicol-resistenter Keime im Ausgangsstuhl bestätigte. Nach der Kolonisierung der Versuchsgruppen ab Tag 0 zeigten sich in der DSS-Only Gruppe weiterhin kein Bakterienwachstum auf den Selektivagarplatten. Die Versuchsgruppen, die zusätzlich zu 2,5% DSS mit EcN, CS238 pHP45Ω catR oder CS222 pHP45Ω catR versorgt wurden, zeigten nach Kolonisation Wachstum auf Selektivagarplatten von etwa 10^9 bis 10^{10} CFU/g Fäzes. Diese Ergebnisse bestätigten eine effektive Kolonisierung der Tiere mit den applizierten Stämmen.

3.5.2. Die Kolonisation mit *E.coli* zeigt positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer DSS-Kolitis

Zur Beurteilung der klinischen Krankheitsaktivität wurde an den Versuchstagen 4,5,6 und 7, der DAI (Disease-Activity-Index) Score nach festgelegten Kriterien erhoben. (vgl. Tabelle 15) Abbildung 7A zeigt den DAI-Score aller 4 Gruppen: Die Gabe von 2,5% DSS über das Trinkwasser führte in der Kontrollgruppe ohne vorherige bakterielle Kolonisation (DSS-only) wie erwartet zu einem kontinuierlichen Anstieg des DAI über den Beobachtungszeitraum, begleitet von deutlichem Gewichtsverlust, flüssigem Stuhlgang und teils blutiger Diarrhoe. Die mit EcN kolonisierten Tiere zeigten einen insgesamt milderen Verlauf mit niedrigerem DAI-Scoring im Vergleich zur DSS-Only Gruppe.

Ein ähnliches Muster ließ sich bei den Tieren der CS238 pHP45 Ω catR-Gruppe beobachten. Sie zeigten tendenziell niedrigere DAI-Werte im Vergleich zur DSS-Only Gruppe und zeigten ähnliche Ergebnisse wie die EcN-Gruppe. Im Gegensatz entwickelte die Gruppe CS222 pHP45 Ω catR einen ähnlich hohen DAI-Score Anstieg, wie die DSS-Only Gruppe. In Abbildung 7B wurde das Gewicht anhand des Anfangsgewicht der Tiere zu Beginn des Versuchs in Relation gesetzt und als prozentualer Wert über die Versuchstage aufgetragen. Es zeigte sich in den ersten 4 Versuchstagen zunächst eine allgemeine leichte Gewichtszunahme in allen Versuchsgruppen. Mit fortschreitender Kolitis verringerte sich das Gewicht der Tiere ab Tag 4 des Versuchs. Die mittlere Körpergewichtskurven zeigten, dass EcN kolonisierte Tiere einen geringeren Gewichtsverlust aufwiesen, wohingegen die mit CS222 pHP45 Ω catR und CS238 pHP45 Ω catR kolonisierten Tiere und die Tiere der DSS-Only Gruppe mehr Gewicht verloren. (Abbildung 7B)

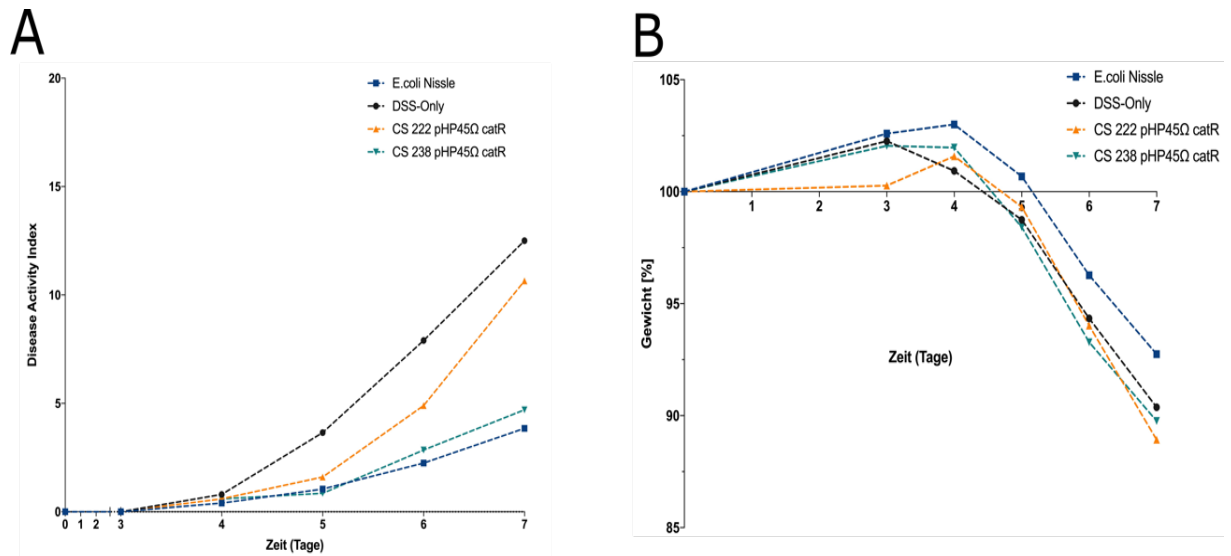


Abbildung 7 In vivo DSS-Kolitis **A** DAI (Disease activity index) Beurteilung der unterschiedlichen Mausgruppen nach Kriterien aus Tabelle, dargestellt sind Mittelwerte. **14. B** Gewichtsverlauf der Mausgruppen im Verlauf der DSS Kolitis.

3.5.3. Die Kolonisation mit *E.coli* zeigt positiven Einfluss auf die Ausprägung histologischer Schädigung in einer DSS-Kolitis

Aus den entnommenen Kolonstücke wurden histologische Schnitte in H&E Färbung gefertigt (Abbildung 8B). Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mikroskopisch und die Bewertung anhand des HCS (siehe Methoden und Material, Tabelle 16) ^{170,171}.

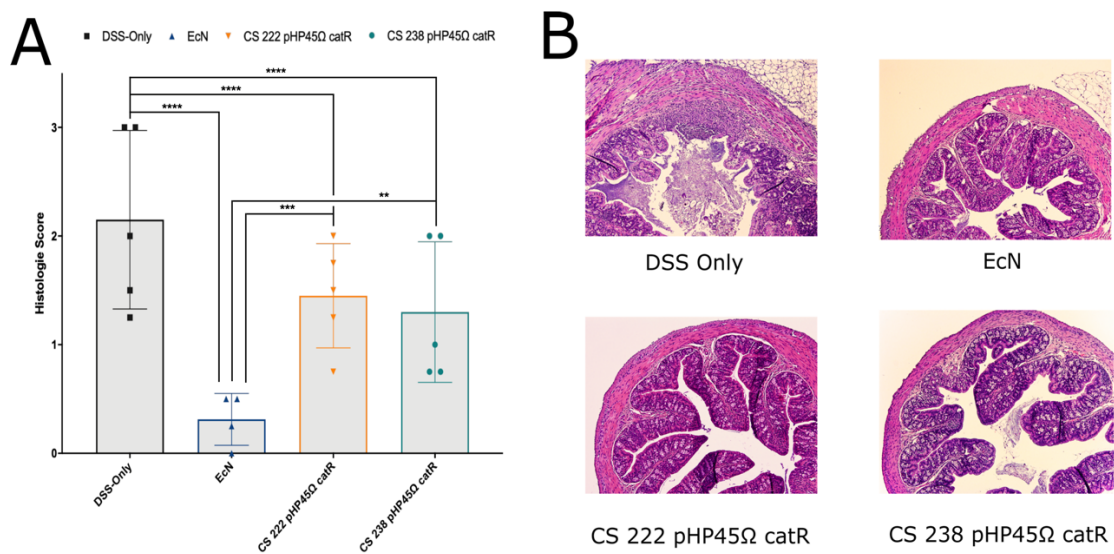


Abbildung 8 Histologische Beurteilung der DSS-induzierten Kolitis **A** ermittelter histologischer Kolitis Score der Mäuse, die mit DSS-Only, EcN, CS222 pHP45Ω catR oder CS238 pHP45Ω catR behandelt wurden. Gezeigt sind Einzelwerte aller

Versuchstiere sowie Mittelwerte (Balken) mit Standardabweichung der jeweiligen Versuchsgruppe. **B** Exemplarische histologische Schnittbilder aus der DSS-Only Gruppe, CS238 pHP45Ω catR und CS222 pHP45Ω catR. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. Die Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 5) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Die Kontrollgruppe ohne bakterielle Vorkolonisation (DSS-Only) wies ausgeprägte histologische Veränderungen auf. Die Kolonsegmente wiesen multiple Ulzerationen, destruierte Kryptenstrukturen sowie eine dichte Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen auf. In der mit EcN kolonisierten Versuchsgruppe fiel der mittlere HCS-Wert im Vergleich zur DSS-Only Gruppe geringer aus. (*Abbildung 8 A*) Die Kryptenstruktur des Kolons blieb zu großen Teilen erhalten, Ulzerationen traten seltener auf und auch die mukosale Infiltration mit entzündlichen Zellen war insgesamt geringer ausgeprägt (*Abbildung 8 B*). Die Kolonpräparate der Tiere aus den zwei weiteren Versuchsgruppen (CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR) wiesen HCS Werte im mittleren Bereich auf. Diese lagen oberhalb der EcN-Gruppe, jedoch unterhalb der DSS-Only Gruppe.

3.5.4. Eine durch DSS induzierte Kolitis sorgt durch Zellschrumpfung (Shrinking) für eine Verkürzung der Kolonlänge im *in vivo* Mausmodell.

Zur Beurteilung des Schweregrads der DSS-induzierten Kolitis erfolgte am Ausschleustag die Entnahme und Längenmessung der Kolonpräparate der Versuchstiere. Die Kolonlänge dient als indirekter Marker für entzündliche Umbauprozesse, da entzündungsbedingte Gewebeveränderungen wie Fibrosierung, Flüssigkeitsverlust der Zellen, Nekrose und Zellschrumpfung (sogenanntes Shrinking) zu einer Organverkürzung führen können. (*Abbildung 9 B*).^{182–186}

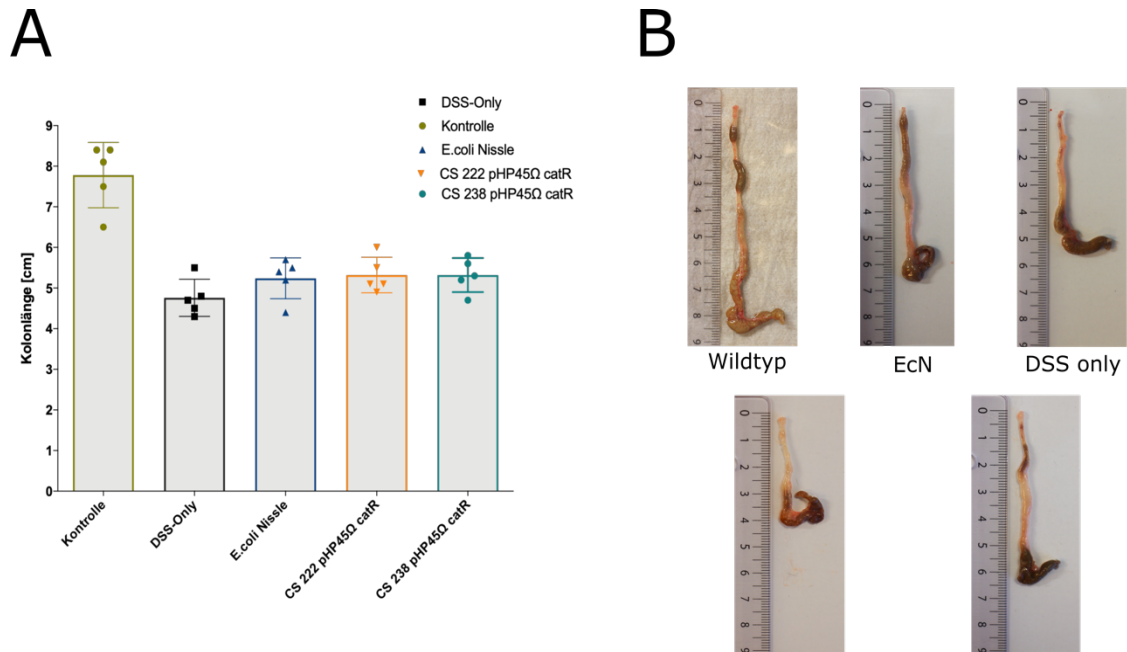


Abbildung 9 Kolonlänge nach DSS-induzierter Kolitis **A** Vergleich der Kolonlänge in cm der unterschiedlichen Gruppen. Gezeigt sind Einzelwerte aller Versuchstiere sowie Mittelwerte (Balken) mit Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. **B** Exemplarische Aufnahmen der Kolonlänge von gesunden Kontrolltieren (Wildtyp), *E.coli* Nissle und DSS-Only Gruppe, CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR (von links nach rechts)

Die Kontrollgruppe gesunder Wildtyp Mäuse, die kein DSS und keine bakterielle Kolonisation erhalten hatten, zeigten die längsten Kolonsegmente. Die Versuchstiere aus der DSS-Only Gruppe wie auch die mit EcN, CS238 pHP45Ω catR und CS222 pHP45Ω catR kolonisierten Versuchstiere zeigten ein deutlich verkürztes Kolon. Zwischen den Versuchsgruppen DSS-Only, EcN, CS238 pHP45Ω catR und CS222 pHP45Ω catR ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Kolonlänge feststellen. (*Abbildung 9 A*) Diese Ergebnisse zeigen, dass eine abgelaufene Entzündungsreaktion im Kolon zur Verkürzung des Organs führt. Die Kolonverkürzung trat bei allen DSS-exponierten Gruppen unabhängig von der Art der bakteriellen Kolonisation in ähnlichem Ausmaß auf.

3.5.5. Eine Kolonisierung durch EcN oder CS238 pHP45Ω catR führt während einer DSS-induzierten Kolitis zu einem erhöhten Vorkommen an neutrophilen Granulozyten im Kolongewebe

Zur Analyse der lokalen Immunantwort nach DSS-induzierter Kolitis erfolgte die Quantifizierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen im Kolongewebe sowie in

mesenterialen Lymphknoten (MLN) mittels Durchflusszytometrie. Die untersuchten Zelltypen umfassen T-regulatorische Zellen (Tregs), Th1-, Th2-, Th17-Zellen und neutrophile Granulozyten. Die Zuordnung der Zellpopulationen basiert auf der im Methodenteil beschriebenen Gating-Strategie (vgl. 2.4.3).

