

**Untersuchungen zum Einfluss Anbieter-spezifischer  
Unterschiede des Darmmikrobioms von  
C57BL/6N-Mäusen auf das Sepsismodell der  
intraperitonealen Stuhlinjektion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Sebastian Baum geb. Senzig**

aus Saarlouis

2020

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Sven Klaschik
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.08.2020

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Mark Coburn

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Sepsis .....	8
1.1.1 Definition der Sepsis .....	8
1.1.2 Epidemiologie der Sepsis .....	11
1.2 Pathophysiologie der Sepsis und Immunsystem .....	12
1.2.1 Toll-like-Rezeptoren.....	13
1.2.2 Inflammatorische Zytokine .....	16
1.2.2.1 TNF- $\alpha$ .....	17
1.2.2.2 IL-1 $\beta$ .....	17
1.2.2.3 IL-6.....	17
1.2.2.4 IL-10.....	18
1.2.2.5 IFN- $\beta$ .....	18
1.2.2.6 IFN- $\gamma$ .....	18
1.3 Tiermodelle der Sepsis .....	19
1.4 Fragestellung .....	22
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Versuchstiere.....	24
2.2 Modell der polymikrobiellen Sepsisinduktion durch eine intra- peritoneale Stuhlinjektion.....	24
2.2.1 Versuchsreihe Zeitpunkt T1 .....	25
2.2.2 Versuchsreihe Zeitpunkt T2 .....	27
2.3 Mikrobiologische Auswertung.....	28
2.4 Klinischer Score.....	30
2.5 Molekularbiologische Aufarbeitung der Proben .....	30
2.5.1 RNA-Extraktion mit anschließender Konzentrationsbestimmung .....	30
2.5.2 cDNA-Synthese .....	33
2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	33
2.6 Statistische Auswertung .....	35
2.7 Material.....	37

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	Versuchsreihe Zeitpunkt T1.....	41
3.1.1	Untersuchung der mikrobiellen Darmflora von C57BL/6N-Mäusen.....	41
3.1.2	Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf den Verlauf ..... von Gewicht und Temperatur und den klinischen Score .....	44
3.1.3	Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf molekulare Marker ..... der Inflammation .....	47
3.2	Versuchsreihe Zeitpunkt T2.....	54
3.2.1	Veränderungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora ..... von C57BL/6N-Mäusen im zeitlichen Verlauf .....	54
3.2.2	Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf den Verlauf ..... von Gewicht und Temperatur und den klinischen Score .....	56
3.2.3	Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf molekulare Marker ..... der Inflammation .....	58
3.3	Einfluss der Herkunft des Rezipienten bei gleichem Stuhl-Spender .....	69
3.3.1	Spendertierherkunft CR.....	69
3.3.3	Spendertierherkunft J.....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>105</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
C57BL/6N	Wildtyp-Mausstamm
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CLP	Cecal ligation and puncture
CpG	Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin
CR	Charles River
CT	Cycle Threshold
DAMP	Damage associated molecular pattern
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukeinsäure
dNTPs	Desoxyribunukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffration
G	Gauge, Maßeinheit für Außendurchmesser einer Kanüle
GCS	Glasgow Coma Scale
GIT	Guanidine thicyanate
H	Harlan
HET	Haus für Experimentelle Therapie
HMGB-1	High mobility group box-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IP	Intraperitoneal
IPSI	Intraperitoneale Stuhlinjektion
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
JAMA	The Journal of the American Medical Association
J	Janvier

KES-E	Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia spp. und Enterokokken
KS	Klinischer Score
LANUV NRW	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LBP	LPS-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation - Time of Flight
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MD-2	Lymphozytenantigen 96
min.	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Einheit des Drucks
MODS	Multiorgandysfunktions-Syndrom
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation marker
n	number, Anzahl der pro Zeitpunkt und Gruppen untersuchten Tierproben
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
nm	Nanometer
RNA	Ribonukleinsäure
RQ-Wert	Relativer Quantifikations-Wert
RTq-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PRR	Pattern recognition receptor

rpm	rounds per minute
S.	Staphylococcus
SD	Standardabweichung
SFB	Segmentierte filamentöse Bakterien
Sham	Schein operierte Gruppe
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SIRT1	Silent information regulator transcript-1
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
spp.	species pluralis
SCCM	Society of Critical Care Medicine
TAK1	Transforming growth factor $\beta$ -activated kinase
Th-Zellen	T-Helferzellen
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TIR	Toll/IL-1R Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOLLIP	Toll-interacting protein
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$

## **1. Einleitung**

### **1.1 Sepsis**

#### **1.1.1 Definition der Sepsis**

Im Jahr 1914 definierte Hugo Schottmüller die Sepsis als Wirtsreaktion auf konstante oder periodisch in den Blutkreislauf gelangende Bakterien (Schottmüller, 1914). Auf einer Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) wurde 1991 ein modifizierter Sepsisbegriff festgelegt (Bone et al., 1992). Dazu wurde der Begriff des „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) eingeführt, welcher anhand klinischer Parameter die systemische inflammatorische Reaktion des Organismus auf einen ausreichend schweren Stimulus beschreibt (Tab. 1). Zur weiteren Abgrenzung werden septische Krankheitsbilder als eine Kombination von SIRS und Infektion definiert.

**Tab. 1:** Definition von Infektionen, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und MODS (Bone et al., 1992)

	<b>Definition und Kriterien der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz</b>
Infektion	Inflammatorische Antwort auf Anwesenheit von Mikroorganismen oder deren Invasion von normalerweise sterilem Gewebe
SIRS	Systemisch-entzündliche Reaktion bei zwei oder mehr der folgenden Kriterien: Temperatur > 38 °C oder < 36 °C Herzfrequenz > 90 Schläge pro Minute Atemfrequenz > 20 Atemzüge pro Minute oder PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg Leukozyten > 12000/µl, < 4000/µl oder > 10 % unreife Zellen
Sepsis	SIRS + Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis + Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension, eventuell mit Laktatazidose, Oligurie oder akuter Änderung der Bewusstseinslage
Septischer Schock	Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Volumentherapie
Multiorgandysfunktions-Syndrom (MODS):	Akutkranke mit schwerer Organdysfunktion Homöostase nur durch Interventionen aufrechterhaltbar

Aufgrund der Definition des SIRS und einer hohen Sensitivität kam es in der Folge zu einer hohen Prävalenz. Auf Intensivstationen betrug der Anteil der Patienten mit SIRS während der intensivmedizinischen Behandlung 93 % (Sprung et al., 2006). Hierunter fanden sich zudem viele nicht-infektiöse Erkrankungen wie schwere Traumata, Verbrennungen, Pankreatitiden und ischämische Reperfusionstörungen (Vincent et al., 2013). 2016 erfolgte daher eine neue, bis heute gültige Definition eines internationalen Expertenkonsortiums, dargestellt in drei JAMA-Veröffentlichungen (Seymour et al., 2016; Shankar-Harl et al., 2016; Singer et al., 2016). Sepsis wird als eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion“ definiert. Singer et al. (2016) beschrieben zur klinischen Einordnung der

Organdysfunktion einen Anstieg des Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score um 2 Punkte oder mehr (Tab. 2). Dies sei mit einer um 10 % erhöhten Letalität verbunden.

**Tab. 2:** Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score (Singer et al., 2016)

SOFA Score	0	1	2	3	4
Lunge PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	≥400	<400	<300	<200 mit Beatmung	<100 mit Beatmung
Koagulation Thrombozyten (x 10 <sup>3</sup> /μl)	≥150	<150	<100	<50	<20
Leber Bilirubin (μmol/l)	<20	20-32	33-101	102-204	>204
Kardiovaskulär MAD (mmHg)	≥70	<70	Dopamin <5 oder Dobutamin (dosisunab- hängig)	Dopamin 5,1- 15 oder Epinephrin ≤0,1 oder Norepinephrin ≤0,1	Dopamin >15 Epinephrin >0,1 Norepinephrin >0,1
Zentrales Nervensystem GCS-Score	15	13-14	10-12	6-9	<6
Niere Kreatinin (μmol/l)	<110	110-170	171-299	300-440	>440
Urinausschei- dung (ml/Tag)				<500	<200

Der septische Schock wurde als Untergruppe der Sepsis, in der die vorliegenden zirkulatorischen, zellulären und metabolischen Veränderungen zu einem größeren Letalitätsrisiko als Sepsis allein führen, definiert. Klinische Kriterien zur Identifikation von

Patienten im septischen Schock sind dabei die Notwendigkeit einer Therapie mit Vasopressoren zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Drucks von 65 mmHg oder höher und ein Serumlaktat größer als 2 mmol/l bei einer adäquaten Flüssigkeitssubstitution (Shankar-Harl et al., 2016).