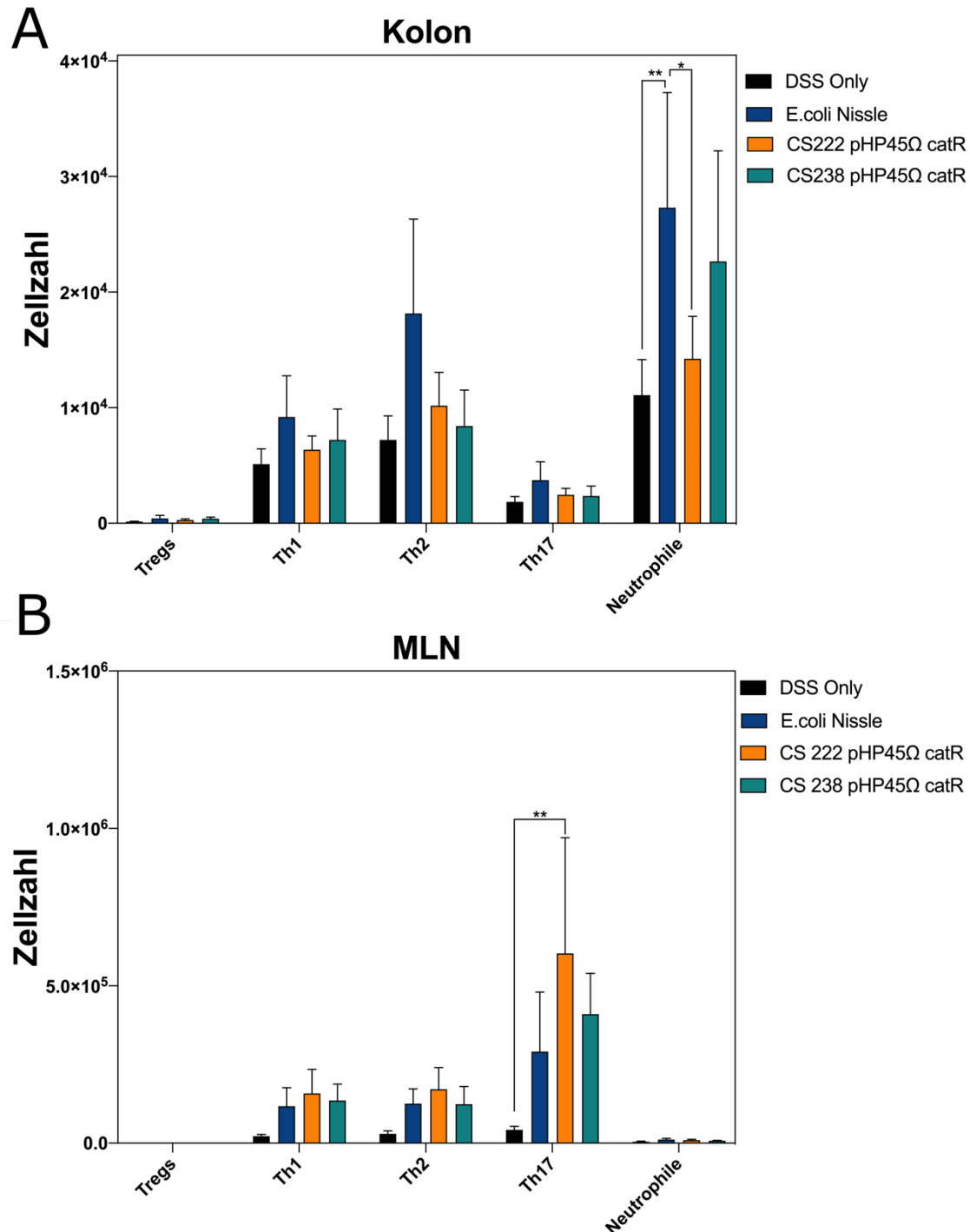


Abbildung 10 Immunzellpopulationen in Organproben nach DSS-induzierter Kolitis. Isolierte Zellen aus Kolongewebe, und mesenterialen Lymphknoten wurden mittels Durchflusszytometrieanalyse untersucht und den Immunzellphänotypen Treg,

Th1, Th2, Th17 und neutrophilen Granulozyten zugeordnet. Dargestellt ist die absolute Zellzahl in A: Kolongewebe B: mesenteriale Lymphknoten, ermittelt durch durchflusszytometrischer Analyse. Die Kolonisation mit EcN bewirkte im Kolongewebe ein erhöhtes Vorkommen von neutrophilen Granulozyten. Vor allem im Vergleich zur DSS-Only Versuchsgruppe zeigten sich signifikant höhere Werte. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. Die Balken bzw. Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 5) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. * p <= 0,05; ** p <= 0,01; *** p <= 0,001; **** p <= 0,0001.

Im Kolongewebe zeigten die Versuchstiere, welche mit EcN oder CS238 pHP45Ω catR kolonisiert wurden, ein erhöhtes Vorkommen an neutrophilen Granulozyten. Insbesondere im Vergleich mit Versuchstieren der DSS-Only und CS222 pHP45Ω catR- Gruppe waren die Anteile dieser Zellpopulation signifikant erhöht (Abbildung 10 A). Zwischen den Gruppen zeigten sich hinsichtlich der Gesamtzahlen von Tregs, Th1-, Th2- und Th17-Zellen im Kolongewebe keine signifikanten Unterschiede.

In den mesenterialen Lymphknoten (MLN) ließ sich bei den Tieren der CS222 pHP45Ω catR- Gruppe die höchste Th17-Zellzahl nachweisen. Im Vergleich zur DSS-Only-Gruppe war dieser Unterschied signifikant. (Abbildung 10 B). Die Th17-Zellzahlen in den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR lagen zwischen den Werten der DSS-Only- und CS222 pHP45Ω catR-Gruppen. Für die übrigen untersuchten Zellpopulationen (Treg, Th1, Th2, und neutrophilen Granulozyten) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den MLN zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

3.5.6. Die Kolonisation mit EcN und CS238 pHP45Ω catR zeigt ein Zytokinprofil mit reduzierter Sekretion proinflammatorischer Mediatoren mit gleichzeitiger Präsenz des antiinflammatorischen Zytokin IL-10

Zur Untersuchung der entzündungsassoziierten Zytokinantwort wurde die Konzentration von IL-1β, TNF-α und IL-10 in Gewebeüberständen von MLN und Kolon nach einer DSS-vermittelten Kolitis mittels ELISA analysiert und miteinander verglichen. Die Auswahl der Zytokine basiert auf ihrer bekannten Relevanz und Rolle in der Inflammationsphase entzündlicher Darmerkrankungen.

IL-1 β

Im Überstand des Kolongewebes zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-1 β Sekretion bei Tieren der DSS-Only Gruppe, sowie der Gruppe, die mit CS222 pHP45 Ω catR kolonisiert wurde (Abbildung 11). Die Konzentrationen in beiden Gruppen lagen über den Werten der Gruppen, die mit EcN bzw. CS238 pHP45 Ω catR behandelt wurden. Die IL-1 β -Werte in der CS222 pHP45 Ω catR-Gruppe waren im Vergleich zu EcN und CS238 pHP45 Ω catR signifikant erhöht. Auch die DSS-Only Gruppe zeigte im Vergleich zu CS238 pHP45 Ω catR signifikant höhere IL-1 β -Spiegel. In den MLN-Proben konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

TNF- α

Für TNF- α zeigten sich in keinem der untersuchten Gewebe signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

IL-10

Die IL-10-Sekretion im Kolongewebe war in der CS222 pHP45 Ω catR-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur EcN-Gruppe. In den MLN ließ sich kein signifikanter Unterschied in der IL-10-Sekretion zwischen den Gruppen nachweisen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Kolonisation mit EcN sowie mit dem ausgewählten Stamm CS238 pHP45 Ω catR mit einer reduzierten IL-1 β -Sekretion im Kolongewebe assoziiert ist. Des weiteren zeigte sich eine tendenziell erniedrigte TNF- α Konzentration in beiden Gruppen, auch wenn keine Signifikanz gezeigt werden konnte. CS238 pHP45 Ω catR wurde aufgrund seiner Eigenschaften (high IL8) ein hohes TLR5 Aktivierungspotenzial zu besitzen, ausgewählt. Im Gegensatz dazu zeigen die Gruppen DSS-Only und CS222 pHP45 Ω catR signifikant höhere IL-1 β -Werte. Zudem war die IL-10 Sekretion im Kolongewebe bei CS222 pHP45 Ω catR im Vergleich zur EcN Gruppe signifikant erhöht, während sich in den mesenterialen Lymphknoten kein signifikanter Unterschied erkennen ließ. In den Gruppen EcN und CS238 pHP45 Ω catR lag ebenfalls eine IL-10 Sekretion vor.

DSS only
 EcN
 CS 222 pHP45Ω catR
 CS 238 pHP45Ω catR

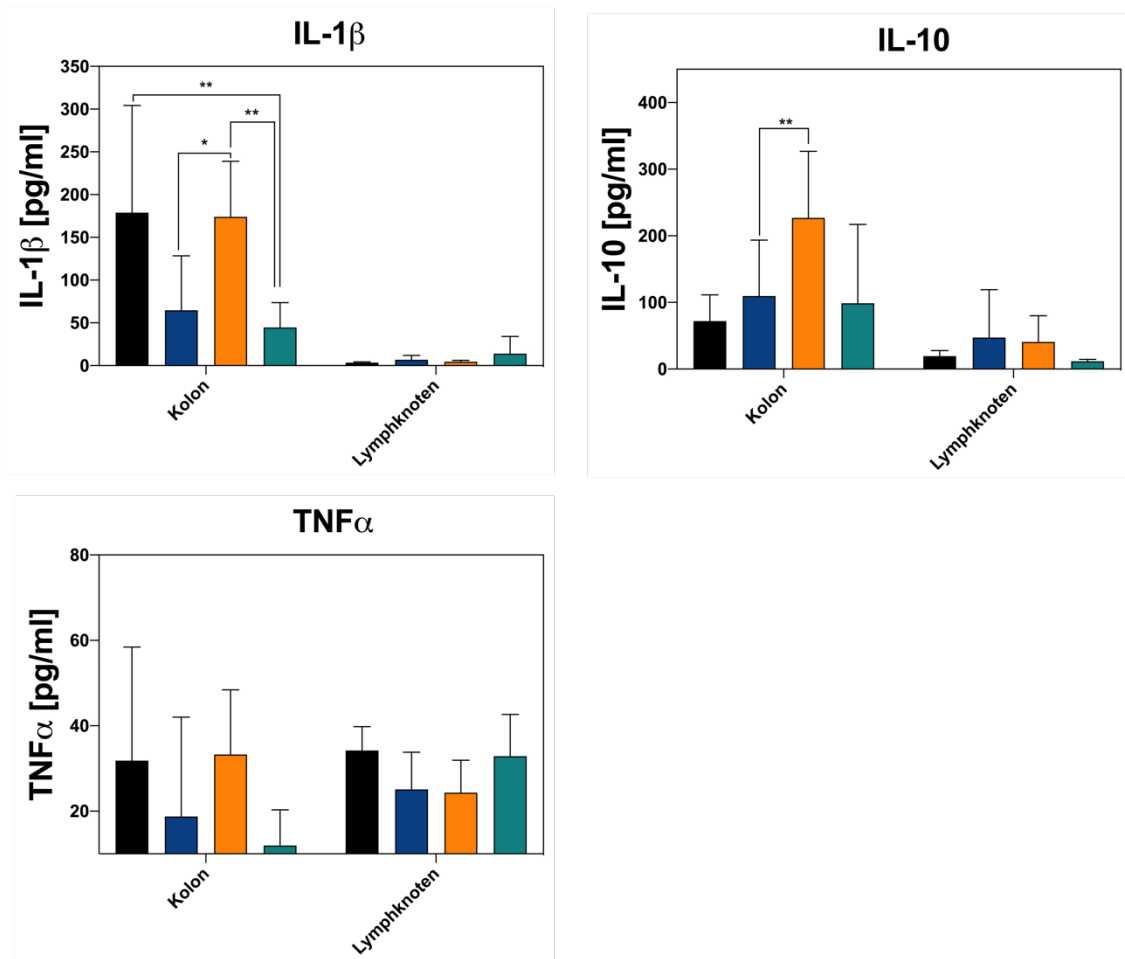


Abbildung 11 *In vivo* DSS Gewebeprobeanalyse der Zytokinsekretion mittels ELISA Analyseverfahren. Analyse von Gewebeprobe aus Kolon, Milz und mesenteriale Lymphknoten nach einer DSS-induzierten Kolitis. Die Versuchstiere wurden zuvor über 3 Tage mit EcN, CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR kolonisiert. Die DSS-Only Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt nur DSS über das Trinkwasser ohne vorherige Kolonisierung. Am Tag der Präparation wurden die Gewebeprobe entnommen und in Zytokinmedium und Lymphozytenmedium inkubiert. Die Zellen wurden ausgesät und nach 72h Inkubationszeit die Überstände abgenommen. Mittels ELISA wurden diese auf ihre Zytokinkonzentration (IL-1β, Tumornekrosefaktor α und IL-10) untersucht. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte mit einem 2Way-Anova Test. Die Balken bzw. Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 5) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

4. Diskussion

Zielsetzung und Ansatz

Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob die Gesamtlänge der *fliC*-Sequenz mit der TLR5-Aktivierung korreliert und ob sich daraus stammspezifische immunmodulatorische, potenziell protektive Effekte ableiten lassen. Hierzu wurden kommensale *E. coli* aus Stuhlproben gesunder Probanden isoliert und charakterisiert. Zwei Isolate mit kontrastierender *fliC*-Länge/TLR5-Antwort (CS222: kurz/niedrig; CS238: lang/hoch) wurden neben dem Referenzstamm *E. coli* Nissle 1917 (EcN) in BMDC-Assays und einem DSS-Kolitismodell getestet. In Vorarbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass EcN protektive Effekte in einer DSS-Kolitis induzierten und diese möglicherweise durch die spezifische *fliC*-Sequenz hervorgerufen wurden⁶⁹. Vor diesem Hintergrund ordnet die folgende Diskussion die erhobenen Ergebnisse in den bestehenden Kontext ein und beleuchtet den Zusammenhang zwischen der Länge der *fliC*-Sequenzen, der TLR5-Aktivität sowie den beobachteten *in vitro* und *in vivo* Effekten.