### **1.1.2 Epidemiologie der Sepsis**

Eine retrospektive Studie auf englischen Intensivstationen über fünf Jahre zeigte, dass die Prävalenz nach der neuen Sepsis-3 Definition 30,2 % für Patienten mit Sepsis betrug. Unter diesen Patienten hatten 19,9 % einen septischen Schock (Shankar-Hari et al., 2017). Ohne die Initiierung einer antibiotischen Therapie innerhalb der ersten sechs Stunden nach Beginn einer Hypotonie sinkt die Überlebensrate um 7,6 % pro Stunde (Kumar et al., 2006).

Eine amerikanische Langzeitstudie mit Daten aus den Jahren 1979 bis 2000 zeigte einen Anstieg der Inzidenz und einen Abfall der Letalitätsrate. Es kam zu einem Anstieg der Fälle mit Sepsis pro Jahr von 164.072 im Jahr 1979 auf 659.935 im Jahr 2000. Dies bedeutete einen Anstieg um 13,7 % pro Jahr. Die Letalitätsrate sank in dieser Episode von 27,8 % auf 17,9 % (Martin et al., 2003). In einer neueren Studie wurde sogar ein Anstieg der Hospitalisierungsrate der schweren Sepsis auf fast das Doppelte innerhalb eines elfjährigen Beobachtungszeitraumes gezeigt (Dombrovskiy et al., 2007). Der demographische Wandel ist möglicherweise als Ursache für eine steigende Inzidenz und Letalität im Alter zu sehen (Angus et al., 2001). Risikofaktoren für die Letalität von Patienten mit schwerer Sepsis sind steigendes Alter, Herzinsuffizienz, chronische Leberinsuffizienz sowie Fehlfunktionen der im SOFA-Score vorkommenden Parameter (Brun-Buisson et al., 2004). Zudem steigt die Letalität mit steigendem Krankheitsstadium (Alberti et al., 2003).

Etwa 60.000 Todesfälle sorgen dafür, dass die Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache ist. In Deutschland werden durch die schwere Sepsis Gesamtkosten von etwa 6,3 Milliarden Euro verursacht (Graf et al., 2007).

Vincent et al. (2006) wiesen in einer Studie den Respirationstrakt (68 %) als Hauptort der Infektion nach, gefolgt von Abdomen (22 %), Blut (20 %) und Urogenitaltrakt (14 %). Die Letalität bei Patienten mit isolierter abdomineller Infektion ist höher als bei anderen Infektionen (De Waele et al., 2014).

Zusammengefasst wird ersichtlich, dass die Sepsis trotz intensiver Beforschung weiterhin ein gravierendes klinisches und medizinisch-ökonomisches Problem darstellt.

## **1.2 Pathophysiologie der Sepsis und Immunsystem**

Das menschliche Immunsystem wird in das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem eingeteilt (Hoffmann et al., 1999). Das angeborene Immunsystem reagiert als erstes auf eine Infektion und aktiviert das erworbene Immunsystem (Hörner et al., 2003). Es kommuniziert über Makrophagen (Phagozyten, dendritische Zellen) und besitzt Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte "pattern recognition receptors" (PRR). Diese erkennen mikrobielle Bestandteile, die "pathogen-associated molecular patterns" (PAMP) und initiieren eine unspezifische Immunantwort. Das erworbene Immunsystem eliminiert die Pathogene in der späten Phase der Infektion durch die Bildung von spezifischen Antikörpern und ist für die Bildung von Gedächtniszellen verantwortlich (Akira et al., 2006). Diese Unterscheidung von angeborener und erworbener Immunität kann für alle Wirbeltiere vorgenommen werden.

PRR wie Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkennen PAMP und DAMP. Hierdurch wird die angeborene Immunantwort induziert. Zunächst werden große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 freigesetzt. Zu den PAMP gehören Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäure, Flagellin, DNA von Bakterien oder Einzel- oder Doppelstrang-RNA von Viren (Celes et al, 2013, Janeway und Medzhitov, 2002), also Bestandteile von exogenen Pathogenen. Zudem werden endogene Moleküle, Alarmine oder "damage associated molecular pattern" (DAMP), freigesetzt, die zusammen mit den PAMP das Immunsystem stimulieren (Bianchi, 2007). Die Immunantwort steht üblicherweise unter Kontrolle von intrazellulären Signalwegen, der Produktion von Antikörpern der pro-inflammatorischen Zytokine, der Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und der spezifischen Minderung der Expression pro-inflammatorischer Gene. In der Sepsis geht diese Kontrolle verloren, das Krankheitsbild wandelt sich in eine systemische inflammatorische Dysregulation, die u.a. durch einen sogenannten Zytokinsturm gekennzeichnet ist (Celes et al., 2013).



Für mögliche Therapieansätze ist ein Verstehen des durch Bakterien und andere Pathogene verursachten Wirkmechanismus der Immunantwort im Wirt unerlässlich. Das in gram-negativen Bakterien vorkommende LPS ist ein wichtiger Stimulus des angeborenen Immunsystems (Beutler und Rietschel, 2003). TLR-4 erkennt LPS und führt über zwei Signalkaskaden zur Expression inflammatorischer und immunmodulatorischer Gene (Akira und Takeda, 2004). Die Signaltransduktionskaskade wird bei gram-positiven Bakterien über eine Bindung von bakterieller Lipoteichonsäure und Peptidoglykanen an andere spezifische TLR (insbesondere TLR-2) induziert (Takeuchi et al., 1999). Gram-positive Bakterien produzieren potente Exotoxine, von denen einige in die Pathogenese des septischen Schocks verwickelt sind. Beispielhaft sei hier das Toxische Schocksyndrom genannt, ausgelöst von Exotoxinen von *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes* (Cohen, 2002). Eine Infektion wird nicht immer durch einen einzelnen Keim hervorgerufen. In 8,5 % der Fälle kommt es zu einer polymikrobiellen Sepsis (Luzzaro et al., 2011), wodurch durch das Ansprechen unterschiedlicher PRR verschiedene Mechanismen des angeborenen Immunsystems induziert werden (Echtenacher et al., 2001).

### **1.2.1 Toll-like-Rezeptoren**

Der Toll-Rezeptor wurde ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als ein die dorsoventrale Polarisierung in der Ontogenese steuerndes Protein entdeckt (Hashimoto et al., 1988). Im Jahr 1996 wurde gezeigt, dass Mutationen im Toll-Signalweg das Überleben der Fliegen nach einer Pilzinfektion drastisch reduzieren (Lemaitre et al., 1996). 1997 wurde ein Homolog des *Drosophila*-Toll-Rezeptors in Säugetieren entdeckt (Toll-like-Rezeptor, TLR), welches die Expression von Genen der inflammatorischen Reaktion induziert (Medzhitov et al., 1997).

Toll-like-Rezeptoren sind Typ I-Membranglykoproteine, die durch eine leucine-rich repeat (LRR) umfassende, N-terminale, extrazelluläre Domäne und eine C-terminale, zytoplasmatische Signaldomäne charakterisiert sind. Letztere ist homolog zur zytoplasmatischen Signaldomäne des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) und wird daher auch als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet (Bowie und O'Neill, 2000). Toll-like-Rezeptoren werden in verschiedenen Immunzellen, einschließlich Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen oder spezifischen T-Zellen und in nicht primär dem

Immunsystem zugerechneten Zellen wie Fibroblasten und Epithelialzellen exprimiert. TLR-1, -2, -4, -5, -6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während sich TLR-3, -7, -8, -9 in intrazellulären Kompartimenten finden (Akira et al., 2006).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der humanen TLR und ihrer Liganden nach Frederiksen et. al. aus dem Jahr 2019.

**Tab. 3:** Dargestellt sind humane Toll-like-Rezeptoren mit ihren Liganden und Herkunftsorten nach Frederiksen et. al, 2019.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR-1	Lipopeptide	gram-positive Bakterien
TLR-2	Lipoproteine/Lipopeptide Peptidoglykane Porine von Neisserien Zyosan	gram-positive Bakterien gram-positive Bakterien gram-negative Bakterien Pilze
TLR-3	genomische RNA und Doppelstrang-RNA Stathmin	Viren  humanes Protein
TLR-4	Lipopolysaccharide High mobility group box 1 protein (HMGB1)	gram-negative Bakterien endogenes DNA bindendes Protein
TLR-5	Flagellin	Bakterien
TLR-4/ TLR-6	beta-Amyloid	Peptide durch Zerschneiden des Amyloid-Precursor-Proteins
TLR-7	Einzelstrang-RNA Derivate von Imiquimod	Viren antivirale organische Komponente
TLR-8	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR-9	CpG-enthaltene DNA DNA	Bakterien und Viren Viren, Pilze, Bakterien
TLR-10	unbekannt	unbekannt

TLR sorgen für die Hochregulation von co-stimulierenden Molekülen auf dendritischen Zellen, was zu einer Induktion einer pathogenspezifischen Immunantwort führt. Einige

TLR tragen zudem über eine Induktion von Typ I-Interferon zur Etablierung einer antiviralen Immunantwort bei. Nachdem sie PAMP erkannt haben, aktivieren TLR intrazelluläre Signalwege, die zur Induktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-12 führen (Kawai und Akira, 2007). Zu diesen Signalwegen gehört die Aktivierung von intrazellulären TIR-Domänen-Adaptormolekülen wie MyD88 (myeloid differentiation marker) (Wesche et al., 1997), TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) (Fitzgerald et al., 2001, Horng et al., 2001), TRIF (TIR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) (Yamamoto et al., 2002) und TRAM (TRIF related adaptor molecule) (Yamamoto et al., 2003). MyD88 führt zu einer Aktivierung von MAPK (mitogen activated protein kinase) und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Über TIRAP wird eine Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges über TLR-2 und TLR-4 vermittelt. Mittels TRIF wird über TLR-3 und TLR-4 ein TRIF-abhängiger Signalweg aktiviert, der in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, MAPK und dem Transkriptionsfaktor IRF3 (interferon regulatory factor 3) mündet. IRF3 ist wiederum für die Aktivierung von Typ I-IFN bedeutend. NF- $\kappa$ B wird für die maximale Transkription vieler Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 benötigt und stellt daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen dar (Blackwell und Christman, 1997).

#### **1.2.1.1 Toll-like-Rezeptor 2**

TLR-2 erkennt eine Vielzahl von bakteriellen Komponenten wie zum Beispiel Peptidoglykane (Yoshimura et al., 1999), Lipoteichonsäure (Schwandner et al., 1999) und bakterielle Lipoproteine (Brightbill et al., 1999). Takeuchi et al. zeigten 1999, dass TLR-2 eine große Rolle in der Erkennung gram-positiver Bakterien spielt, TLR-2 defiziente Mäuse jedoch auf Lipopolysaccharide wie Wildtyp-Mäuse reagieren. TLR-2 bildet mit anderen TLR wie TLR-1 und TLR-6 heterophile Dimere und kann daher ein großes Spektrum mikrobieller Komponenten erkennen (Takeda und Akira, 2005). TLR-2 wirkt über zwei verschiedene Signalkaskaden. Es kommt zum einen über den MyD88-abhängigen Signalweg (Akira et al., 2003) und zum anderen über einen Signalweg der Rho-GTPase Rac1 (Arbibe et al., 2000) zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

### **1.2.1.2 Toll-like-Rezeptor 4**

TLR-4 dient primär der Erkennung von LPS und der Übersetzung des Signals durch die Plasmamembran (Poltorak et al., 1998). LPS ist aus einem hydrophilen Polysaccharid und einer hydrophoben Komponente, Lipid A, zusammengesetzt. Lipid A ist für Bioaktivität des Endotoxins hauptsächlich verantwortlich (Wang und Quinn, 2010) und bindet an das LPS-binding-protein (LBP) (Tobias et al., 1989). Anschließend bindet dieser Komplex an das Glykoprotein CD14 (Ulevitch und Tobias, 1995). An der Oberfläche von Makrophagen erfolgt die Bindung an einen Komplex aus TLR-4 und MD-2 (Gioannini et al., 2004). Über TRIF und TRAM wird die Signalkaskade ausgelöst (Kim und Kim, 2014), welche in der Folge über NF- $\kappa$ B und IRF3 weiterläuft (s. oben).

### **1.2.1.3 Toll-like-Rezeptor 9**

TLR-9 ist intrazellulär gelegen und unterscheidet nicht zwischen gram-negativen und gram-positiven Bakterien, da er als Rezeptor bakterielle CpG-DNA (Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiv) erkennt. Ferner bindet TLR-9 die DNA verschiedener Viren (Akira und Takeda, 2004; Hemmi et al., 2000). Der Rezeptor wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet und transloziert zur Bindung an Liganden und zur Initiation der Signaltransduktion in ein CpG-DNA enthaltendes lysosomales Kompartiment (Latz et al., 2004). Die in der Signalkaskade benötigten Komponenten sind MyD88, Toll-interacting protein (TOLLIP), Proteinkinase IRAK (IL-1R-associated kinase) und TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). TRAF6 aktiviert NF- $\kappa$ B durch TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase) (Medzhitov, 2001).

## **1.2.2 Inflammatorische Zytokine**

Zytokine als Effektorproteine der durch PPR-Aktivierung ausgelösten Kaskaden sind Regulatoren der Immunantwort auf eine Infektion und spielen daher eine Schlüsselrolle in der Regulation von Inflammation und Verletzungen. Pro-inflammatorische Zytokine stimulieren die systemische Inflammation, anti-inflammatorische Zytokine hingegen regulieren diese herunter. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$ . Sie agieren als endogene Pyrogene (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), regulieren die Synthese von sekundären Mediatoren und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen und stimulieren die

Produktion von Akute-Phase-Proteinen (Chaudhry et al., 2013). Zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören IL-4, IL-10, IL-11 und IL-13. Sie sind für die Prävention von potentiell schädigenden Effekten anhaltender oder schädigender inflammatorischer Reaktionen zuständig (Opal und DePalo, 2000). Die exzessive Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen kann gefährlicher als der eigentliche Stimulus werden. Die Folgen sieht man vor allem in der schweren Sepsis, wo durch den Exzess kapilläre Lecks, Gewebsverletzungen und Organversagen hervorgerufen werden (Ulloa und Tracey, 2005).

#### **1.2.2.1 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  steigert die Ausdifferenzierung von Makrophagen aus Vorläuferzellen (Fahlman et al., 1994), fördert deren Aktivierung (Witsell und Schook, 1992) und Überleben (Conte et al., 2006). Dies führt zu einer Steigerung der pro-inflammatorischen Antwort der Sepsis. TNF- $\alpha$  führt zu multiplen klinischen Effekten wie Hypotension, Fieber, hämorrhagischer Nekrose oder disseminierter intravasaler Koagulopathie (Tracey und Cerami, 1993). So wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  zu einem verringerten kardialen Output, einem reduzierten Füllungsdruck und einer verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion führt (Natanson et al., 1989).

#### **1.2.2.2 IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  ist auch bekannt als Catabolin. Es wird hauptsächlich von Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen produziert (Krause et al., 2012). IL-1 $\beta$  ist ein wichtiger Mediator der inflammatorischen Antwort. Es ist in Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose einbezogen (Chaudhry et al., 2013). IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wirken synergistisch. Werden große Mengen freigesetzt, führt dies zu Hypotension und einem in Tierversuchen tödlich endenden Schock (Dinarello, 1997).

#### **1.2.2.3 IL-6**

IL-6 wird zum einen von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Mastzellen) und zum anderen von Zellen und Geweben wie Osteoblasten, Knochenmark, Keratinozyten, Chondrozyten, Trophoblasten, intestinalen Epithelialzellen oder glatten Muskelzellen (Bellido et al.,

1996; Heinrich et al., 1990; Loppnow und Libby, 1990; McGee et al., 1993; Yang et al., 1988) sezerniert. Zu den pleiotropen Funktionen gehören Effekte auf B-Zellen (Produktion von Immunglobulinen, Proliferation von Myelom-Zellen), T-Zellen (Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, Differenzierung von cytotoxischen T-Lymphozyten), hämatopoetischen Progenitorzellen, Makrophagen, Hepatozyten (Synthese Akute-Phase-Proteine), Knochenmetabolismus (Induktion von Knochenresorption) und Herzmuskelzellen (negative Inotropie) (Kishimoto et al., 1995). Zudem fördert IL-6 die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und ist somit ein wichtiger Knotenpunkt in der pro-inflammatorischen Phase (Klaschik et al., 2009).

#### **1.2.2.4 IL-10**

IL-10 ist das wichtigste anti-inflammatorische Zytokin, welches in der humanen Immunantwort gefunden wurde. Es wird von Monozyten/Makrophagen, Th2-Zellen und B-Zellen gebildet. Zu den Hauptaufgaben gehören die Inhibition von Monozyten/Makrophagen, die Inhibition der Expression der Th1-Zytokine (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) und die Inhibition der Produktion von Zytokinen durch neutrophile Granulozyten (Opal und DePalo, 2000). Zudem inhibiert IL-10 die Produktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  (Mosser und Zhang, 2008).