4.1. Charakterisierung der Isolate: *fliC*-Länge und Schwärmverhalten

Die isolierten Bakterienstämme aus Stuhlproben gesunder Probanden wurden durch *in vitro* und *in vivo* Versuche auf ihr anti-inflammatorisches, immunmodulatorisches Potenzial untersucht. Da wir vermuteten, dass die Länge der *fliC*-Sequenz Auswirkungen auf Funktion, Bindung und Wirkung des Flagellums zeigt, wurde die Länge der *fliC*-Sequenz der Stämme bestimmt und anschließend das Schwärmverhalten der Bakterien untersucht (Abbildung 1). Die Analyse der Schwärmfähigkeit sollte weitere Erkenntnisse zur Funktionalität des Flagellums liefern und diene als Kriterium für die Auswahl geeigneter Isolate für weiterführende Experimente. Das helikale Flagellum ist aus einzelnen Flagellin (FliC) Monomeren zusammengesetzt. Jedes dieser FliC Monomere wiederum ist aus unterschiedlichen Domänen (D0 – D3) aufgebaut¹⁸⁷. Die Länge der *fliC*-Sequenz variiert zwischen den unterschiedlichen Bakterienstämmen und beeinflusst die Flagellen Morphologie und damit auch potenziell die Motilität¹⁸⁸. Die Gesamtlänge allein ist jedoch kein verlässlicher Prädiktor für das Schwärmverhalten, da die funktionelle Bedeutung der einzelnen Domänen und deren Zusammensetzung entscheidend ist¹⁸⁹. Da die Domänenzusammensetzung in unserer Arbeit nicht bestimmt wurde, lassen sich keine Aussagen zur Verteilung konservierter bzw. variabler Bereiche und Domänen ableiten. Um sicherzugehen, dass ein funktionsfähiges Flagellum

ausgebildet wird, wurden für die nachfolgenden Experimente nur Stämme mit Schwärmverhalten ausgewählt.

4.2. TLR5 Rezeptoraktivierung durch kommensale *E.coli* Stämme im Vergleich zu EcN

Um die immunmodulatorischen Effekte von Flagellin zu untersuchen, nutzten wir ihr Potenzial zur TLR5 Rezeptor-Aktivierung. Die isolierten *E.coli*-Stämme aus Stuhlproben gesunder Probanden dienten als Stimulanz und sollten anhand ihrer TLR5-Rezeptoraktivierung charakterisiert werden.

4.2.1. Unterschiede zwischen muriner und humaner TLR5 Antwort

Bei der Verwendung identischer Stimulanzen zeigten sich Unterschiede in der IL-8 Sekretion zwischen murinen und humanen TLR5 HEK Zellen. So induzierten beispielsweise die Stämme CS233, CS247 und CS250 eine hohe IL-8 Produktion in Zellen mit murinen TLR5 Rezeptoren, während in Zellen mit humanem TLR5 im Vergleich dazu eine deutlich geringere Produktion beobachtet wurde (Abbildung 2). Es ist bekannt, dass es zwischen humanen und murinen TLR5 Rezeptoren geringe Variationen in den TLR-Gensequenzen gibt^{55,190}. Die somit entstehenden interspezifischen Unterschiede im Aufbau und Funktion der TLR5 Rezeptoren, sowie die individuelle Variationen zwischen Individuen einer Spezies erschweren einen direkten Vergleich¹⁹¹. Da humane und murine TLR5-Rezeptoren auf identische Stimuli teils unterschiedlich reagieren¹⁹², wurde in unserem Versuchsdesign bewusst entschieden, beide Rezeptorvarianten zu berücksichtigen. Daher nutzten wir sowohl HEK Zellen mit humanen als auch mit murinen TLR5 Rezeptoren. Die Ergebnisse der murinen TLR5 Rezeptoren diente als Vorbereitung zur Untersuchung der Stämme im DSS-Maus Modell und sollten anschließend die Interpretation der Daten im murinen *in vivo* Modell ermöglichen. Die Ergebnisse bei der Verwendung der humanen TLR5-Rezeptoren dienten zur Untersuchung des Bindungsverhaltens als Ausblick für die Translation in die Klinik.

In der Familie der TLR Rezeptoren bestehen grundlegende strukturelle Ähnlichkeiten im Aufbau¹⁹³. Dennoch wird vermutet, dass bestimmte Sequenzen und Strukturen durch evolutionäre Veränderung voneinander abweichen und es so zu Unterschieden in der Bindung von Liganden und der Affinität der Rezeptoren kommt^{194–196}. Darüber hinaus wird vermutet,

dass die gleichen TLR Rezeptoren in verschiedenen Spezies unterschiedlich stark auf Liganden reagieren und dass identische Liganden eine unterschiedliche Reaktion je nach Wirt auslösen^{55,197}. Eine eindeutige Erklärung hierfür steht bislang aus. Eine mögliche Hypothese ist, dass PRRs und insbesondere TLR-Rezeptoren auf Liganden reagieren, die dem Wirt potenziell gefährlich werden können. So gibt es bei Mäusen beispielsweise andere kommensale Darmbakterien, die toleriert werden, als beim Menschen⁵⁵. Diese Unterschiede können die Signalunterschiede zwischen mTLR5 und hTLR5 Rezeptoren erklären.

Zusammenfassend zeigt sich in diesem Abschnitt, dass in h/m-TLR5-überexprimierenden HEK-Zellen die IL-8-Sekretion stamm- und speziesabhängig variiert. Eine Erklärung kann die speziesabhängige Toleranz auf unterschiedliche Mikroorganismen sein.

Auf EcN normiert zeigten einzelne Isolate (z. B. CS228/CS224/CS233) hohe, andere (z. B. CS245/CS241/CS242) niedrige Werte (Abbildung. 2A). Die Auswahl der Isolate CS238 (ähnliche *fliC*-Länge wie EcN, hohes IL-8-Signal) und CS222 (verkürzte *fliC*-Sequenz, niedriges IL-8-Signal) für Folgeexperimente wurde anhand dieser Ergebnisse getroffen (Abbildung. 2 B). Unterschiede zwischen nicht transformierten Stämmen und Chloramphenicol-resistenten Klonen blieben aus.

4.3. Die regulatorische Rolle von TLR5 in der Modulation der TLR-vermittelten Inflamationsreaktion und Zytokinproduktion in murinen BMDC's nach Stimulation mit *E.coli* Isolaten

Zur Diskussion stehen die Ergebnisse aus der Stimulation muriner knochenmarksabgeleiteter dendritische Zellen (BMDCs) von Wildtyp-Mäusen sowie von TLR5 Knock-out- und TLR2/4 Knock-out-Mäusen (TLR2/4^{-/-} und TLR5^{-/-}) mit verschiedenen *E.coli* Isolaten. Als Read-out diente die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86 sowie des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (MHC-II) mittels Durchflusszytometrie (FACS). Zusätzlich wurde die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α in den Zellüberständen mittels ELISA analysiert. Ziel der Untersuchungen war Aufschluss über die unterschiedlichen Einflüsse der *E.coli* Isolate auf die Reifung und Differenzierung der BMDC's zu erhalten. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse der

Stimulation mit den *E.coli* Isolaten CS222 und CS238 mit den Ergebnissen der Stimulation mit EcN verglichen werden.

4.3.1. Immunmodulatorische Funktion von TLR5

Nach der Stimulation der BMDC's (Wildtyp, TLR2/4^{-/-} und TLR5^{-/-}) mit den ausgewählten *E.coli* Isolaten und EcN untersuchten wir die Zellüberstände auf die Konzentration der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Abbildung 3). Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte TNF- α -Konzentration bei TLR5^{-/-}-BMDCs im Vergleich zu Wildtyp und TLR2/4^{-/-}-BMDCs. Zusätzlich konnten wir eine erhöhte IL-6 Konzentration in TLR5^{-/-}-BMDCs und Wildtyp im Vergleich zu TLR2/4^{-/-}-BMDCs nachweisen.

Die immunmodulatorische Funktion von TLR5 ist in der Literatur gut beschrieben. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin und trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase bei, indem es die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalwegen reguliert^{59,69,71,198}. Das Fehlen von TLR5 führt zu einer Aufhebung dieser regulatorischen Kontrolle, was sich in einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 widerspiegelt. Weitere Arbeiten zeigen, dass in Abwesenheit von TLR5 eine Überaktivierung anderer TLR-Signalwege, insbesondere TLR2 und TLR4, auftritt¹⁹⁹. TLR5 moduliert die MyD88-abhängige Signaltransduktion dieser Rezeptoren und begrenzt so die Intensität der Entzündungsantwort²⁰⁰. Kommt es zur Aufhebung dieser Regulation, führt dies zu einer Dysbalance mit überschießender Zytokinfreisetzung und gesteigerter Reaktivität gegenüber mikrobiellen Stimuli^{200,201}. Die von uns beobachtete erhöhte TNF- α -Produktion in TLR5^{-/-}-BMDCs bestätigt diese Mechanismen und unterstreicht die Rolle von TLR5 als negativer Regulator inflammatorischer Signale. Die parallele Zunahme von IL-6 in Wildtyp- und TLR5^{-/-}-BMDCs legt nahe, dass die IL-6-Produktion weniger direkt durch TLR5, sondern eher durch TLR4-vermittelte LPS-Signale beeinflusst wird²⁰²⁻²⁰⁴. Somit scheint die TLR5-Aktivierung insbesondere für die Begrenzung der TNF- α -Produktion relevant zu sein, während ihr Einfluss auf IL-6 sekundär ist. In der Analyse der IL-1 β -Konzentration zeigten sich keine konsistenten oder signifikanten Trends. Bei Betrachtung der Unterschiede in der TNF- α -Produktion abhängig vom Stimulus (EcN, CS222, CS238 und CS17 Delta FliC) zeigte sich keine Sekretion in den TLR2/4^{-/-}-BMDCs. In den TLR5^{-/-}-BMDCs hingegen kam es zu erhöhter TNF- α -Produktion bei allen Stimuli. Ein signifikanter Unterschied war nur zwischen

den Stimuli CS222 und CS238, sowie zwischen EcN und CS238 zu beobachten. Möglicherweise kommt es bei Abwesenheit von TLR5 zu einer kompensatorischen, ungehemmten Überaktivierung der anderen TLR-Signalwege. Die vorhandenen Signale bei CS17 Delta FliC zeigen, dass unabhängig von der Anwesenheit von Flagellin eine Aktivierung der weiteren TLR-Signalwege stattgefunden hat.

Zusammenfassend lässt sich aus unseren Daten ableiten, dass TLR5 eine zentrale Rolle in der Modulation der angeborenen Immunantwort spielt. Durch seine Flagellin-vermittelte Aktivierung reguliert TLR5 sowohl direkt die proinflammatorische Zytokinproduktion als auch indirekt die Aktivität anderer TLRs^{199,205}. Das Fehlen von TLR5 führt zu einer Enthemmung dieser Signalwege und in der Folge zu einer verstärkten TNF- α -Produktion und proinflammatorischen Dysbalance. Trotz vergleichbar erhöhter IL-6-Spiegel in Wildtyp- und TLR5^{-/-}-BMDCs und uneindeutiger IL-1 β -Veränderungen stützen unsere Ergebnisse die Annahme, dass eine verminderte TLR5-Aktivierung mit einer verstärkten TNF- α -Immunreaktion assoziiert ist. Insgesamt bestätigen die Befunde die essenzielle regulatorische Rolle von TLR5 in der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase. Als weitere Beobachtung ging hervor, dass die Stimulation mit isoliertem Flagellin (Flagellin pure) keine ausreichende Stimulation zur Zytokinproduktion bot. Es wurde bereits gezeigt, dass isolierte Flagellin-Präparate im Vergleich zu viablen Bakterien keine ausreichende TLR5-Aktivierung bewirken und keine antiinflammatorischen Effekte auslösen²⁰⁶. Insbesondere wurde nachgewiesen, dass Flagelline aus kommensalen Darmbakterien zwar von TLR5 erkannt werden, aber nur eine schwache oder „stille“ TLR5-Aktivierung hervorrufen, die nicht zu einer ausgeprägten antiinflammatorischen Immunantwort führt^{206,207}. Vor allem zeigen die Ergebnisse aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe diese Effekte im Vergleich zu den symbiotischen Eigenschaften von EcN⁶⁹.

4.3.2. Analyse der Maturation muriner BMDC's nach Stimulation mit *E.coli* Isolaten

Die Analyse der Expression von Reifungsmarkern muriner, aus Knochenmark gewonnenen dendritische Zellen (BMDCs) nach Stimulation mit verschiedenen *E. coli*-Isolaten erlaubt eine differenzierte Betrachtung der regulatorischen Rolle von TLRs, insbesondere von TLR2, TLR4 und TLR5. Neben der Zytokinfreisetzung spiegeln die Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle MHC-II, CD80 und CD86 den Aktivierungs- und Reifungszustand der

BMDCs wider und geben Aufschluss über die durch bakterielle Stimuli ausgelösten Signalwege (Abbildung 4). Unsere Ergebnisse zeigen ein deutlich Genotyp-abhängiges Muster. In TLR2/4^{-/-}-BMDCs war die Expression aller untersuchten Reifungsmarker nach bakterieller Stimulation signifikant vermindert, was die zentrale Bedeutung dieser Rezeptoren für die Induktion der dendritischen Zellmaturation unterstreicht^{208,209}. Die Stimulation von BMDCs mit Flagellin Ultrapure, führte ebenfalls zu einer selektiven Aktivierung und Maturation, jedoch in unseren Versuchen in allen Genotypen mit deutlich schwächeren Signalen als mit viablen Bakterien. Es bietet Hinweise darauf, dass Flagellin als isoliertes Protein nur zu einer vergleichbar geringeren BMDC-Maturation ausreicht. Stimulusabhängig zeigten sich weder zwischen den getesteten *E.coli*-Isolaten noch zwischen MOI 1 und 10 signifikante Unterschiede in der Maturationsmarkerinduktion, was auf eine Sättigung der Induktion bereits bei niedriger Bakterienzahl deutet. Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand spielt TLR4 eine Schlüsselrolle in der LPS-vermittelten Aktivierung und Apoptose von DCs^{208,209}. TLR2 hingegen vermittelt die Reifung vor allem nach Stimulation mit Peptidoglykanen und Lipoteichonsäure²⁰⁸, Hauptbestandteilen grampositiver Zellwände. Die TLR5-abhängige Signalübertragung über die Signalproteine TRIF und ERK1/2 kann die Antigenpräsentation, Proliferation und Zytokinproduktion der BMDCs modulieren²¹⁰. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deuten zudem darauf hin, dass die Art des bakteriellen Stimulus, ob symbiontisch oder pathobiontisch, die Maturationszustände und die Expression immunregulatorischer Proteine wesentlich beeinflusst²¹¹.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Reifung muriner BMDCs nach Stimulation mit *E.coli*-Isolaten primär über TLR2- und TLR4-abhängige Signalwege vermittelt wird, während TLR5 eine modulierende, regulierende Funktion einnimmt. Es ist ersichtlich, dass TLR2/4 den Hauptantrieb der Maturationssignale liefern, während TLR5 vor allem modulierend wirkt. Die Literatur zeigt ebenfalls, dass die durch TLR5 vermittelte Begrenzung der CD40-Induktion zu einer Modulation der Maturation von BMDCs führt und stützt damit unsere Vermutung. Vergangenen Arbeiten haben ebenfalls gezeigt, dass die Stimulation von BMDCs mit Flagellin zu einer selektiven und im Vergleich zu TLR2- und TLR4-Liganden abgeschwächten Expression von Reifungsmarkern und proinflammatorischen Zytokinen führt, einschließlich CD40²¹². Dies deutet darauf hin, dass TLR5-Signale die Ausprägung kostimulatorischer Moleküle wie CD40 begrenzen und die Maturation der BMDCs

modulieren²¹². Im Vergleich induzieren TLR2- und TLR4-Liganden eine deutlich stärkere Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC-II auf BMDCs, was die zentrale Rolle dieser Rezeptoren für die vollständige DC-Maturation unterstreicht^{212,213}. Die Modulation durch TLR5 bewirkt, dass BMDCs nach Flagellin-Stimulation in einem weniger stark kostimulatorischen, (semi-)maturen Zustand verbleiben, was die Immunaktivierung dämpft und die Balance zwischen Toleranz und Immunantwort beeinflusst²¹².