#### **1.2.2.5 IFN- $\beta$**

Im Gegensatz zu vielen anderen Zytokinen kann IFN- $\beta$  als Typ I-IFN von allen Zellen des Organismus produziert werden, zumeist als Reaktion auf Viren (De Maeyer und De Maeyer-Guinard, 1998). IFN- $\beta$  wird aber auch als Antwort auf LPS sezerniert. Es inhibiert die durch LPS induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und schützt gegen Endotoxine und Sepsis durch eine Hochregulation von SIRT1 (silent information regulator transcript-1), der ein wichtiger Regulator verschiedener Prozesse wie Inflammation und Apoptose ist (Vincent, 2015 und Yoo et al., 2015). Über verschiedene TLR werden IRF3 und NF- $\kappa$ B aktiviert und somit Typ I-IFN induziert (Wang et al., 2010).

#### **1.2.2.6 IFN- $\gamma$**

Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  sind Makrophagen (Fultz et al., 1993), aktivierte natürliche Killerzellen (Perussia, 1991), T-Helferzellen (Mosmann und Coffman, 1989) und

cytotoxische CD8<sup>+</sup>-Zellen (Sad et al., 1995). Die Produktion von IFN- $\gamma$  wird in natürlichen Killerzellen von durch Makrophagen produzierten Zytokinen, insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18, stimuliert (Okamura et al., 1998; Trinchieri, 1995). Zudem erfolgt eine Eigenstimulation (Hardy und Sawada, 1989). In der frühen Phase beschleunigt IFN- $\gamma$  die Inflammation, während es in der späten Phase den Prozess der Selbstlimitation vermittelt. Von Th1-Zellen produziertes IFN- $\gamma$  ist für eine Selbstlimitation der Th1-vermittelten Immunantwort verantwortlich (Feuerer et al., 2006). Zudem unterdrückt die T-Zell-Produktion von IFN- $\gamma$  die Bildung von Osteoklasten (Takayanagi et al., 2000). In einer Studie von Leentjens et al. (2012) wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  partiell eine Immunparalyse im Menschen umkehren kann. Bei Versuchen mit IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen wurde eine verminderte systemische Inflammation nachgewiesen (Romero et al., 2010). Hieraus kann geschlossen werden, dass IFN- $\gamma$  eine proinflammatorische Antwort fördert.

### **1.3 Tiermodelle der Sepsis**

In der präklinischen Forschung spielen experimentelle Tiermodelle eine wichtige Rolle. Sie versuchen pathophysiologische Veränderungen hervorzurufen, die möglichst vergleichbar mit denen einer klinischen Sepsis sind. Gerade bei Reihenversuchen sind dabei gleichbleibende Ausgangsbedingungen unabdingbar, um zu stabilen und vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen.

Die Maus stellt für die Sepsisforschung dabei einen wichtigen Modellorganismus dar. Mäuse sind für die Untersucher relativ ungefährlich, verschiedene Stämme sind leicht züchtbar und genetische Veränderungen erlauben, einzelne Gene in der Pathogenese der Sepsis zu untersuchen (Fink, 2014). Im vergangenen Jahrhundert erfolgte die Entwicklung diverser muriner Sepsismodelle. Hierzu gehören die Injektion von Endotoxin (LPS), die Injektion von Mikroorganismen, die Implantation von Stuhlproben in verschiedene Gewebe, das cecal ligation and puncture (CLP) und colon ascendens stent peritonitis (CASP) Modell (Deitch, 2005). Obwohl bei der Injektion von LPS der infektiöse Fokus fehlt, zählt es zu den weit verbreiteten Modellen zur Induktion eines sepsisähnlichen Krankheitsverlaufes. Streng genommen handelt es sich dabei jedoch um ein (steriles) SIRS. Beim Vergleich von septischen Patienten mit LPS behandelten Versuchstieren zeigte sich eine zeitlich veränderte Kinetik von TNF, IL-6 und HMGB-1

(high mobility group protein B1) (Fink, 2014). Durch die Injektion von LPS wird zwar eine Endotoxinämie hervorgerufen. Deren Zytokinprofil ist jedoch nicht auf den Menschen zu übertragen. Bei einer Infektion des Menschen kommt es in der Regel zu einer Reaktion auf mehrere Pathogenitätsmerkmale. Zudem handelt es sich oftmals nicht um einen einzelnen Keim, sondern um eine polymikrobielle Infektion. Als Kritikpunkt dieses Modelles gilt folglich eine eingeschränkte klinische Relevanz. Als der Realität der Sepsis näherkommendes Modell gilt die intravenöse oder intraperitoneale Injektion von Bakterien. Da üblicherweise verwendete Laborstämme wie *E. coli*-Derivate durch Phagozytose und Inaktivierung eliminiert werden, werden größere Mengen an Bakterien injiziert. Dies führt zu einer massiven Induktion von Zytokinantworten und einer kurzen Überlebenszeit der Versuchstiere (Schultz und van der Poll, 2002). Die Wirkkinetik bei einmaliger Gabe ist somit nicht mit der in der Klinik durch kontinuierliche oder intermittierende Freisetzung erhaltenen Wirkung zu vergleichen (Wichterman et al., 1980). Um einer verkürzten Lebenszeit bei der Bolusinjektion entgegenzutreten, wurde das Modell mithilfe einer gleichmäßigen Injektion über einen längeren Zeitraum modifiziert (Pass et al., 1984). Nachteilig dabei ist jedoch die dem Organismus fehlende Möglichkeit einer Isolierung des septischen Fokus. Ebenso fehlt, wie bei der Injektion von LPS, eine Betrachtung der pathogenetischen Prozesse einer polymikrobiellen Sepsis.

Als ein Lösungsansatz wurden Modelle der endogenen Entwicklung einer Peritonitis mit konsekutiver Sepsis entwickelt. Das CLP-Modell von Wichterman et al. (1980) wurde ursprünglich an Ratten entwickelt. Das Caecum der Versuchstiere wird hierbei ligiert und anschließend punktiert. Dadurch kommt es zu einer mehr oder minder kontinuierlichen Aussaat von Bakterien in die Bauchhöhle. Dieses in der Durchführung einfache Modell wurde später auf weitere Arten wie Mäuse übertragen (Baker et al., 1983). Das CLP-Modell resultiert in einem septischen Schock mit meist letalem Ausgang 24 bis 48 Stunden nach Ligation und ist mit einer polymikrobiellen Sepsis assoziiert. Die Letalität kann durch Verwendung unterschiedlicher Größen der Nadeln und einer variablen Anzahl an Löchern verändert werden (Wichterman et al., 1980). In diesem Modell mangelt es jedoch an einer Quantifizierbarkeit der exakten Dosis und Art der sepsisauslösenden Mikroorganismen. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieses Modell zu einer intraabdominellen Abszessbildung mit verminderten Zeichen einer



systemischen Inflammation führt (Maier et al., 2004). Als eine weitere Verbesserung dient das CASP-Modell. Hier wird ein septischer Fokus durch einen Stent im Colon ascendens generiert. Durch die Verbindung der Bauchhöhle mit dem Gastrointestinaltrakt wird über den Stent eine kontinuierliche bakterielle Freisetzung erreicht. Durch Verwendung unterschiedlicher Stent-Größen kann eine Kontrolle der Letalität erreicht werden (Zanti et al., 1998). Somit kommt das CASP-Modell mit früher und stetig ansteigender systemischer Inflammation (SIRS) nahe an den klinischen Verlauf einer diffusen Peritonitis mit Sepsis heran (Maier et al., 2004).

Ein weiteres Model zur Sepsisinduktion ist die intraperitoneale Stuhlinjektion (IPSI). Um einen möglichst zuverlässigen und leicht zu reproduzierenden Ablauf zu erhalten, injizierten Gonnert et al. (2011) ein definiertes Volumen einer bei - 80 °C gelagerten humanen Stuhlprobe in das Peritoneum von Mäusen. Hierdurch wurde eine der humanen Sepsis ähnelnde Zytokinantwort induziert. Durch unterschiedliche Konzentrationen können unterschiedliche klinische Ausprägungen erreicht werden. Shrum et al. (2014) entnahmen aus dem Caecum von C57BL/6 (B6) Stuhl, den sie mit NaCl 0,9 % verdünnten und anschließend filterten. Injizierten sie 0,5 ml mit einer Konzentration von 90 mg/ml intraperitoneal, starben 75 % aller Mäuse innerhalb von 24 Stunden an einer polymikrobiellen Sepsis. Betrug die Konzentration 180 mg/dl, überlebte kein Tier. Durch die intraperitoneale Injektion lässt sich nicht nur die Konzentration der injizierten Keime beliebig variieren. Es ist zudem auch möglich Versuchsabläufe durchzuführen, die Injektionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorsehen. In einer Versuchsreihe erfolgte so zum Beispiel die Einteilung der Versuchstiere in drei Gruppen. Die erste Gruppe erhielt eine potentiell tödliche Konzentration intraperitoneal injiziert, eine zweite Gruppe eine potentiell nicht tödliche Konzentration zum ersten Zeitpunkt und eine potentiell tödliche Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt. Hierdurch sollte der Einfluss einer vorherigen abdominalen Infektion auf eine erneute Peritonitis untersucht werden (Alberti und Petrolanu, 2012). Es konnte eine Schutzfunktion der leichteren Peritonitis gezeigt werden. Bei längerem zeitlichem Abstand der beiden Injektionen nahm der Schutz jedoch wieder ab. Durch dieses Modell können somit weitere Fragestellungen, die durch eine kontinuierliche Abgabe eines Pathogens zum Beispiel mittels CLP nicht durchgeführt werden können, bearbeitet werden.

In unserer Arbeit wurde ein Modell der intraperitonealen Stuhlinjektion (IPSI) verwendet. Im Gegensatz zu der endogenen fäkalen Kontamination im Rahmen von CLP und CASP wurde eine fäkale Suspension von anderen Mäusen (Spender) gewonnen und durch die Bauchdecke des Empfängertieres injiziert. Es wurde dabei großer Wert auf eine Standardisierung der Durchführung gelegt.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist in den abdominalen Sepsis-Modellen in hohem Maße von gleichbleibenden Ausgangsbedingungen abhängig. Bei Modellen der intraperitonealen Injektion von Stuhl steht hier die mikrobielle Stuhlzusammensetzung an vorderster Stelle (das sog. Darm-Mikrobiom). Hoy et al. (2015) untersuchten Kotproben einzelner weiblicher Inzuchtmäuse über einen Zeitraum von bis zu 263 Tagen. Die Tiere erhielten die gleiche Ernährung und wurden unter den gleichen Bedingungen untergebracht. Es zeigten sich sowohl signifikante Variationen innerhalb eines Individuums über die Zeit als auch interindividuelle Variationen. Bei der Verwendung von Stuhl zur Induktion eines septischen Krankheitsbildes im Tiermodell, sei es endogene oder auch exogene Zuführung, können solche Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung des Kots signifikanten Einfluss auf die Entwicklung entsprechender Symptome haben (Li et al., 2018).

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Anbieter von Labortieren. Vor diesem Hintergrund stellten wir uns die Frage, ob es Unterschiede in der Stuhlflora einzelner Lieferanten gibt und ob diese signifikante Einflüsse auf die Versuche ausüben.

#### **1.4 Fragestellung**

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen formuliert, welchen im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden sollte:

- I. Gibt es Unterschiede des Spender-Mikrobioms verschiedener Anbieter?
- II. Zeigen sich Veränderungen des Spender-Mikrobioms über die Zeit?
- III. Gibt es Einflüsse des Spender-Mikrobioms auf die klinische Manifestation einer experimentellen Sepsis unter Verwendung des IPSI-Modells?
- IV. Zeigen sich Einflüsse des Spender-Mikrobioms auf die molekularbiologische Manifestation einer experimentellen Sepsis unter Verwendung des IPSI-Modells?
- V. Hat das Empfänger-Mikrobiom Einflüsse auf die Manifestation einer experimentellen Sepsis unter Verwendung des IPSI-Modells?

Die Ergebnisse der Untersuchung sollen bei der Definition von Standardparametern, der Auswahl und der Interpretation von murinen Modellen helfen. Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter dem Titel "Vendor Effects of Murine Gut Microbiota Influence Experimental Sepsis" im *Journal of Surgical Research* veröffentlicht (Hilbert et al., 2017).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden von den kommerziellen Zuchtbetrieben Charles River Laboratories International, Inc. (CR, Sulzfeld, Deutschland), Janvier Labs (J, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) und Harlan UK Ltd. (H, jetzt Envigo Research Models and Services, Indianapolis, Indiana, USA) bezogen. Es handelte sich um männliche C57BL/6N-Mäuse, die zum Versuchszeitpunkt zwischen 8 und 12 Wochen alt waren und im Mittel ein Körpergewicht von 20-24 g hatten.

Die Haltung der Tiere erfolgte im Haus für Experimentelle Therapie (HET) der Universität Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn unter den folgenden standardisierten Bedingungen:

Beleuchtung:	200 Lux auf 1 Meter (m) Höhe
Hell-/Dunkelphase:	07:00 Uhr - 19:00 Uhr Licht 19:00 Uhr bis 07:00 Uhr Dunkel
Relative Luftfeuchtigkeit:	etwa 50 % (30 bis 70 %)
Luftwechselrate:	15-fach pro Stunde
Raumtemperatur:	22 °C (+/- 2 °C)
Käfigart:	Filtertop-Käfigsysteme, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg, Deutschland
Futter und Wasser:	ad libitum
Futter:	ssniff Haltungsdiet (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland); Futter, Wasser und Einstreu wurden vor Nutzung autoklaviert
Besatzdichte:	5 Tiere pro Käfig

### 2.2 Modell der polymikrobiellen Sepsisinduktion durch eine intraperitoneale Stuhlinjektion

Die Versuche an den C57BL/6N-Mäusen erfolgten nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV

NRW, Recklinghausen, Deutschland) unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A071 und unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen.

### **2.2.1 Versuchsreihe Zeitpunkt T1**

Die Induktion eines septischen Krankheitsbildes erfolgte durch intraperitoneale Stuhlinjektion (IPSI). Eine Woche vor Stuhlinjektion wurden 8 Wochen alte C57/BL6N-Mäuse (CR, J) in der Versuchstieranlage des HET eingestallt. Jeweils fünf Tiere eines Anbieters wurden in einem Käfig untergebracht. Für den ersten Versuch erfolgte die Lieferung von 8 Wochen alten männlichen Tieren von CR, J und H zur Stuhlentnahme zu einem vorherigen Zeitpunkt. Die Stuhlentnahme erfolgte unter streng antiseptischen Bedingungen. Die Mäuse wurden einzeln auf den Operationstisch gelegt und durch zervikale Dislokation getötet. Das tote Tier wurde auf den Rücken gelagert und der Bauch mit einem Ethanol-getränkten Tupfer desinfiziert. Nach Einhaltung der vom Hersteller vorgeschriebenen Einwirkzeit erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes mittels sterilisiertem Instrumentarium (Schere und Pinzette). Das Caecum wurde aufgesucht und am blinden Ende ein Loch eingeschnitten. Der darin befindliche Stuhl wurde durch vorsichtigen manuellen Druck von außen in Richtung Loch bewegt und in ein zuvor leer gewogenes 15 ml-Röhrchen aufgenommen. Zusätzlich wurde eine kleine Probe mit einer Einmalöse entnommen und ein sogenannter 3-Ösen-Ausstrich auf einer CHROMagar<sup>TM</sup> orientation medium-Platte (CHROMagar, Paris, Frankreich) durchgeführt. Dazu wurden die ersten beiden Ausstriche mit der ersten Öse und der dritte Ausstrich mit der zweiten Öse durchgeführt. Nach diesem Vorgehen erfolgte die Stuhlentnahme bei allen dafür vorgesehenen Tieren.

Der in das Röhrchen transferierte Stuhl wurde mit einer Einmalöse vermischt, und ein weiterer 3-Ösen-Ausstrich wurde angelegt. Anschließend wurde der gepoolte Stuhl bei -80 °C tiefgefroren. Am Tag der geplanten Injektion wurde der Stuhl aufgetaut. Nach Abwiegen der Stuhlprobe (etwa 0,1 - 0,2 g/Tier) wurden zwei Teile sterile NaCl-Lösung zu einem Teil Stuhl gegeben. Mit dieser Suspension wurde ein eigens dafür angefertigter Filter befüllt. Ein solcher Filter bestand aus einem 1,5 ml-Proben-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und dem oberen Teil einer kurz unterhalb des Filters abgeschnittenen und in das Röhrchen gesteckten sterilen 1000 µl-Filterpipettenspitze (Abb. 1).