Zur weiteren Klärung der TLR5-Rolle bieten sich Folgeschritte an, wie zum Beispiel eine zeitaufgelöste (mehrere Messungen während der Stimulation, anstatt einer Endmessung) und dosisgestaffelte Stimulation, sowie kombinierte MAMP-Gaben zur Prüfung synergistischer Effekte. Ergänzend sollten Nicht-Flagellin-MAMPs quantitativ erfasst werden, um ihren Anteil an der beobachteten Sättigung der Maturation einzuordnen.

4.4. Vergleich anti-inflammatorischer Effekte zwischen kommensaler *E.coli* Stämme und EcN im *in vivo* DSS-Kolitis Mausmodell

Um die Krankheitsbilder der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu verstehen und Therapeutika zu entwickeln bedarf es Tiermodelle mit experimentell induzierten Darmentzündungen, die es erlauben in einer reproduzierbaren und kontrollierten Umgebung Versuche durchzuführen. Eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle, ist die in Mäusen durch Dextran Sodium Sulfate (DSS) Applikation hervorgerufene DSS-Kolitis. Um das anti-inflammatorische Potenzial des symbiontischen EcN und weiterer, beispielsweise kommensale *E.coli*-Stämme zu untersuchen, bietet die DSS-Kolitis ein geeignetes Umfeld. Durch die Kolonisierung mit vorher festgelegten Bakterien, kann ein immunkompetenten Wirt mit modifiziertem Mikrobiom geschaffen werden, in dem die Effekte der Kolonisation untersucht werden können.

Auf Grundlage der *in vitro* Untersuchungen wurden im nächsten Schritt die ausgewählten *E.coli* Isolate (CS238 pHP45 Ω catR und CS222 pHP45 Ω catR) in einem *in vivo* DSS-Kolitismodell auf ihre pro- oder anti-inflammatorischen Effekte im intestinalen Kontext untersucht. Der probiotische Stamm EcN, dessen protektiver Effekt im DSS-Kolitismodell bereits mehrfach beschrieben wurde^{69,70,99,100,107}, diente hierbei als positiver Referenzstamm. Im direkten Vergleich sollte überprüft werden, ob ein kommensaler *E.coli* Stamm mit hoher TLR5 Aktivierung, wie der ausgewählte Stamm CS238 pHP45 Ω catR, eine vergleichbare Schutzwirkung entfalten kann wie EcN, während von einem Stamm mit niedriger TLR5 Aktivierung, wie der ausgewählte Stamm CS222 pHP45 Ω catR, ein reduzierter oder ausbleibender protektiver Effekt ausgeht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der DSS-Kolitis Experimente diskutiert (vgl. 3.5) und in den Kontext der vorangegangenen zellulären Analysen sowie der bekannten Literatur zu TLR5-vermittelten Immunmechanismen und mikrobiellem Schutzzpotenzial gestellt.

Kolonisation

Im ersten Teil des *in vivo* Versuchs zeigt sich, dass eine Kolonisation der Mäuse mit ausgewählten *E. coli*-Stämmen erfolgreich über das Trinkwasser erfolgen kann. Die Analyse der Stuhlproben der Mäuse vor Kolonisation ergab, dass eine geringgradige endogene

Besiedelung des Verdauungstraktes durch Bakterien bereits stattgefunden hatte. Dies ließ sich anhand der CFU vor Kolonisation im Endoagar nachweisen. Nach einer dreitägigen Kolonisationszeit konnte eine signifikante Zunahme der CFU beobachtet werden, was auf eine Erhöhung der Bakterienzahl im Stuhl der Mäuse hinweist. Zusätzlich wurden die Stuhlproben auf einem mit Chloramphenicol versetzten Selektivagar kultiviert. Während vor der Kolonisation kein Wachstum detektiert werden konnte, ließ sich nach der Verabreichung der transformierten, chloramphenicolresistenten *E.coli*-Stämme ein deutliches Wachstum beobachten. Der Nachweis Chloramphenicolresistenter Kolonien belegt, dass sich die Kolonisation der Versuchstiere mit den ausgewählten Stämmen erfolgreich etablieren ließ. Die Kolonisation von Mäusen mit Bakterien über das Trinkwasser ist eine etablierte Methode und wird in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Applikation von Bakterien über Trinkwasser eine effektive Methode zur Kolonisation des Gastrointestinaltrakts darstellt²¹⁴. Dies konnte beispielsweise durch die konsistente Kolonisation mit *Salmonella* Typhimurium mit kontaminiertem Trinkwasser gezeigt werden, die eine vergleichbare Kolonisation wie die klassische orale Gavage zeigte, ohne die Belastungen und Risiken einer Zwangsapplikation²¹⁴. Darüber hinaus belegen weitere Studien, dass Bakterien welche über das Trinkwasser appliziert werden, einschließlich pathogener und antibiotikaresistenter Stämme, den Darm von Mäusen besiedeln und persistieren können^{215,216}.

Gewicht

Die Analyse der Körpergewichtsverläufe, während der DSS-Applikation zeigte, dass alle Versuchsgruppen im Verlauf der induzierten Kolitis eine deutliche Gewichtsabnahme erfuhren (Abbildung 7). Bei detaillierter Betrachtung ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Gewichtsreduktion zwischen den Gruppen. Somit konnte lediglich festgestellt werden, dass die DSS-induzierte Kolitis erwartungsgemäß zu einem starken Gewichtsverlust führte, ohne dass die Kolonisation mit EcN oder mit den ausgewählten *E. coli*-Isolaten CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR einen messbaren protektiven Effekt auf diesen Parameter ausübte. Durch zahlreiche experimentelle Studien wird belegt, dass Gewichtsverlust ein zentrales, klinisches Merkmal einer fortschreitenden Entzündungsreaktion im DSS-Kolitismodell ist. Durch die hervorgerufene Kolitis kommt es zu typischen Symptomen, wie Diarrhoe, blutige Stühle, Kolonverkürzung und zu einem progressiven Verlust an Körpergewicht, der mit dem Schweregrad der Entzündung korreliert^{217–221}. Der

Gewichtsverlust basiert auf eine Kombination aus verminderter Nahrungsaufnahme, Malabsorption, erhöhter intestinaler Permeabilität und systemischer Entzündungsreaktion^{167,221,222}. Typischerweise setzt der Gewichtsverlust bereits wenige Tage nach DSS-Applikation ein und ist in der Ausprägung durch die DSS-Konzentration und Dauer der Applikation modulierbar^{217,218}. Auch wenn einige Arbeiten den Parameter Gewicht als einen verlässlichen klinischen Marker für die Krankheitsaktivität und den Verlauf der DSS-Kolitis sehen^{217,219,221}, gibt es durchaus kritische Stimmen, die betonen, dass die Gewichtsabnahme als Read-Out eine Reihe an Limitationen und Fehlerquellen aufweist, da sie von Faktoren, wie der genetische Hintergrund der Tiere, die DSS-Dosis, das Geschlecht und die Ernährung, welche den Gewichtsverlust signifikant beeinflussen können^{218,223,224}. Zusätzlich können individuelle Unterschiede in Flüssigkeits- oder Nahrungsaufnahme, Stress und Stuhl- oder Urinabgabe unmittelbar vor der Gewichtsbestimmung die Messwerte beeinflussen, ohne dass diese mit der intestinalen Entzündung korrelieren müssen. Zudem tritt ein ausgeprägter Gewichtsverlust im Rahmen einer Kolitis häufig erst bei fortgeschrittener epithelialer Schädigung auf^{225–227}.

In Zusammenschau empfiehlt es sich den Faktor Gewichtsabnahme stets mit weiteren klinischen, histologischen und molekularen Parametern zu kombinieren, um die Schwere der Entzündung im DSS-Kolitismodell zuverlässig zu beurteilen. Die Messintervalle sollten möglichst eng gewählt werden und über einen den gesamten Zeitraum der DSS-Applikation erfasst werden. Mit der Kombination aus histologischen Analysen der Kolonschleimhaut, Betrachtung der Kolonlänge, der Beurteilung der Klinik mittels DAI, sowie Zytokin und Durchflusszytometrische Analysen in unserem *in vivo* DSS-Experiment wurden möglich zahlreiche Faktoren miteinbezogen, um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erreichen.

Histologie

Wir führten eine mikroskopische Analyse der histologischen Präparate aus den Kolonsegmenten der Versuchstiere durch. Sie diente dazu den Einfluss der Kolonisation durch EcN und den ausgewählten *E.coli*-Stämme auf die DSS-induzierte Kolitis auf histologischer Ebene zu untersuchen und mögliche protektive Effekte der bakteriellen Kolonisation auf die strukturelle Integrität des Darmepithels und den Schweregrad entzündlicher Gewebeveränderungen zu erfassen (Abbildung 8). Die Beurteilung erfolgte anhand eines standardisierten, verblindet durchgeführten histopathologischen Scoring-Systems (Tabelle 16)

Die Auswertung unserer Daten zeigte signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe (DSS-Only) und den kolonisierten Versuchsgruppen. Die Tiere, die keiner bakteriellen Kolonisation unterzogen wurden, wiesen deutlich höhere HCS-Werte auf als die Tiere mit vorangegangener bakterieller Kolonisation. Insbesondere ließen sich in der EcN-Gruppe signifikant geringere, histologische Schädigungsmerkmale beobachten. Diese Befunde stehen im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, in denen ein protektiver Effekt von EcN im DSS-Kolitismodell beschrieben wurde⁶⁹. Für die Kolonisation mit den transformierten, kommensalen *E.coli*-Stämmen CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion des HCS im Vergleich zur DSS-only-Gruppe festgestellt werden. Beide Stämme führten somit zu einer messbaren Verminderung der histologischen Schädigung. Im Vergleich zur EcN-Gruppe fielen diese protektiven Effekte jedoch geringer aus. Diese Beobachtung legt nahe, dass eine bakterielle Kolonisation mit kommensalen *E. coli* Stämmen grundsätzlich einen mildernden Einfluss auf die DSS-induzierte Entzündung haben kann, das Ausmaß dieser Wirkung jedoch stammspezifisch variiert.

Typische Merkmale einer DSS-induzierten Kolitis umfassen eine ausgeprägte Infiltration der Mukosa und Submukosa durch neutrophile Granulozyten, Kryptenverlust, Ulzerationen sowie eine Desintegration der epithelialen Barrierefunktion^{166,171,217,219,222}. Diese Merkmale sind bereits oft beschrieben und werden als zentrale pathologische Veränderung einer DSS-Kolitis gewertet^{166,171,219,222,225}. Die protektiven Effekte von EcN auf die strukturelle Integrität des Darmepithels, die Ausprägung entzündlicher Gewebeeränderungen und Erhaltung der intestinalen Homöostase wurden in Studien bereits vielfach beschrieben^{69,70,93,107,111,228}. Die Verwendung des HCS zur objektiven Bewertung der Gewebeeränderung und des Schweregrads einer Entzündung ist etabliert und die Aussagekraft wird in präklinischen Studien genutzt.

Disease-Activity Index

Zur klinischen Verlaufskontrolle wurde während der DSS-Applikation täglich der Gesundheitszustand der Versuchstiere anhand eines standardisierten Disease-Activity-Index (DAI) erfasst (Tabelle 15). Die Analyse der DAI-Verläufe zeigte, dass Tiere die mit *E. coli* Nissle 1917 (EcN) und CS238 pHP45Ω catR kolonisierten Gruppen signifikant geringere DAI-Werte aufwiesen als die Tiere der Kontrollgruppe (DSS-Only) sowie der Gruppe, die mit dem

Stamm CS222 pHP45Ω catR kolonisiert wurde. Die geringere klinische Krankheitsaktivität in den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR deutet auf einen protektiven Effekt dieser Stämme im Kontext der DSS-induzierten Kolitis hin. Diese Beobachtungen bestätigen die ursprüngliche Hypothese, dass EcN eine antiinflammatorische Wirkung entfaltet und den Schweregrad der Kolitis mindern kann. Darüber hinaus unterstützen die Daten die Annahme, dass auch ein kommensaler *E. coli*-Stamm mit vergleichbaren funktionellen Eigenschaften, insbesondere einer langen *fliC*-Sequenz und einem hohen TLR5-Aktivierungspotenzial, ähnliche Effekte hervorrufen kann. Die niedrigeren DAI-Werte von CS238 pHP45Ω catR werden mit protektiven Effekten in Verbindung gesetzt und unterstreichen damit die potenzielle immunmodulatorische Bedeutung stammabhängiger Flagellinstrukturen im Kontext bakterieller Kolonisation und epithelialer Homöostase.

Die Erhebung eines DAI zur klinischen Beurteilung der Krankheitsaktivität ist eine etablierte Methode, die in Studien als standardisiertes Instrument eingesetzt wird, um den Verlauf und die Schwere einer Kolitis anhand von Parametern wie Körperhaltung, Fellbeschaffenheit, Rektalblutung und Stuhlkonsistenz zu erfassen und mit histologischen sowie molekularen Befunden zu korrelieren^{217,219,229-231}. Die Erhebung des DAI erlaubt eine objektive Einschätzung der Krankheitsaktivität und des Schweregrads einer Kolitis und korreliert eng mit histologischen und molekularen Entzündungsparametern^{217,219,229,231}. Die Literatur zeigt, dass der DAI insbesondere während der akuten Entzündungsphase ansteigt. Dadurch kann er als Marker für die Beurteilung von Therapieeffekten eingesetzt werden und erlaubt den Vergleich unterschiedlicher Versuchsgruppen^{217,219,229}. Trotz dieser aufgezeigten Vorteile der DAI Bestimmung befassen sich mehrere wissenschaftlichen Arbeiten kritisch mit der Erhebung des DAI im DSS-Kolitis Modell und zeigen spezifische Fehlerquellen und Nachteile auf: Der DAI ist ein semiquantitativer, beobachterabhängiger Score, dessen Bewertung von Parametern, wie Körperhaltung, Fellzustand und Stuhlkonsistenz einer erheblichen Subjektivität unterliegt^{232,233}. Es wird betont, dass der DAI nicht immer mit objektiven histologischen oder molekularen Entzündungsparametern korreliert und besonders bei geringen Ausprägungen der Kolitis ungenau sein kann^{229,232,233}. Trotz verblindeter Durchführung bei der Erhebung der DAI kann eine vollständige Objektivität nicht gewährleistet werden.