**Abb. 1:** Darstellung des angefertigten Filters. Links: Filterpipettenspitze und Probenröhrchen. Rechts: Zusammengesetzter Filter

In einen derart angefertigten Filter wurden etwa 400  $\mu\text{l}$  1:3-verdünnter Stuhl gefüllt. Nach kurzer Zentrifugation auf maximal 1100 rpm bildeten sich drei Schichten unterhalb der Filtereinheit. Die sich in der Mitte ablagernden Feststoffe wurden verworfen, die unterste und oberste Fraktion (wässrige bis sämige Konsistenz) wurden in einem neuen Röhrchen gesammelt und bei 4 °C maximal für eine Woche bis zur Injektion gelagert. Die zuvor ausgestrichenen Chromagar-Platten wurden für 48 Stunden bei 35 °C im Brutraum des Instituts für Mikrobiologie der Universität Bonn bebrütet.

Im Anschluss erfolgte die intraperitoneale (IP-) Injektion. Von den nun 9 Wochen alten Empfängertieren wurden das basale Körpergewicht und die Körpertemperatur (rektal gemessen) erhoben. Zur Unterscheidung der Mäuse erfolgte eine Farbmarkierung am Schwanz. Die Injektionen erfolgten zu unterschiedlichen festgelegten Zeitpunkten. Dazu wurden die Mäuse mit einer Hand fixiert, sodass der Unterleib gestreckt frei lag. Mit der anderen Hand erfolgte nach Hautdesinfektion die intraperitoneale Applikation von 200  $\mu\text{l}$  der 1:3-verdünnten Stuhllösung mittels einer 21G-Kanüle in den rechten unteren Quadranten des Abdomens der Maus. Kontrolltieren wurden je 200  $\mu\text{l}$  sterile NaCl-Lösung mit gleicher Methode injiziert (sog. Sham-Gruppe) bzw. es wurde keine Injektion vorgenommen (als Kontrolle bezeichnet). Eine systemische Analgesie mit Buprenorphin (Temgesic<sup>TM</sup>, Indivior UK Limited, Berkshire, UK) erfolgte subkutan unmittelbar nach IPSI und alle 12 Stunden danach.

**Tab. 4:** Injektionsschema Versuchsreihe Zeitpunkt T1

Empfänger	Spender				
	Charles River	Janvier	Harlan	Kontrolle	Sham
Charles River 8+1 Woche	5	5	5	5	5

Nach 6, 12 und 18 Stunden erfolgte durch eine für die Behandlung verblindete Person die klinische Beurteilung sowie Messung von Gewicht und Temperatur der Tiere. Tote Tiere wurden nicht in die Analyse von Körpergewicht und Temperatur einbezogen. Nach 18 Stunden wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchdecke mit Ethanol desinfiziert. Nun wurde die Bauchhöhle von der Genitalregion bis zum Brustkorb eröffnet. Im Anschluss wurde die Milz aufgesucht und entnommen. Das Organ wurde in 2 - 3 gleichgroße Stücke geteilt und in ein mit 1 ml *RNAlater-Lösung* befülltes Proben-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gelegt. Nach einer mindestens 12-stündigen Lagerung bei +4 °C wurden die Organe bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.2 Versuchsreihe Zeitpunkt T2

In einem Folge-Experiment 16 Monate nach T1 erfolgte die Stuhlentnahme nur noch aus Tieren, die von CR bzw. J bezogen wurden. Zum einen sollte die Stabilität der experimentellen Bedingungen im zeitlichen Verlauf gezeigt werden und zum anderen sich auf zwei Anbieter (CR, J) konzentriert werden. Im Unterschied zu der Versuchsreihe Zeitpunkt T1 erfolgte die Stuhlentnahme bei CR- und J-Mäusen zur IP-Injektion am Tag der Injektion. Ein Einfrieren der Proben bei -80 °C entfiel. Die Herstellung einer 1:3-Verdünnung erfolgte analog dem oben beschriebenen Vorgehen. Bis zum Zeitpunkt der Injektion wurden die Stuhlproben bei +4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion des Stuhls entsprechend des unten abgebildeten Schemas (Tab. 5) in die betreffenden Mäuse. Das Vorgehen bei der Injektion war analog zu dem oben beschriebenen Procedere. Sham-Mäuse erhielten 200 µl sterile NaCl-Lösung und Kontroll-Tiere verblieben unbehandelt. Im Unterschied zum vorherigen Versuch erfolgten die klinische Beurteilung sowie Messung von Gewicht und Temperatur der Tiere zu den Zeitpunkten unmittelbar vor und 12 Stunden nach

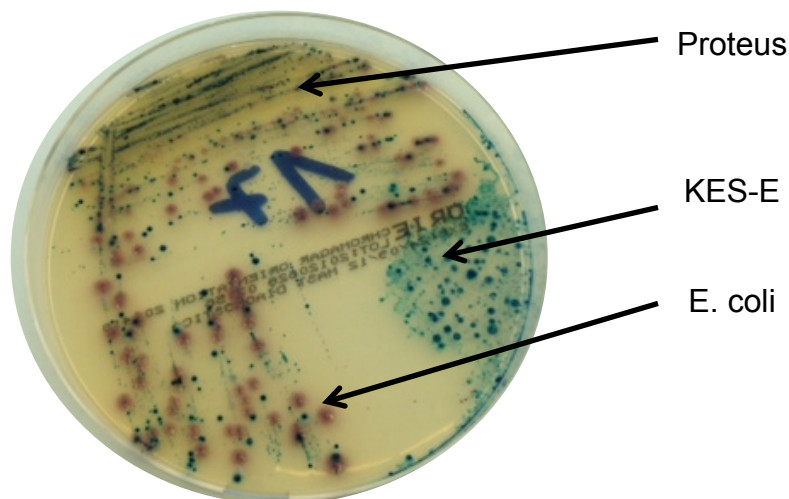
Injektion. Nach 12 Stunden wurde der Versuch analog zu dem unter 2.2.1 geschilderten Vorgehen beendet.

**Tab. 5:** Injektionsschema Versuchsreihe Zeitpunkt T2

Empfänger	Spender			
	Charles River	Janvier	Kontrolle	Sham
Charles River 8+1 Woche	5	5	5	5
Janvier 8+1 Woche	5	5	5	5

### 2.3 Mikrobiologische Auswertung

Die verwendeten CHROMagar™ orientation medium-Platten machten eine Unterscheidung der Bakterienstämme anhand unterschiedlicher Farbgebung der Kolonien möglich. Nach einer 48-stündigen Bebrütung bei 35 °C im Brutraum der Mikrobiologie konnten insbesondere Escherichia (E.) coli, Staphylococcus (S.) aureus, S. saprophyticus, Proteus spp. und eine fünfte Gruppe ("KES-E", bestehend aus Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia spp. und Enterokokken) farblich differenziert werden (Abb. 2).



**Abb. 2:** Exemplarische Darstellung des Wachstums der einzelnen Kolonien auf einer CHROMagar™ orientation medium-Platte

E. coli bildete rosa Kolonien mit teils ausgefranstem Rand. S. aureus imponierte als kleine, weiße bis goldfarbene Kolonie mit glattem Rand. Die Farbe blau wurde für die



"KES-E"-Gruppe (s.o.) verwendet, da das Verfahren eine genauere Unterscheidung dieser Spezies in die o.g. Subgruppen nicht erlaubte. *S. saprophyticus* bildete stecknadelkopfgroße, scharf begrenzte, rötliche Kolonien. Bei *Proteus* konnte das sogenannte Schwärmphänomen beobachtet werden. Der Keim bildete keine sichtbaren einzelnen Kolonien, sondern überzog größere Areale des Agars mit einer Bakterenschicht. Stärker befallene Stellen erschienen dabei dunkelgelb bis bräunlich. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über Größe, Morphologie und Besonderheiten der Keime.

**Tab. 6:** Darstellung von Größe, Morphologie und Besonderheiten der auf CHROMagar™ orientation medium wachsenden Bakterien

Bakterium	Charakteristika
<i>E. coli</i>	mittelgroße bis große, dunkel-rosafarbene bis pinkfarbene Kolonien, mit oder ohne Höfe
<i>S. aureus</i>	kleine bis mittelgroße Kolonien, Farbe weiß bis gelb, mit oder ohne Höfe
<i>S. saprophyticus</i>	kleine, opake, hell-pink- bis rosafarbene Kolonien
<i>Proteus</i> spp.	beigefarbene Kolonien, teilweise umgeben von bernsteinfarbenen bis braunen Höfen
"KES-E"	multiple Größen, grün- bis blaufarbene Kolonien

Eine Verifizierung der einzelnen Kolonien erfolgte mit MALDI-TOF ("Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation"). Hierbei werden Mikroben entweder über intakte Zellen oder Zellextrakte identifiziert. Die zu identifizierende Probe wird durch Mischen oder Beschichten mit einer energieabsorbierenden organischen Verbindung vorbereitet. Die getrocknete und nun kristallisierte Probe wird mit einem Laserstrahl ionisiert. Die protonierten Ionen werden auf ein festes Potential beschleunigt. Detektion und Messung erfolgen für mikrobiologische Anwendungen hauptsächlich mit *Time of Flight* (TOF) - Analysatoren durch die Bestimmung der Zeit, die für die Durchquerung eines Flugröhrchens benötigt wird (Singhal et al., 2015). Die Ergebnisse der

Massenspektromanalyse werden mit Werten in einer Datenbank verglichen. Die Spektren sind charakteristisch für einzelne Bakterienstämme (Barbuddhe et al., 2008).

## **2.4 Klinischer Score**

Um bei der Bewertung des Krankheitsausmaßes eine möglichst große Objektivierung zu erreichen und die Tiere besser vergleichen zu können, wurde ein geeigneter klinischer Score (KS) verwendet. Grundlage waren Arbeiten von Morton und Griffiths (1985), deren Erkenntnisse verwendet und ergänzt wurden. Der KS setzte sich aus Körperhaltung, Körperpflege, Bewegung/Verhalten zusammen. Für jeden dieser drei Parameter wurden null bis maximal drei Punkte in 0,5-Punkte-Schritten vergeben. Für eine normale Körperhaltung gab es keine Punkte. Erkrankte Tiere erhielten Punkte für eine nicht normale Haltung, die sich in Form von Buckeln, Verkrampfungen, Lähmungen oder hohem Muskeltonus widerspiegelte. Im Bereich der Körperpflege führten stumpfes, ungeordnetes und aufgestelltes Fell sowie ungepflegte verklebte Körperöffnungen und trübe, verklebte Augen zu einer erhöhten Punktzahl. Keine Punkte konnten für ein glattes und glänzendes Fell, saubere Körperöffnungen und klare, glänzende und ganz geöffnete Augen vergeben werden. Für ein normales Verhalten sprachen die Neugier auf Anblasen, Berührung oder das Öffnen des Käfigs, aktive soziale Kontakte und Schlafen in der Gruppe. Punkte gab es hier für Abweichungen wie zum Beispiel Selbstisolation, Lethargie, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik, Koordinationsstörungen und Autoaggressionen.

Die Addition der maximal möglichen Punkte ergab einen Score zwischen 0 und 9 Punkten. Für tote Mäuse wurden 9 Punkte als klinischer Score festgelegt.

## **2.5 Molekularbiologische Aufarbeitung der Proben**

### **2.5.1 RNA-Extraktion mit anschließender Konzentrationsbestimmung**

Die zuvor den Versuchstieren entnommenen und bei  $-80\text{ °C}$  in *RNAlater* lagernden Milz-Proben wurden dem Gefrierfach entnommen und aufgetaut. Das Protokoll zur Extraktion auf Basis von Phenol wurde angewendet und an drei Arbeitstagen durchgeführt. Zur Herstellung von 2M Natriumacetat wurden 8,2 g Natriumacetat in 15 ml DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurde ein pH von 4 mit Eisessig eingestellt und dann mit DEPC-Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

## Tag 1:

1. Befüllen von 15 ml Röhrchen mit 3 ml GIT (Guanidine thiocyanate)
  - a. Hinzufügen von Gewebestücken
  - b. Homogenisieren mit Homogenisator/Dispergiergerät Ultra-Turrax<sup>®</sup> (IKA-Werke, Staufen)
  - c. Homogenat auf Eis stellen
  - d. Spülen des Homogenisierstabs nach jedem Gewebestück 1x in ca. 40 ml GIT und 2x in je ca. 40 ml DEPC-Wasser (erneuern von GIT und DEPC-Wasser nach 4 Durchgängen)
  - e. Zentrifugieren: 3500 rpm, 4 °C, 15 Minuten
2. RNA-Isolation
  - a. Pipettieren in 2 ml Probenröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland):
    - i. 700 µl Gewebehomogenat
    - ii. 70 µl NaOAc 2M, pH = 4
    - iii. 560 µl Phenol, pH < 4,5
    - iv. 280 µl Phenol:Chloroform:Isoamyl
  - b. Schütteln
  - c. 20 Minuten auf Eis inkubieren
  - d. Zentrifugieren: 12000 rpm, 4 °C, 20 Minuten
  - e. Obere, wässrige Phase abnehmen und in 1,5 ml-Probenröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) füllen
  - f. Hinzufügen von 500 µl Isopropanol
  - g. Schütteln
  - h. Über Nacht bei - 20 °C einfrieren

## Tag 2:

1. Waschen mit GIT und Isopropanol
  - a. Proben auftauen (1 - 2 Minuten)
  - b. Zentrifugieren: 12.000 g, 4 °C, 10 Minuten
  - c. Überstand abgießen
  - d. Pellet 20 - 40 Minuten trocknen lassen
  - e. 300 µl 4M GIT und 300 µl Isopropanol hinzugeben

- f. Durchmischen mittels Vortex
- g. Über Nacht bei - 20 °C einfrieren

Tag 3:

1. Waschen mit Ethanol

- a. Proben auftauen (1 - 2 Minuten)
- b. Zentrifugieren: 12000 g, 4 °C, 10 Minuten
- c. Überstand abgießen
- d. Pellet 20 - 40 Minuten trocknen lassen
- e. 500 µl 75 % Ethanol hinzugeben und schwenken
- f. 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- g. Zentrifugieren: 12000 g, 4 °C, 10 Minuten
- h. Überstand abgießen
- i. 500 µl 75 % Ethanol hinzugeben und schwenken
- j. 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- k. Zentrifugieren: 12000 g, 4 °C, 10 Minuten
- l. Überstand abgießen
- m. Pellet 20 - 40 Minuten trocknen lassen
- n. Pellet in ca. 30 (- 60) µl DEPC-Wasser durch auf- und abpipettieren lösen
- o. Falls Pellet zu trocken: Thermoblock für 10 Minuten bei 55 °C
- p. Proben auf Eis lagern

2. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts im NanoDrop 2000

- a. Leerprobe mit 1 µl DEPC-Wasser
- b. Probenmessung mit 1 µl RNA
- c. RNA bei - 80 °C lagern

Die abschließende Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte im NanoDrop 2000. Physikalische Grundlage dafür ist die Absorption des Lichts, die sich proportional zur Konzentration der Nukleinsäuren verhält. Bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration. Um einen Aufschluss über die Reinheit der Proben zu erlangen, wurde zusätzlich bei dem Absorptionsmaximum von Proteinen, welches bei 280 nm liegt, gemessen. Das

Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm sollte für einen hohen Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## 2.5.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde die instabile RNA in stabilere cDNA umgeschrieben. Als Ausgangslösung dienten 25 µl einer aus RNA und DEPC bestehenden Lösung. Die Konzentration dieser Lösung betrug 80 ng/µl, entsprechend 2000 ng RNA in 25 µl Volumen. Das Gemisch wurde anschließend in je ein 0,2 µl Proben-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Pro Probe wurden 25 µl Reaktionsgemisch hinzugefügt (sog. Mastermix). Dieses bestand aus 5 µl 10x Reverse-Transkriptase-Puffer, 2 µl Desoxyribunukleosidtriphosphate (dNTPs), 5 µl Random Primer, 2,5 µl Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl) und 10,5 µl Nuclease-freiem Wasser (DEPC). Die Proben wurden vermischt und kurz zentrifugiert. Im Thermocycler wurden die Proben für etwa 2 Stunden nach folgendem Schema inkubiert (Tab. 7):

**Tab. 7:** Zeitliche Abfolge der Inkubation im Thermocycler

	<b>Schritt 1</b>	<b>Schritt 2</b>	<b>Schritt 3</b>	<b>Schritt 4</b>
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4°C
Zeit	10 Minuten	2 Stunden	5 Sekunden	∞

Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:5 verdünnt (80 µl DEPC-Wasser und 20 µl cDNA ergaben 100 µl einer 1:5 Verdünnung). Die Proben lagerten bei + 4 °C bis zur Weiterverarbeitung.

## 2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.5.3.1 Allgemeiner Teil

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion werden bestimmte DNA-Abschnitte mittels Polymerasen amplifiziert. Dieser Vorgang aus Denaturierung, Hybridisierung (Anlagerung von Oligonukleotiden) und Elongation wird mehrfach wiederholt, um selbst kleinste Mengen eines bestimmten DNA-Abschnitts nachzuweisen.