Aus diesem Grund sollte der DAI idealerweise durch zusätzliche, objektivere Parameter ergänzt werden, etwa durch, wie zuvor beschriebene, histologische Befunde, Gewichtsentwicklung oder Biomarker für Entzündungsaktivität. Eine Kombination mehrerer unabhängiger Bewertungsansätze erhöht die Aussagekraft und Validität der erhobenen Daten und erlaubt eine bessere Beurteilung über den Schweregrad der Krankheitsaktivität im DSS-Kolitis Modell.

Kolonlänge

Im direkten Vergleich mit den Kolonlängen gesunder Tiere zeigte sich eine deutliche Verkürzung der Kolonabschnitte in allen Versuchsgruppen mit DSS-induzierter Kolitis. Zwischen den einzelnen behandelten Gruppen (DSS-Only, EcN, CS222 pHP45Ω catR und CS238 pHP45Ω catR) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kolonlänge festgestellt werden (Abbildung 9). Im Rahmen einer Kolitis kommt es infolge der entzündlichen Prozesse im Kolongewebe zu strukturellen Umbauprozessen, wie beispielsweise ein fortschreitender Flüssigkeitsverlust, epitheliale Schädigung und eine makroskopisch messbare Verkürzung des Kolons^{217,219,234}. Zur Erfassung dieser Veränderungen wurde in unserem Versuch die Kolonlänge der Tiere nach Abschluss der DSS-Applikation vermessen. Als Referenz dienten Vergleichsdaten gesunder Wildtyp-Mäuse ohne DSS-Behandlung. Die Interpretation der Kolonlängen-Daten wird durch mehrere methodischen und biologischen Faktoren erschwert. Zum einen ist die exakte Festlegung des proximalen und distalen Messpunktes während der Präparation fehleranfällig und kann zu variablen Messdaten führen^{166,170}. Leichte Unterschiede bei der Abtrennung, Zugspannung oder Ausrichtung des Gewebes beeinflussen das Messergebnis. Zum anderen unterliegt die Kolonlänge natürlicher individueller Schwankung, die sich u. a. aus Alter, Körpergröße, genetischer Veranlagung und Hydratationsstatus der Tiere ergibt¹⁷⁰.

Trotz dieser Einschränkungen bestätigen unsere Ergebnisse die in der Literatur beschriebene Tendenz, dass entzündliche Prozesse im Kolon im Rahmen einer DSS-induzierten Kolitis mit einer Reduktion der Kolonlänge einhergeht^{171,217,219,234}. Die Kolonlänge kann somit als ergänzender makroskopischer Parameter zur Bewertung des Entzündungsgrades herangezogen werden, sollte jedoch stets im Zusammenspiel mit funktionellen und histologischen Befunden interpretiert werden.

FACS und immunologische Untersuchungen

Die bisherigen Analysen zur Gewichtsveränderung, dem Disease-Activity-Index (DAI) und der histopathologischen Bewertung zeigten, dass eine Kolonisation mit EcN die Ausprägung einer DSS-induzierten Kolitis mildern. Zur Untersuchung weiterer Indikatoren mildernder Effekte führten wir immunologische Analysen mittels Durchflusszytometrie durch und bestimmten die Zytokinzusammensetzung in den Überständen der Zellkulturen. Die Analyse der absoluten Zellzahlen im Kolon zeigte, in den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR (hohe TLR5 Aktivierung) ein erhöhtes Auftreten neutrophiler Granulozyten. Umgekehrt zeigten sich in den Gruppen DSS-Only und CS222 pHP45Ω catR (niedrige TLR5 Aktivierung) ein geringeres Vorkommen (Abbildung 10). Neutrophile Granulozyten sind zentrale Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und spielen eine entscheidende Rolle in der initialen Abwehr von Pathogenen. Sie infiltrieren entzündetes Gewebe, phagozytieren Mikroorganismen und setzen reaktive Sauerstoffspezies sowie antimikrobielle Substanzen frei²³⁵. In der Pathophysiologie der Kolitis tragen neutrophile Granulozyten sowohl zur Bekämpfung von Pathogenen als auch zur Gewebeschädigung bei, insbesondere bei übermäßiger oder anhaltender Aktivierung. Aktuelle Studien zeigen die vermehrte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Kolongewebe in DSS-induzierter Kolitis. Sie sind essenziell für die Abwehr pathogener Keime, indem sie Mikroorganismen phagozytieren und antimikrobielle Substanzen freisetzen. Gleichzeitig kann durch eine überschießende oder dysregulierte Aktivierung eine erhöhte Gewebeschädigung und eine Verstärkung der Entzündung auftreten^{235–237}. Es wurde gezeigt, dass die Funktion der Neutrophilen kontextabhängig ist und eine kontrollierte Infiltration die Heilung und Wiederherstellung der Barrierefunktion fördert, während eine exzessive Aktivierung die Pathogenese der Kolitis durch verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verschlechtert^{78,235,237}. Das vermehrte Auftreten neutrophiler Granulozyten in den Gruppen mit milderer Krankheitsausprägung (EcN und CS238 pHP45Ω catR) weist auf eine effektive, kontrollierte Immunantwort hin^{238,239}. Trotz der typischerweise mit der Schwere der Entzündung korrelierenden Infiltration neutrophiler Granulozyten zeigte sich in diesem Experiment ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen in den Gruppen mit milderer Kolitis (EcN und CS238 pHP45Ω catR) im Vergleich zu den Gruppen mit stärker ausgeprägter Entzündung (DSS-Only, CS222 pHP45Ω catR). Für diese Beobachtung existieren mehrere mögliche Erklärungsansätze. Bei einer stark entzündeten Mukosa tritt eine erhöhte Apoptoserate oder sekundäre Nekrose der Neutrophilen auf^{240,241}, wodurch die Zellzahl im Gewebe und

entsprechend in der FACS-Analyse reduziert erscheinen. Allgemein kann eine massive Gewebeschädigung während der Probenverarbeitung zu Zellverlusten führen, was die Detektionsrate weiter senkt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Neutrophile im Rahmen systemischer Entzündungen aus dem Gewebe in andere Kompartimente wie Lymphknoten oder Milz migrieren können, sodass eine reduzierte Zellzahl im Kolon auch auf Umverteilung zurückzuführen sein könnte²⁴². Ein weiterer Aspekt betrifft die zeitliche Dynamik der Neutrophilenantwort: Als frühe Effektorzellen des angeborenen Immunsystems infiltrieren Neutrophile meist zu Beginn des entzündlichen Geschehens²⁴³. In stark fortgeschrittener Kolitis können diese bereits verbraucht oder apoptotisch eliminiert worden sein, während in milde ausgeprägten Entzündungen die Rekrutierung noch aktiv besteht^{244,245}. Abschließend ist nicht auszuschließen, dass methodische Aspekte wie Unterschiede in der Gewebequalität, Präparationstechnik oder Zellviabilität die Ergebnisse beeinflusst haben. Vor diesem Hintergrund erscheint die Interpretation der Neutrophilenzahlen im Kolon kontextabhängig und sollte stets im Zusammenspiel mit klinischen, histologischen und zytokinbasierten Parametern erfolgen.

Die Analyse der mesenterialen Lymphknoten ergab eine erhöhte Frequenz von Th17-Zellen in der Gruppe CS222 pHP45Ω catR im Vergleich zur DSS-Only Gruppe, die Anzahl der Th17-Zellen in den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR lag im mittleren Durchschnitt. Th17-Zellen sind eine Subpopulation von CD4⁺ T-Helferzellen, die durch die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 gekennzeichnet sind. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene und sind maßgeblich an der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt^{246,247}. Typischerweise sind Th17-Zellen bei einer Kolitis in der Mukosa zu finden, produzieren proinflammatorische Zytokine und sind entscheidend an der Entzündungsentstehung und Progression beteiligt²⁴⁸. Die Erhöhung des Vorkommens ist ein immunologisches Merkmal, das nicht auf schwere Kolitisformen beschränkt ist, sondern auch bei milden Verläufen beobachtet werden kann^{248,249}. Die erhöhte Präsenz von Th17-Zellen in der Gruppe CS222 pHP45Ω catR kann auf eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort hinweisen. Die DSS-Only Gruppe zeigte, trotz starker Entzündungszeichen, ein geringeres Aufkommen von Th17-Zellen. Dies könnte durch eine übermäßige Entzündungsreaktion erklärt werden, die zu einer Erschöpfung oder Apoptose von Th17-Zellen führt. Zudem kann eine Dysregulation der Zytokinproduktion, insbesondere eine reduzierte IL-10-Produktion, die Differenzierung und Funktion von Th17-Zellen beeinträchtigen. Im direkten Vergleich lag das

Vorkommen der Th17-Zellen in den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR im mittleren Bereich. Möglicherweise führte dort eine geringere Inflamationsreaktion nicht zu einer erhöhten Apoptose, wie in der DSS-Only Gruppe.

Die Analyse der TNF-α-Sekretion im Kolon ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Dennoch ließ sich eine Tendenz erkennen, bei der die Gruppen DSS-Only und CS222 pHP45Ω catR höhere TNF-α-Werte aufwiesen als die Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist ein zentraler proinflammatorischer Zytokinmarker, der stark mit der Aktivierung des Immunsystems im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert ist²⁵⁰. Eine erhöhte TNF-α-Sekretion steht typischerweise mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung in Zusammenhang, während geringere Konzentrationen mit einer kontrollierten Immunantwort und dem Erhalt der intestinalen Homöostase korrelieren^{251,252}. Vor diesem Hintergrund unterstützt der beobachtete Trend, trotz fehlender Signifikanz, die zuvor beschriebenen histologischen und klinischen Befunde.

Insgesamt zeigen die immunologischen Untersuchungen, dass sich zwischen den Versuchsgruppen deutliche Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung und Zytokinantwort ergeben. Während EcN und CS238 pHP45Ω catR mit einer ausgeprägten Infiltration neutrophiler Granulozyten und reduzierter TNF-α-Sekretion assoziiert waren, zeigten die Gruppen DSS-Only und CS222 pHP45Ω catR Anzeichen einer Dysregulation mit tendenziell erhöhter TNF-α-Produktion, und gestörter Neutrophilenrekrutierung. Die Versuchsgruppe CS222 pHP45Ω catR zeigt in der FACS-Analyse ein erhöhtes Vorkommen von Th17-Zellen, im direkten Vergleich zeigte die Versuchsgruppe EcN erniedrigtes Vorkommen von Th17-Zellen. Diese Beobachtung ist vereinbar mit einer erhöhten Apoptoserate und Zelluntergang im Rahmen einer schweren und fortgeschrittenen Kolitis. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse, dass eine bakterielle Kolonisation mit bestimmten *E. coli*-Stämmen einen immunmodulatorischen Effekt ausüben kann, der sowohl zelluläre als auch humorale Einflüsse umfasst. Eine Kolonisation mit ausgewählten *E. coli*-Stämmen kann das Ausmaß einer DSS-induzierten Kolitis auf mehreren Ebenen unterschiedlich beeinflussen. Der etablierte probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 (EcN) zeigte in unseren Versuchen erwartungsgemäß protektive Effekte, sowohl in klinischen als auch histologischen und

immunologischen Parametern. Interessanterweise ließ sich ein vergleichbares Muster auch für den kommensalen Stamm CS238 pHP45 Ω catR beobachten. Beide Stämme waren mit einer reduzierten klinischen Krankheitsaktivität (DAI), geringeren histologischen Schädigungsmerkmalen sowie einem modifizierten immunologischen Zell- und Zytokinprofil assoziiert. Auffällig war dabei eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Kolon, obwohl diese üblicherweise mit schwereren Entzündungsverläufen korrelieren. Dieses scheinbar paradoxe Ergebnis wurde in der Diskussion als Ausdruck einer effektiven, aber kontrollierten Immunantwort interpretiert, möglicherweise begünstigt durch erhaltene Gewebestrukturen und geringere Apoptoseraten in mild verlaufenden Kolitiden. Zusätzlich zeigten sich bei EcN und CS238 pHP45 Ω catR ein günstiges Zytokinprofil mit reduzierter Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β sowie gleichzeitiger Präsenz des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Das Vorkommen von Th17-Zellen war in beiden Gruppen vorhanden, was in diesem Zusammenhang als Zeichen einer aktiven, regulierten Immunantwort gewertet werden kann. Im Gegensatz zeigte die Kolonisation mit dem Stamm CS222 pHP45 Ω catR, der sich durch eine verkürzte *fliC*-Sequenz und ein geringes TLR5-Aktivierungspotenzial auszeichnet, keine protektiven Eigenschaften. Hierbei fanden sich vielmehr Hinweise auf eine verstärkte entzündliche Reaktion, in Form klinischer Zeichen einer schwerer verlaufenden Kolitis und tendenziell gesteigerter TNF- α -Produktion. Trotz einer im Vergleich erhöhten Konzentration des antiinflammatorischen Zytokin IL-10, zeigten sich klinische Zeichen einer vergleichbar aggravierten DSS-Kolitis. Diese Beobachtungen stützen die zentrale Hypothese dieser Arbeit: Die immunmodulatorischen und potenziell protektiven Eigenschaften kommensaler *E. coli*-Stämme hängen wesentlich von ihrer Fähigkeit ab, TLR5 zu aktivieren, ein Mechanismus, der stark von der Struktur und Länge des bakteriellen Flagellins beeinflusst wird. Gleichzeitig ist hier zu betonen, dass die hier dargestellten Ergebnisse lediglich Hinweise auf stammabhängige Unterschiede in der immunologischen Wirkung liefern, jedoch noch keine abschließenden Aussagen über deren therapeutisches Potenzial erlauben. Die Aussagekraft ist durch die begrenzte Gruppengröße, den festgelegten Beobachtungszeitraum sowie die Beschränkung auf ein einzelnes Kolitis-Modell limitiert. Künftige Studien sollten mit erweiterten Kohorten, längerer Verlaufsbeobachtung und funktionellen Zusatzanalysen, etwa zur epithelialen Barrierefunktion, Zytokinregulation auf Transkriptionsebene oder zur Interaktion mit dem intestinalen Mikrobiom durchgeführt werden, um die hier beschriebenen Zusammenhänge weiter zu validieren.

Diese Arbeit leistet damit einen Beitrag zum besseren Verständnis stammabhängiger immunologischer Mechanismen im Kontext entzündlicher Darmerkrankungen. Insbesondere wird deutlich, dass nicht allein die Zugehörigkeit eines Bakteriums zur Gattung *E. coli*, sondern vielmehr seine funktionellen Eigenschaften, wie etwa die Fähigkeit zur gezielten TLR5-Aktivierung, über protektive oder pathogene Wirkungen entscheiden können. Diese Erkenntnisse liefern eine Grundlage für die zukünftige Entwicklung gezielter mikrobieller Interventionen im Rahmen probiotischer oder mikrobiomgestützter Therapiestrategien.

5. Limitationen

Trotz der dargestellten Ergebnisse und Interpretationen unterliegt die vorliegende Arbeit mehreren Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Ein zentraler Aspekt dabei betrifft die Komplexität bakterieller Isolate. Die von uns ausgewählten *E.coli* Stämme unterscheiden sich nicht nur in der Länge und Sequenz des Flagellins, sondern weisen eine Vielzahl weiterer, genetischer, struktureller und funktioneller Unterschiede auf. Zu diesen zählen beispielsweise individuelle Unterschiede in mikrobiellen Oberflächenstrukturen, Stoffwechselwegen und Variation in der Expression weiterer MAMPS, die unabhängig vom Flagellin immunmodulatorische Effekte ausüben können. Vor diesem Hintergrund ist es nicht möglich, die beobachteten Unterschiede in der TLR5-Aktivierung, der Zytokininduktion oder der protektiven Wirkung im Allgemeinen im DSS-Kolititsmodell allein auf die Flagellinlänge bzw. *fliC*-Sequenz zurückzuführen. Die Ergebnisse erlauben eine Identifikation stammspezifischer Assoziationen und zeigen mögliche Korrelationen, die jedoch nicht als eindeutige Ursache-Wirkungsbeziehungen interpretiert werden können. Ein methodisch idealer Ansatz zur Klärung der Rolle des Flagellins würde die Verwendung isogener Bakterienstämme erfordern, welche sich ausschließlich über die Länge und Sequenz der *fliC*-Domäne unterscheiden. Solche Modelle würden eine präzisere Zuordnung der Ergebnisse erlauben. Weitere Limitationen ergeben sich aus dem experimentellen Versuchsaufbau. Da die *in vivo* Untersuchung in einem akuten DSS-Kolititsmodell durchgeführt wurde, dass sich zwar durch eine Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit auszeichnet, jedoch primär die Schädigung der epithelialen Barriere und Aktivierung des angeborenen Immunsystems abbildet, können chronische, immunvermittelte Mechanismen, sowie langfristige Effekte einer bakteriellen Kolonisation nur eingeschränkt erfasst werden. Zudem erfolgten die Untersuchungen innerhalb eines definierten Beobachtungszeitraums mit vergleichsweise kleinen Tiergruppen. Dies reduziert die statistische Aussagekraft. Auch interindividuelle Unterschiede in der Kolonisation der Tiere konnten nur eingeschränkt berücksichtigt werden. Schließlich ist zu berücksichtigen, dass die TLR5-abhängigen Effekte im Mausmodell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Unterschiede in der Expression, Signaltransduktion und weitere Bedeutungen von TLR4 zwischen

murinen und humanen Immunsystem können die beobachteten Effekte beeinflussen. Ergänzend wäre eine umfassende phänotypische und bioinformatische Charakterisierung der verwendeten *E.coli* Isolate geeignet potenzielle Störfaktoren zu erfassen und die Interpretation der Ergebnisse zu verbessern.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit und die daraus folgenden Interpretationen lediglich einen möglichen Zusammenhang zwischen Flagellinassoziierten Eigenschaften ausgewählter *E.coli* Isolate und deren immunologischer Wirkung. Ergänzend müssen diese jedoch in weiterführenden Studien mit isogenen Stämmen und größeren Versuchsgruppen, sowie ergänzenden Modellen und humannahen Systemen validiert werden.

6. Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) gehen mit Störungen der Darmmikrobiota und fehlgesteuerten Immunreaktionen einher^{28,29,33,85}. Flagellin, der natürliche Ligand des Toll-like-Rezeptors 5 (TLR5), gilt als zentraler Vermittler stammspezifischer Wirt-Mikroben-Interaktionen^{59,69,70,198}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob eine Korrelation zwischen der Gesamtlänge der Flagellin-Sequenz (*fliC*-Sequenz) und der TLR5-Aktivierung besteht und ob sich daraus protektive Effekte kommensaler *E. coli* ableiten lassen. Als Vergleichsgröße nutzten wir *E. coli* Nissle 1917 (EcN), welcher bereits durch viele Studien belegt, protektive Effekte zeigte^{69,93,99}. Im Rahmen der Untersuchungen wurden *E. coli*-Isolate aus Stuhlproben gesunder Probanden hinsichtlich ihrer *fliC*-Länge und ihres Schwärmverhalten charakterisiert und in TLR5-überexprimierenden HEK-Zellen (human/murin) auf ihr TLR5-Aktivierungspotenzial getestet. Als Read-out diente in diesem Kontext die IL-8 Sekretion. Für die nachfolgenden Experimente wurden zwei kontrastierende Isolate ausgewählt: CS238 (lange *fliC*-Sequenz, hohe TLR5-Aktivierung, ähnlich EcN) und CS222 (kurze *fliC*-Sequenz, niedrige TLR5-Aktivierung) und mit dem probiotischen Referenzstamm EcN verglichen. Die isolierten kommensalen *E. coli*-Stämme wiesen eine große Variabilität der *fliC*-Sequenz-Längen und deutliche Unterschiede im Schwärmverhalten auf. Längere *fliC*-Sequenzen traten häufiger bei stark schwärmenden Stämmen auf, kürzere eher bei nicht schwärmenden. Die Gesamtlänge allein erwies sich jedoch nicht als verlässlicher Prädiktor für die Motilität, da die funktionelle Bedeutung der einzelnen Flagellin-Domänen maßgeblich ist. Für weiterführende Experimente wurden daher nur schwärmfähige Stämme ausgewählt, um ein funktionsfähiges Flagellum sicherzustellen.

In TLR5-überexprimierenden HEK-Zellen wurde eine ausgeprägte Stamm- und Speziesabhängigkeit der IL-8-Sekretion beobachtet. Mehrere Isolate induzierten in murinen TLR5-Zellen hohe, in humanen TLR5-Zellen jedoch deutlich

niedrigere Signale. Diese Unterschiede spiegeln bekannte interspezifische Variationen der TLR5-Sequenz und -Ligandenerkennung wider und unterstreichen, dass Ergebnisse aus Mausmodellen nur eingeschränkt direkt auf den Menschen übertragbar sind. Nach Normierung auf den Stamm EcN ergaben sich Isolate mit hoher (u. a. CS238) und niedriger (u. a. CS222) TLR5-Aktivierung, auf deren Basis die beiden kontrastierenden Stämme, für die *in vitro* und *in vivo* -Folgeexperimente ausgewählt wurden. In murinen BMDCs bestätigten die Experimente die zentrale, regulatorische Rolle von TLR5. In TLR5^{-/-}-BMDCs kam es im Vergleich zu Wildtyp- und TLR2/4^{-/-}-Zellen zu einer verstärkten TNF- α -Produktion, was auf eine Enthemmung anderer TLR-Signalwege hindeutet. Die Analyse der Reifungsmarker (MHC-II, CD80, CD86, CD40) ergab, dass die Maturation primär über TLR2- und TLR4-Signale getrieben wird, während TLR5 eher modulierend wirkt und insbesondere die Ausprägung kostimulatorischer Moleküle begrenzt. Flagellin allein induzierte nur eine schwache BMDC-Maturation, was die Rolle von TLR5 als feinregulierenden, nicht primär treibenden Faktor der DC-Aktivierung unterstützt.

Im DSS-Kolitis-Mausmodell konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Kolonisation mit EcN sowie den transformierten und somit Chloramphenicol-resistenten Isolat CS222 pHP45 Ω catR und CS238 pHP45 Ω catR über das Trinkwasser zuverlässig zu erreichen ist. Auf klinischer Ebene (Körpergewicht) unterschieden sich die Gruppen zwar nicht signifikant, jedoch ergab die histologische Analyse eine deutliche Reduktion des Schädigungsscores (HCS) in allen kolonisierten Gruppen im Vergleich zur DSS-behandelten, nicht mit *E.coli*-kolonisierten Kontrollgruppe (DSS-Only), mit dem stärksten protektiven Effekt bei EcN. Die kommensalen Stämme CS222 pHP45 Ω catR und CS238 pHP45 Ω catR führten ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der histologischen Schädigung, wenn auch weniger ausgeprägt als EcN.

Der Disease-Activity-Index zeigte eine klarere Differenzierung: Tiere, die mit EcN oder CS238 kolonisiert waren, wiesen signifikant niedrigere DAI-Werte auf als die DSS-Only-Gruppe und die CS222-Gruppe. Damit bestätigte sich die

Hypothese, dass ein Stamm mit langer *fliC*-Sequenz und hoher TLR5-Aktivierung (CS238) protektive Effekte ähnlich EcN entfalten kann, während ein Stamm mit verkürzter *fliC*-Sequenz und niedriger TLR5-Aktivierung (CS222) keinen oder sogar einen ungünstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Die Kolonlängenmessungen zeigten zwar die typische Verkürzung im Rahmen der DSS-Kolitis, verursachten aber keine signifikanten Gruppenunterschiede und erwiesen sich damit eher als ergänzender, weniger sensitiv differenzierender Parameter.

Die immunologischen Analysen bestätigten die stammspezifischen Unterschiede. In den Gruppen EcN und CS238 pHP45Ω catR fand sich eine erhöhte Zahl neutrophiler Granulozyten im Kolon bei gleichzeitig milderer Kolitis und tendenziell niedrigerer TNF-α-Sekretion, ein Befund, der als Ausdruck einer effektiven, aber kontrollierten Immunantwort interpretiert wurde. Demgegenüber waren DSS-Only und CS222 mit tendenziell höheren TNF-α-Werten, dysregulierter Neutrophilenrekrutierung und erhöhter Th17-Frequenz assoziiert, passend zu einem schwereren, proinflammatorisch geprägten Verlauf.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass Stämme mit längerer *fliC*-Sequenz und hoher TLR5-Aktivierung (EcN, CS238) im DSS-Kolitis-Modell eine abgeschwächte Entzündungsreaktion bei erhaltener Immunfunktion zu fördern scheinen, während ein Stamm mit verkürzter *fliC*-Sequenz und niedriger TLR5-Aktivierung (CS222 pHP45Ω catR) keine protektiven Effekte zeigt. Trotz methodischer Limitationen (siehe 5. Limitationen) liefert die Arbeit wichtige Hinweise darauf, dass nicht die Artzugehörigkeit zu *E. coli*, sondern Stammspezifische, insbesondere Flagellin- und TLR5-vermittelte Eigenschaften über protektive oder pathogene Wirkungen entscheiden. Dies bildet eine Grundlage für die gezielte Entwicklung Stamm-spezifischer probiotischer und mikrobiomgestützter Therapiestrategien bei entzündlichen Darmerkrankungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230 (2012).
2. Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z. & Dominguez-Bello, M. G. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol. Med.* **21**, 109–117 (2015).
3. Edwards, C. A. & Parrett, A. M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br. J. Nutr.* **88**, s11–s18 (2002).
4. Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R. & Blaser, M. J. Role of the microbiome in human development. *Gut* **68**, 1108–1114 (2019).
5. Biasucci, G. *et al.* Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum. Dev.* **86**, 13–15 (2010).
6. Grönlund, M.-M., Lehtonen, O.-P., Eerola, E. & Kero, P. Fecal Microflora in Healthy Infants Born by Different Methods of Delivery: Permanent Changes in Intestinal Flora After Cesarean Delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**, 19–25 (1999).
7. Huurre, A. *et al.* Mode of Delivery – Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology* **93**, 236–240 (2008).
8. Reyman, M. *et al.* Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat. Commun.* **10**, 4997 (2019).
9. Kuk, S., Uyar, Y., Karaca, S. & Yazar, S. Microbiota: In Health and in Sickness, From Birth to Death. *Turk. Parazitoloji Derg.* **40**, 97–106 (2016).
10. Gordon, J. H. & Dubos, R. THE ANAEROBIC BACTERIAL FLORA OF THE MOUSE CECUM. *J. Exp. Med.* **132**, 251–260 (1970).
11. Marchesi, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* **65**, 330–339 (2016).
12. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
13. Hornef, M. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. *ILAR J.* **56**, 159–162 (2015).
14. Petersson, J. *et al.* Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G327–G333 (2011).
15. Lawley, T. D. & Walker, A. W. Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**, 1–11 (2013).
16. Buffie, C. G. & Pamer, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 790–801 (2013).
17. Shreiner, A. B., Kao, J. Y. & Young, V. B. The gut microbiome in health and in disease: *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 69–75 (2015).
18. Fukuda, S. *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543–547 (2011).
19. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. *Nat. Immunol.* **14**, 685–690 (2013).
20. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2369–2379 (2016).

21. Arrieta, M.-C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M. & Finlay, B. The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
22. Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. & Gordon, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* **474**, 327–336 (2011).
23. Dicksved, J. *et al.* Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* **2**, 716–727 (2008).
24. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
25. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223 (2008).
26. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–335 (2013).
27. Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A. & Petersen, A. M. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, (2019).
28. Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. & Núñez, G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.* **279**, 70–89 (2017).
29. Fine, R. L., Manfredo Vieira, S., Gilmore, M. S. & Kriegel, M. A. Mechanisms and consequences of gut commensal translocation in chronic diseases. *Gut Microbes* **11**, 217–230 (2020).
30. Helander, F. Surface area of the digestive tract. (2014).
31. Langefeld, T. W., Mühling, J., Engel, J., Harbach, H. & Chakraborty, T. Teil 1: Das angeborene Immunsystem. *Anästh Intensiv.* **8**.
32. Chaplin, D. D. Overview of the Immune Response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3-23 (2010).
33. Groschwitz, K. R. & Hogan, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 3–20 (2009).
34. Harhaj, N. S. & Antonetti, D. A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1206–1237 (2004).
35. Hartsock, A. & Nelson, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 660–669 (2008).
36. Kunzelmann, K. & Mall, M. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiol. Rev.* **82**, 245–289 (2002).
37. Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. CLAUDINS AND EPITHELIAL PARACELLULAR TRANSPORT. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 403–429 (2006).
38. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. *J. Cell Biol.* **17**, 375–412 (1963).
39. Förster, C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 55–70 (2008).
40. Bruewer, M. & Nusrat, A. *Regulation of Paracellular Transport across Tight Junctions by the Actin Cytoskeleton. Madame Curie Bioscience Database [Internet]* (Landes Bioscience, 2013).
41. Berg, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* **3**, 149–154 (1995).

42. Steffen, E. K., Berg, R. D. & Deitch, E. A. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J. Infect. Dis.* **157**, 1032–1038 (1988).
43. Forchielli, M. L. & Walker, W. A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br. J. Nutr.* **93**, S41–S48 (2005).
44. Spahn, T. W. & Kucharzik, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* **53**, 456–465 (2004).
45. Silva-Sanchez, A. & Randall, T. D. Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. *Mucosal Vaccines* 21–54 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-811924-2.00002-X.
46. Belkaid, Y. & Hand, T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121–141 (2014).
47. Yue, B. *et al.* Inflammatory Bowel Disease: A Potential Result from the Collusion between Gut Microbiota and Mucosal Immune System. *Microorganisms* **7**, (2019).
48. Kayama, Okumura & Tadeka. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annu Rev Immunol* 2020 3823–48 (2020).
49. Sankaran-Walters, S. Guardians of the Gut: Enteric Defensins. *Front. Microbiol.* **8**, 8 (2017).
50. Cella, Sallusto & Lanzavecchia. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1997 910-16 (1997).
51. Alberts, B. *et al.* The Adaptive Immune System. *Mol. Biol. Cell 4th Ed.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/> (2002).
52. Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **8** (2014).
53. Ishii, K. J. & Akira, S. 3 - Innate immunity. in *Clinical Immunology (Third Edition)* (eds. Rich, R. R. *et al.*) 39–51 (Mosby, Edinburgh, 2008). doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10003-X.
54. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
55. Werling, D., Jann, O. C., Offord, V., Glass, E. J. & Coffey, T. J. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* **30**, 124–130 (2009).
56. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 1–9 (2017).
57. Han, Y. M. *et al.* NF-kappa B activation correlates with disease phenotype in Crohn's disease. *PLOS ONE* **12**, e0182071 (2017).
58. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
59. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).
60. Swiecicki, J.-M., Sliusarenko, O. & Weibel, D. B. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integr. Biol.* **5**, 1490 (2013).
61. Berg, H. C. & Anderson, R. A. Bacteria Swim by Rotating their Flagellar Filaments. *Nature* **245**, 380–382 (1973).
62. Kaiser, D. Bacterial Swarming: A Re-examination of Cell-Movement Patterns. *Curr. Biol.* **17**, R561–R570 (2007).
63. Nicholas C. Darnton. Dynamics of Bacterial Swarming | Elsevier Enhanced

Reader.

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006349510002183?token=56B05CD5B4DAD843E4458E2BE7E2CB9A08AE8531A0EE7C76B4F3468786A4E090C338EB999F882AD90BB402151A6B8F40> doi:10.1016/j.bpj.2010.01.053.

64. Steiner, T. S. How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. *Infect. Immun.* **75**, 545–552 (2007).
65. Imada, K. Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophys. Rev.* **10**, 559–570 (2018).
66. Forstnerič, V., Ivičak-Kocjan, K., Plaper, T., Jerala, R. & Benčina, M. The role of the C-terminal D0 domain of flagellin in activation of Toll like receptor 5. *PLoS Pathog.* **13**, (2017).
67. Song, W. S., Jeon, Y. J., Namgung, B., Hong, M. & Yoon, S. A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. *Sci. Rep.* **7**, 40878 (2017).
68. Beatson, S. A., Minamino, T. & Pallen, M. J. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol.* **14**, 151–155 (2006).
69. Steimle, A. *et al.* Flagellin hypervariable region determines symbiotic properties of commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS Biol.* **17**, (2019).
70. Yang, Y. *et al.* The flagellin hypervariable region is a potential flagella display domain in probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Arch. Microbiol.* **198**, 603–610 (2016).
71. Yoon, S. -i. *et al.* Structural Basis of TLR5-Flagellin Recognition and Signaling. *Science* **335**, 859–864 (2012).
72. Hajam, I. A., Dar, P. A., Shah Nawaz, I., Jaume, J. C. & Lee, J. H. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp. Mol. Med.* **49**, e373–e373 (2017).
73. Xia, B., JBA, C., SGM, M. & AS, P. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J. Gastroenterol.* **4**, 446–458 (1998).
74. Alatab, S. *et al.* The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 17–30 (2020).
75. Ng, S. C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 2769–2778 (2018).
76. Dolinger, M., Torres, J. & Vermeire, S. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* **403**, 1177–1191 (2024).
77. Xu, F., Carlson, S. A., Liu, Y. & Greenlund, K. J. Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Medicare Fee-For-Service Beneficiaries - United States, 2001–2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **70**, 698–701 (2021).
78. Le Berre, C., Honap, S. & Peyrin-Biroulet, L. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* **402**, 571–584 (2023).
79. Gros, B. & Kaplan, G. G. Ulcerative Colitis in Adults: A Review. *JAMA* **330**, 951–965 (2023).
80. Bokemeyer, B. CED-Behandlung in Deutschland. *Gastroenterol.* **2**, 447–455 (2007).
81. Stallmach, A., Häuser, W., L'hoest, H. & Marschall, U. Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. **25**.
82. Shouval, D. S. & Rufo, P. A. The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *JAMA Pediatr.* **171**, 999–

1005 (2017).

83. Bernstein, C. *et al.* The Relationship Between Inflammatory Bowel Disease and Socioeconomic Variables. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 2117–2125 (2001).
84. Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* **146**, 1489–1499 (2014).
85. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 720–727 (2015).
86. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2066–2078 (2009).
87. Zhang, Y.-Z. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 91 (2014).
88. Johnston, R. D. & Logan, R. F. A. What is the peak age for onset of IBD? *Inflamm. Bowel Dis.* **14 Suppl 2**, S4-5 (2008).
89. Herzog, D. *et al.* Age at disease onset of inflammatory bowel disease is associated with later extraintestinal manifestations and complications. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**, 598–607 (2018).
90. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
91. Sairenji, T., Collins, K. L. & Evans, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **44**, 673–692 (2017).
92. Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1627–1640 (2007).
93. Kruis, W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**, 1617–1623 (2004).
94. Authors & Collaborators. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z. Für Gastroenterol.* **56**, 1087–1169 (2018).
95. Pithadia, A. B. & Jain, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol. Rep. PR* **63**, 629–642 (2011).
96. Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A. & Al-Salami, H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J. Inflamm. Res.* **7**, 113–120 (2014).
97. Hazel, K. & O'Connor, A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **11**, (2020).
98. Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M. & Axon, A. T. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* **354**, 635–639 (1999).
99. Scaldaferri, F. *et al.* Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5505 (2016).
100. Henker, J. *et al.* The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* **166**, 311–318 (2007).
101. Fric, P. & Zavoral, M. The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 313–315 (2003).
102. Nissle, Alfred. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstorerungen mit Colibakterien. *Med Klin.* 1918229–30.

103. Nissle, Alfred. Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 42, 1181–1184 (1916). (1916).
104. Lasaro, M. A. *et al.* F1C Fimbriae Play an Important Role in Biofilm Formation and Intestinal Colonization by the *Escherichia coli* Commensal Strain Nissle 1917. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 246–251 (2009).
105. Wehkamp, J. *et al.* NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium. *INFECT IMMUN* **72**, 9 (2004).
106. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710–720 (2003).
107. Zyrek, A. A. *et al.* Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell. Microbiol.* **9**, 804–816 (2007).
108. Alvarez, C.-S., Badia, J., Bosch, M., Giménez, R. & Balmori, L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **7**, 1981 (2016).
109. Ukena, S. N. *et al.* Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* **2**, e1308 (2007).
110. Sassone-Corsi, M. *et al.* Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* **540**, 280–283 (2016).
111. Sturm, A. *et al.* *Escherichia coli* Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Infect. Immun.* **73**, 1452–1465 (2005).
112. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. & Madara, J. L. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J. Immunol.* **167**, 1882–1885 (2001).
113. Turvey, S. E. & Broide, D. H. Chapter 2: Innate Immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S24–S32 (2010).
114. Charles A. Janeway, P. *et al.* *Immunobiology*. (Garland Science, 2001).
115. Steimle, A. & Frick, J.-S. Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J. Immunol. Res.* **12**.
116. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
117. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
118. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271–296 (1991).
119. Drakes, M., Blanchard, T. & Czinn, S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect. Immun.* **72**, 3299–3309 (2004).
120. Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* **293**, 253–256 (2001).
121. Li, X. *et al.* Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 190–199 (2010).
122. Kuwana, M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid

- dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* **63**, 1156–1163 (2002).
123. Perona-Wright, G. *et al.* Systemic but Not Local Infections Elicit Immunosuppressive IL-10 Production by Natural Killer Cells. *Cell Host Microbe* **6**, 503–512 (2009).
 124. Fu, S.-H., Chien, M.-W., Hsu, C.-Y., Liu, Y.-W. & Sytwu, H.-K. Interplay between Cytokine Circuitry and Transcriptional Regulation Shaping Helper T Cell Pathogenicity and Plasticity in Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 125. Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S. & Münz, C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J. Mol. Med.* **84**, 194–202 (2006).
 126. Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 971–974 (2004).
 127. Marrack, P., Rubtsova, K., Scott-Browne, J. & Kappler, J. W. T cell receptor specificity for major histocompatibility complex proteins. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 203–207 (2008).
 128. DeWitt, W. S., III *et al.* Human T cell receptor occurrence patterns encode immune history, genetic background, and receptor specificity. *eLife* **7**, e38358 (2018).
 129. Wieczorek, M. *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 130. Langefeld, T. W., Mühlhling, J., Engel, J., Harbach, H. & Chakraborty, T. Teil 2: Das erworbene Immunsystem. *Anästh Intensiv.* **7**.
 131. Hewitt, E. W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* **110**, 163–169 (2003).
 132. Wan, Y. Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* **130**, 166–171 (2010).
 133. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **85**, 9–21 (2000).
 134. Reiner, S. L. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell* **129**, 33–36 (2007).
 135. Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W. & Hansbro, P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* **123**, 326–338 (2008).
 136. Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 652–657 (2007).
 137. McGeachy, M. J. & Cua, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* **28**, 445–453 (2008).
 138. Pennock, N. D. *et al.* T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv. Physiol. Educ.* **37**, 273–283 (2013).
 139. Van Gool, S. W., Vandenberghe, P., de Boer, M. & Ceuppens, J. L. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol. Rev.* **153**, 47–83 (1996).
 140. Lim, T. S. *et al.* CD80 and CD86 Differentially Regulate Mechanical Interactions of T-Cells with Antigen-Presenting Dendritic Cells and B-Cells. *PLOS ONE* **7**, e45185 (2012).
 141. Odobasic, D., Leech, M. T., Xue, J. R. & Holdsworth, S. R. Distinct in vivo roles of CD80 and CD86 in the effector T-cell responses inducing antigen-induced arthritis. *Immunology* **124**, 503–513 (2008).

142. Couture, A. *et al.* HLA-Class II Artificial Antigen Presenting Cells in CD4+ T Cell-Based Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
143. Nuriya, S., Yagita, H., Okumura, K. & Azuma, M. The differential role of CD86 and CD80 co-stimulatory molecules in the induction and the effector phases of contact hypersensitivity. *Int. Immunol.* **8**, 917–926 (1996).
144. Monastero, R. N. & Pentyala, S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int. J. Inflamm.* **2017**, e4309485 (2017).
145. Zhu, Z. *et al.* Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *Int. J. Infect. Dis.* **95**, 332–339 (2020).
146. Kany, S., Vollrath, J. T. & Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
147. Zhang, J.-M. & An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **45**, 27–37 (2007).
148. Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Polinova, A. I. & Drutskaya, M. S. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* **53**, 13–24 (2020).
149. Buck, C., Bundschu, J., Gallati, H., Bartmann, P. & Pohlandt, F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* **93**, 54–58 (1994).
150. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**, 3720–3732 (2011).
151. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**, 149–160 (2008).
152. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **20**, 87–103 (2010).
153. Page, M. J., Bester, J. & Pretorius, E. The inflammatory effects of TNF- α and complement component 3 on coagulation. *Sci. Rep.* **8**, 1812 (2018).
154. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. & McDermott, M. F. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research* **8**, (2019).
155. McGuire, W. *et al.* C-reactive protein and haptoglobin in the evaluation of a community-based malaria control programme. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**, 10–14 (1996).
156. Pepys, M. B. C-reactive protein fifty years on. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 653–657 (1981).
157. Cooper, E. H. & Ward, A. M. Acute phase reactant proteins as aids to monitoring disease. *Invest. Cell Pathol.* **2**, 293–301 (1979).
158. Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **6**, 1045–1056 (2005).
159. El Ghmati, S. M., Van Hoeyveld, E. M., Van Strijp, J. G., Ceuppens, J. L. & Stevens, E. A. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 2542–2552 (1996).
160. Deitch, E. A. The Role of Intestinal Barrier Failure and Bacterial Translocation in the Development of Systemic Infection and Multiple Organ Failure. *Arch. Surg.* **125**, 403–404 (1990).
161. Zareie, M. *et al.* Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* **55**, 1553–1560 (2006).
162. Chiodini, R. J., Dowd, S. E., Galandiuk, S., Davis, B. & Glassing, A. The

- predominant site of bacterial translocation across the intestinal mucosal barrier occurs at the advancing disease margin in Crohn's disease. *Microbiol. Read. Engl.* **162**, 1608–1619 (2016).
163. Vaishnavi, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. *Indian J. Med. Microbiol.* **31**, 334–42 (2013).
 164. Vrakas, S. *et al.* Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PloS One* **12**, e0170034 (2017).
 165. Wang, Z.-K. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 14805 (2014).
 166. Yang, C. & Merlin, D. Unveiling Colitis: A Journey through the Dextran Sodium Sulfate-induced Model. *Inflamm. Bowel Dis.* **30**, 844–853 (2024).
 167. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* **104**, (2014).
 168. Bento, A. F. *et al.* Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 1459–1469 (2012).
 169. Stevceva, L., Pavli, P., Buffinton, G., Wozniak, A. & Doe, W. F. Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 54–60 (1999).
 170. Kim, J. J., Shajib, M. S., Manocha, M. M. & Khan, W. I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp. JoVE* 3678 (2012) doi:10.3791/3678.
 171. Bonfiglio, R. *et al.* Extensive Histopathological Characterization of Inflamed Bowel in the Dextran Sulfate Sodium Mouse Model with Emphasis on Clinically Relevant Biomarkers and Targets for Drug Development. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2028 (2021).
 172. Terashima, H., Kojima, S. & Homma, M. Chapter 2 Flagellar Motility in Bacteria: Structure and Function of Flagellar Motor. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 270 39–85 (Academic Press, 2008).
 173. Chevance, F. F. V. & Hughes, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 455–465 (2008).
 174. Kearns, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 634–644 (2010).
 175. McKenna, K., Beignon, A.-S. & Bhardwaj, N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J. Virol.* **79**, 17–27 (2005).
 176. Michaelis, L. *et al.* Gut Commensal-Induced IκBζ Expression in Dendritic Cells Influences the Th17 Response. *Front. Immunol.* **11**, (2021).
 177. Mbongue, J. C., Nieves, H. A., Torrez, T. W. & Langridge, W. H. R. The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 178. MacDermott, R. P. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **31**, 907–916 (1996).
 179. Woywodt, A. *et al.* Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* **5**, 387–395 (1994).
 180. Dionne, S., Hiscott, J., D'Agata, I., Duhaime, A. & Seidman, E. G. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal

- biopsies. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 1557–1566 (1997).
181. Stevens, C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **37**, 818–826 (1992).
 182. Kajiya, M., Silva, M. J. B., Sato, K., Ouhara, K. & Kawai, T. Hydrogen mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sodium sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 11–15 (2009).
 183. Westbrook, A. M., Szakmary, A. & Schiestl, R. H. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: Lessons learned from mouse models. *Mutat. Res.* **705**, 40–59 (2010).
 184. Rieder, F. & Fiocchi, C. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease — Current knowledge and future perspectives. *J. Crohns Colitis* **2**, 279–290 (2008).
 185. Specia, S., Giusti, I., Rieder, F. & Latella, G. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World J. Gastroenterol. WJG* **18**, 3635–3661 (2012).
 186. Rock, K. L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 99–126 (2008).
 187. Nedeljković, M., Sastre, D. E. & Sundberg, E. J. Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular Multifunctional Nanostructure. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7521 (2021).
 188. Turner, L., Zhang, R., Darnton, N. C. & Berg, H. C. Visualization of Flagella during bacterial Swarming. *J. Bacteriol.* **192**, 3259–3267 (2010).
 189. Scadden, J., Ridone, P., Pandit, D., Sowa, Y. & Baker, M. A. B. Rescue of bacterial motility using two- and three-species FliC chimeras. *J. Bacteriol.* **207**, e0051724 (2025).
 190. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
 191. Huhta, H. *et al.* The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **64**, 470–482 (2016).
 192. Faber, E., Tedin, K., Speidel, Y., Brinkmann, M. M. & Josenhans, C. Functional expression of TLR5 of different vertebrate species and diversification in intestinal pathogen recognition. *Sci. Rep.* **8**, 11287 (2018).
 193. Armant, M. A. & Fenton, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* **3**, reviews3011.1-reviews3011.6 (2002).
 194. Brennan, J. J. & Gilmore, T. D. Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1576–1587 (2018).
 195. Liu, G., Zhang, H., Zhao, C. & Zhang, H. Evolutionary History of the Toll-Like Receptor Gene Family across Vertebrates. *Genome Biol. Evol.* **12**, 3615–3634 (2019).
 196. Leulier, F. & Lemaitre, B. Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 165–178 (2008).
 197. Forstnerič, V., Ivičak-Kocjan, K., Ljubetič, A., Jerala, R. & Benčina, M. Distinctive Recognition of Flagellin by Human and Mouse Toll-Like Receptor 5. *PLoS One* **11**, e0158894 (2016).
 198. L, L. *et al.* The Flagellin-TLR5 Axis: Therapeutic Opportunities. *Drug News Perspect.* **15**, 397–409 (2002).
 199. Lorenz, E. TLR2 and TLR4 expression during bacterial infections. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 4185–4193 (2006).
 200. Hussain, S. *et al.* TLR5 participates in the TLR4 receptor complex and promotes

- MyD88-dependent signaling in environmental lung injury. *eLife* **9**, e50458 (2020).
201. Carvalho, F. A. *et al.* Interleukin-1 β (IL-1 β) promotes susceptibility of Toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis. *Gut* **61**, 373–384 (2012).
 202. Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K. & Kishimoto, T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 79–88 (2016).
 203. Schilling, D., Thomas, K., Nixdorff, K., Vogel, S. N. & Fenton, M. J. Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 5874–5880 (2002).
 204. Greenhill, C. J. *et al.* IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 1199–1208 (2011).
 205. Qian, C. & Cao, X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1283**, 67–74 (2013).
 206. Clasen, S. J. *et al.* Silent recognition of flagellins from human gut commensal bacteria by Toll-like receptor 5. *Sci. Immunol.* **8**, eabq7001 (2023).
 207. Kajikawa, A., Eguchi, N. & Suzuki, S. Immunogenic Modification of *Ligilactobacillus agilis* by Specific Amino Acid Substitution of Flagellin. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**, e0127722 (2022).
 208. Michelsen, K. S. *et al.* The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J. Biol. Chem.* **276**, 25680–25686 (2001).
 209. Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G., Basketter, D. A. & Kimber, I. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* **126**, 475–484 (2009).
 210. Zhuang, Z., Chen, Y., Zheng, J. & Chen, S. The role of TRIF protein in regulating the proliferation and antigen presentation ability of myeloid dendritic cells through the ERK1/2 signaling pathway in chronic low-grade inflammation of intestinal mucosa mediated by flagellin-TLR5 complex signal. *PeerJ* **12**, e16716 (2024).
 211. Korkmaz, A. G. *et al.* Proteome and phosphoproteome analysis of commensally induced dendritic cell maturation states. *J. Proteomics* **180**, 11–24 (2018).
 212. Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G., Basketter, D. A. & Kimber, I. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* **126**, 475–484 (2009).
 213. Feng, T., Cong, Y., Alexander, K. & Elson, C. O. Regulation of Toll-like receptor 5 gene expression and function on mucosal dendritic cells. *PloS One* **7**, e35918 (2012).
 214. O'Donnell, H., Pham, O. H., Benoun, J. M., Raveslout-Chávez, M. M. & McSorley, S. J. Contaminated water delivery as a simple and effective method of experimental *Salmonella* infection. *Future Microbiol.* **10**, 1615–1627 (2015).
 215. Zhai, Z., Zhou, Y., Zhang, H. & Zhang, Y. Horizontal transfer and driving factors of extended-spectrum β -lactamase-producing resistance genes in mice intestine after the ingestion of contaminated water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **30**, 96376–96383 (2023).
 216. Lee, J., Lee, C. S., Hugunin, K. M., Maute, C. J. & Dysko, R. C. Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water Res.* **44**, 5050–5058 (2010).
 217. Yan, Y. *et al.* Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters

- in dextran sodium sulfate induced colitis. *PloS One* **4**, e6073 (2009).
218. Tiwari, P. & Jena, G. Strain-specific responses to dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in BALB/c and C57BL/6 mice: Comparative analysis of local versus extra-intestinal manifestations. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **74**, 107 (2025).
 219. Nunes, N. S. *et al.* Temporal clinical, proteomic, histological and cellular immune responses of dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *World J. Gastroenterol.* **24**, 4341–4355 (2018).
 220. Li, Y.-H., Adam, R., Colombel, J.-F. & Bian, Z.-X. A characterization of pro-inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced chronic relapsing colitis mice model. *Int. Immunopharmacol.* **60**, 194–201 (2018).
 221. Whitem, C. G., Williams, A. D. & Williams, C. S. Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J. Vis. Exp. JoVE* 1652 (2010) doi:10.3791/1652.
 222. Eichele, D. D. & Kharbanda, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **23**, 6016–6029 (2017).
 223. Melgar, S. *et al.* Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G165-172 (2007).
 224. Llewellyn, S. R. *et al.* Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology* **154**, 1037-1046.e2 (2018).
 225. Kwon, J., Lee, C., Heo, S., Kim, B. & Hyun, C.-K. DSS-induced colitis is associated with adipose tissue dysfunction and disrupted hepatic lipid metabolism leading to hepatosteatosis and dyslipidemia in mice. *Sci. Rep.* **11**, 5283 (2021).
 226. Laubitz, D. *et al.* Reduced Epithelial Na⁺/H⁺ Exchange Drives Gut Microbial Dysbiosis and Promotes Inflammatory Response in T Cell-Mediated Murine Colitis. *PloS One* **11**, e0152044 (2016).
 227. Jozawa, H., Inoue-Yamauchi, A., Arimura, S. & Yamanashi, Y. Loss of C/EBP δ enhances apoptosis of intestinal epithelial cells and exacerbates experimental colitis in mice. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **24**, 619–626 (2019).
 228. Schultz, M. Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1012–1018 (2008).
 229. Chartier, L. C., Hebart, M. L., Howarth, G. S., Whittaker, A. L. & Mashtoub, S. Affective state determination in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. *PloS One* **15**, e0228413 (2020).
 230. Shagaleeva, O. Y. *et al.* GC-MS with Headspace Extraction for Non-Invasive Diagnostics of IBD Dynamics in a Model of DSS-Induced Colitis in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 3295 (2024).
 231. Chen, Y. *et al.* Transitional changes in gastrointestinal transit and rectal sensitivity from active to recovery of inflammation in a rodent model of colitis. *Sci. Rep.* **11**, 8284 (2021).
 232. Jørgensen, L. G. M. *et al.* How accurate are clinical activity indices for scoring of disease activity in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**, 403–411 (2005).
 233. Thallmair, M. & Jirkof, P. A scoping review on reporting of methods in DSS colitis mouse models. *Lab. Anim.* 236772251331677 (2025) doi:10.1177/00236772251331677.

234. Gaudio, E. *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 1458–1475 (1999).
235. Danne, C., Skerniskyte, J., Marteyn, B. & Sokol, H. Neutrophils: from IBD to the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 184–197 (2024).
236. Dos Santos Ramos, A., Viana, G. C. S., de Macedo Brigido, M. & Almeida, J. F. Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel diseases: Implications in pathogenesis and therapeutic targets. *Pharmacol. Res.* **171**, 105779 (2021).
237. Ortega-Zapero, M., Gomez-Bris, R., Pascual-Laguna, I., Saez, A. & Gonzalez-Granado, J. M. Neutrophils and NETs in Pathophysiology and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, 7098 (2025).
238. Carnevale, S. *et al.* Neutrophils Mediate Protection Against Colitis and Carcinogenesis by Controlling Bacterial Invasion and IL22 Production by $\gamma\delta$ T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **12**, 413–426 (2024).
239. Cherrak, Y. *et al.* Neutrophil recruitment during intestinal inflammation primes Salmonella elimination by commensal E. coli in a context-dependent manner. *Cell Host Microbe* **33**, 358–372.e4 (2025).
240. Yalom, L. K. *et al.* Spatially separated epithelium-associated and lamina propria neutrophils present distinct functional identities in the inflamed colon mucosa. *Mucosal Immunol.* **18**, 685–699 (2025).
241. Rogler, G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 521–530 (2017).
242. Ostanin, D. V. *et al.* Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 1491–1502 (2012).
243. Bongers, S. H. *et al.* Kinetics of Neutrophil Subsets in Acute, Subacute, and Chronic Inflammation. *Front. Immunol.* **12**, 674079 (2021).
244. Nowacki, T. M. *et al.* Target-Specific Fluorescence-Mediated Tomography for Non-Invasive and Dynamic Assessment of Early Neutrophil Infiltration in Murine Experimental Colitis. *Cells* **8**, 1328 (2019).
245. Tsapanou-Katranara, T. *et al.* Neutrophil-mediated degradation of type III collagen is elevated in inflammatory bowel disease and DSS-induced colitis reflecting early mucosal damage. *Sci. Rep.* **15**, 21132 (2025).
246. Jiang, P. *et al.* The involvement of TH17 cells in the pathogenesis of IBD. *Cytokine Growth Factor Rev.* **69**, 28–42 (2023).
247. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
248. Chen, L. *et al.* The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress. *Front. Immunol.* **13**, 1055914 (2022).
249. Wedebye Schmidt, E. G. *et al.* TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 1567–1576 (2013).
250. Ruder, B., Atreya, R. & Becker, C. Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1887 (2019).
251. Souza, R. F., Caetano, M. A. F., Magalhães, H. I. R. & Castelucci, P. Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **29**, 2733–2746 (2023).
252. Dharmani, P., Leung, P. & Chadee, K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PloS One* **6**, e25058 (2011).

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen in der Arbeitsgruppe Frick unter Betreuung von Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick durchgeführt.

Die Präparation der Tiere erfolgte teilweise mit Unterstützung durch Dr. Lena Michaelis, Dr. Alexander Steimle, Dr. Jan Maerz, Dr. Anna Lange, Raphael Parusel, Anne Griebhammer, Hanna Löw und Andrea Schäfer.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Dr. Lena Michaelis, Anne Griebhammer und Dr. Jan Maerz, durch mich.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Generative KI-gestützte Tools (z. B. ChatGPT oder vergleichbare Systeme) wurden ausschließlich zur sprachlichen Überarbeitung, Stilverbesserung und Verständlichkeitsprüfung eingesetzt. Eine inhaltliche Generierung, Analyse, Interpretation oder Bewertung wissenschaftlicher Inhalte durch diese Tools erfolgte nicht.

Die inhaltliche Konzeption der Arbeit, die Durchführung und Auswertung der Untersuchungen, die Interpretation der Ergebnisse sowie die Schlussfolgerungen erfolgten eigenständig unter Betreuung durch Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum: Tübingen den 31.12.2025

Unterschrift:

9. Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind keine wissenschaftlichen Publikationen entstanden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden bislang nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Julia-Stefanie Frick von Herzen danken für die jahrelange Betreuung und die Zeit in der Arbeitsgruppe. Danke, dass du mir diese Arbeit ermöglicht hast, für die vielen Gespräche und deine Geduld.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Lisa Maier. Danke, dass du mich in den letzten Schritten so engagiert betreut und begleitet hast. Danke für deinen wertvollen Input, die schnellsten E-Mail-Antworten, die ich je erhalten habe und deine herzliche Art. Ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht geschafft.

Danke an die gesamte AG Frick, mit der ich so viele schöne Momente erleben durfte. Ein großes Dankeschön an Anne für die vielen Stunden, in denen du mir geholfen hast alles zu verstehen. Danke für die gemeinsamen Mittag und Abendessen und für deine wundervolle Art. Wir teilen nicht umsonst denselben Geburtstag, du verstehst mich auch ohne Worte. Vielen Dank auch an Andi Schäfer für die zahlreichen Gespräche bei der Arbeit und vor allem für die Gespräche abseits der Arbeit.

Danke an Nikolai für das Probelesen, die Korrekturen und die zahlreichen Anregungen. Danke an Volker für den letzten Schliff und dass du wirklich jedes Wort nochmal auf den Kopf gestellt hast.

Danke an Clara, dass du immer an mich geglaubt hast und dich nun gemeinsam mit mir darüber freuen kannst, dass ich es geschafft habe.

Danke an Sven und Pady, die sich wahrscheinlich am meisten darüber freuen, ab jetzt nicht mehr über das Thema Doktorarbeit sprechen zu müssen.

Danke an all meine Freunde, ohne die ich nicht die Person wäre, die ich heute bin. Ihr seid mein ganzer Stolz und ich bin so dankbar, euch in meinem Leben zu haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Danke, Papa (Yue Yao), diese Arbeit ist auch zu einem großen Teil für dich, weil du für uns auf deinen eigenen Dokortitel und deinen weiteren akademischen Weg verzichtet hast, damit wir eine bessere Zukunft haben konnten. Danke, Mama (Xinju Huang), dass du das Fundament unserer Familie bist und uns alle mit deiner bedingungslosen Liebe trägst. Ohne dich wären wir nicht dort, wo wir heute sind.

Danke, Luisa, meine Liebe, du hast mehr an mich geglaubt, als ich es jemals selbst könnte.
Danke für deine Unterstützung in jeder Lebenslage. Ich liebe dich und freue mich auf unser
gemeinsames Leben und Alles, was noch auf uns wartet.

Ich widme diese Arbeit meinem viel zu früh verstorbenen Bruder Chunyi. Ich denke an dich
und hoffe, du bist stolz auf mich.