Zunächst wird das PCR-Gemisch erhitzt, sodass alle doppelsträngigen Nukleinsäurestränge voneinander getrennt werden und nur noch Einzelstränge

vorliegen. Beim Annealing lagern sich jeweils zwei Oligonukleotid-Primer gegenläufig an zwei komplementäre DNA-Stränge. Dadurch wird der Zielabschnitt begrenzt und nur der gewünschte Abschnitt synthetisiert. In der folgenden Elongationsphase beginnt nun eine DNA-Polymerase an den Primern mit dem Anhängen von neuen Desoxynukleotid-Bausteinen an das freie 3'-OH-Ende und verlängert den Strang so in 3'-Richtung. Nach Ablauf der drei Schritte startet der Prozess mit der im Optimalfall doppelten Menge an Ziel-DNA erneut. Da bei den einzelnen Schritten unterschiedliche Temperaturen benötigt werden, läuft die PCR in einem entsprechenden Gerät (Thermocycler) ab.

### 2.5.3.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR)

Für die Untersuchungen wurden der Viiia™7 von Applied Biosystems, 384-Well-Platten und folgende Primer-Sonden verwendet:

**Tab. 8:** Darstellung der in der RTq-PCR zur Detektion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , TLR-2, TLR-4 und TLR-9 verwendeten Primer

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mouse 18s (endogene Kontrolle)	Mm02601777_g1
mouse IL-1 $\beta$	Mm01336189_m1
mouse IL-6	Mm00446190_m1
mouse IL-10	Mm00439616_m1
mouse TNF- $\alpha$	Mm00443258_m1
mouse INF- $\beta$	Mm00439546_s1
mouse IFN- $\gamma$	Mm01168134_m1
mouse TLR-2	Mm01213945_g1
mouse TLR-4	Mm00445279_m1
mouse TLR-9	Mm00446193_m1

Bei der quantitativen Real-Time-PCR findet eine Fluoreszenzmessung während jedes Zyklus statt. Ansteigende Fluoreszenz zeigt also eine proportionale Menge der PCR-Produkte an. Die hier verwendeten TaqMan-Sonden sind genspezifische Primer, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind und so eine Quantifizierung möglich machen. Wird ein gewisser Fluoreszenz-Schwellenwert, der Cycle Threshold (CT-Wert) übertroffen, liegt eine gegenüber der Hintergrundfluoreszenz signifikant höhere Fluoreszenz für den

gesuchten Genabschnitt vor. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um den Schwellenwert über die Hintergrundfluoreszenz zu heben, ist ein Maß für die Menge an in der Probe ursprünglich vorliegender RNA. Je mehr RNA also in der Probe initial vorhanden war, desto früher wird der Schwellenwert erreicht. Auf diese Weise lassen sich RNA-Mengen quantifizieren bzw. Genexpressions-Regulationsvorgänge erfassen. Nach Abschluss von 40 Zyklen PCR werden die Fluoreszenzsignale der Ziel-DNA zur Auswertung gegen die Fluoreszenzsignale eines konstitutiv und nicht durch die Experimente in seiner Expression verändertes sogenanntes Haushalts (Housekeeping)-Gen normiert. Bei den durchgeführten Versuchen wurde hierfür 18s-ribosomale RNA (kurz: 18s-RNA oder 18s) verwendet. Die Daten wurden mit der gerätespezifischen Software (Viia<sup>TM</sup>7) analysiert.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes je Well bestand aus 2,22 µl cDNA, 5,61 µl *Taqman<sup>TM</sup> Gene Expression Mastermix*, 2,83 µl DEPC-Wasser und 0,56 µl der jeweiligen Primer-Sonde. Pro Reaktionsansatz ergab dies 11,22 µl, wovon 10 µl in ein Well pipettiert wurden. Dieser Vorgang wurde für zwei weitere Wells wiederholt, sodass je Gen ein Triplet untersucht werden konnte. Alle Schritte beim Pipettieren erfolgten auf Eis.

Die Auswertung nach Ablauf der 40 PCR-Zyklen erfolgte nach der delta-delta-CT-Methode (Yuan et al. 2008). Hierzu wurde der  $\Delta$ CT-Wert durch Subtraktion des CT-Wertes des Housekeeping-Gens vom CT-Wert des Zielgens errechnet. Nach Bildung eines  $\Delta$ CT-Mittelwertes der Kontrollgruppen (sowohl von Janvier- als auch von Charles-River-Wildtyp-Mäusen) wurde dieser von den  $\Delta$ CT-Werten der jeweiligen Probe abgezogen und bildete den  $\Delta\Delta$ CT-Wert. Aus diesem ließ sich der Relative Quantifikations- (RQ-) Wert mit der Formel  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$  berechnen. Damit ließen sich nun die behandelten Gruppen untereinander sowie mit den Sham- und Kontrollgruppen vergleichen.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung und Analyse der Daten sowie graphischen Daten mittels MS Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) sowie Prism 5.0 for Mac OS X, Version 5.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

Um die Ergebnisse auszuwerten und graphisch darzustellen, wurde das Softwareprogramm Prism 5.0 for Mac OS X, Version 5.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Zur Auswertung der Daten erfolgte eine One-way bzw. repeated measure ANOVA mit anschließender Dunnett's, Tukey's bzw. Bonferroni's multiple comparison post-hoc Analyse für den Intergruppenvergleich. Für den Intragruppenvergleich beim Zeitpunkt T1 wurde eine repeated measure ANOVA mit anschließender Dunnett's multiple comparison post-hoc Analyse durchgeführt, beim Zeitpunkt T2 erfolgte ein paired, two-tailed Student's t-test. Der unpaired, two-tailed Student's t-Test wurde für den Vergleich einzelner Parameter zweier Behandlungsgruppen durchgeführt. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD). Für ein  $p < 0,05$  wurde ein signifikanter Unterschied angenommen.



## 2.7 Material

**Tab. 9:** Verwendete Geräte/Software nach Bezeichnung/Modell und Hersteller

Gerät/Software	Modell/Version	Hersteller (Standort)
MALDI-TOF-Identifizierung	VITEK MS/VITEK MS Aquisition Station Software V1; Shimadzu Biotech MALDI Solutions Microbial Identification Software V1	Biomérieux (Nürtingen, Deutschland)
NanoDrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Viiia7 Software	Viiia™7 Software Version 1.2	Applied Biosystems™ (Foster City, USA)
Temperatursonde	Rectal Probe "RET-3" for mouse	Physiotemp Instrumens INC (USA)
Thermometer	Homeothermic Controller Type 874	Hugo Sachs Elektronik GmbH (March, Deutschland)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vortex	Vortex-Genie2	Scientific Industries, INC. (Bohemia, USA)
Waage	Electronic Balance Type ABS 120-4	Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Thermo-Mixer	Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Thermocycler	T Gradient	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Homogenisator	IKA Ultra-Turrax®	IKA-Werke (Staufen, Deutschland)
Prism 5.0	Prism 5.0 for Mac OS X, Version 5.0c	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
pH-Meter	φ 340pH/Temp Meter	Beckman Coulter (Brea, USA)

MS Excel 2010	Microsoft Corp.	Redmond, WA, USA
---------------	-----------------	------------------

**Tab. 10.1:** Verwendete Labormaterialien nach Bezeichnung/Modell und Hersteller

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung/Modell</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>
CHROMagar™	CHROMagar MH Orientation	Mast diagnostica (Reinfeld, Deutschland)
Plastikösen	Inoculation Loop 10 µl, blau	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipetten	Eppendorf research 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	RNAse/DNAse, Pyrogen frei 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Maxymum Recovery™, VWR (Radnor, USA)
Reaktionsgefäße	Safe-Lock-Tubes 1,5 mL, 2,0 mL, PCR clean, steril	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	PCR-Tubes-02-C thin, clear wall, 0,2 ml	Axygen Coming Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)
	Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
384 Well Platte	384-well PCR-Platte 781347	Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)
Tupfer	Multitupfer	Nobamed Paul Danz GmbH & Co KG (Wetter, Deutschland)

**Tab. 11.2:** Verwendete Labormaterialien nach Bezeichnung/Modell und Hersteller

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung/Modell</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>
Mehrzwecktücher	zetBox <sup>®</sup>	ZVG Zellstoff-Vertriebs-GmbH & Co KG (Troisdorf, Deutschland)
OP-Besteck	Pinzetten, Scheren	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Spritzen steril	1 ml BD Plastipak <sup>™</sup> , 5 ml BD Discardit <sup>™</sup> II	Becton Dickinson (New Jersey, USA)
Handschuhe	Nitril Powder-Free Micro-Touch	Ansell (Richmond, AUS)
Kanülen	21 G BD Microlance <sup>™</sup> 3	Becton Dickinson (New Jersey, USA)
Multipipette	Matrix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Multipipettenspitzen	30 µl Non-Sterile	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

**Tab. 11:** Verwendete Reagenzien nach Bezeichnung und Hersteller

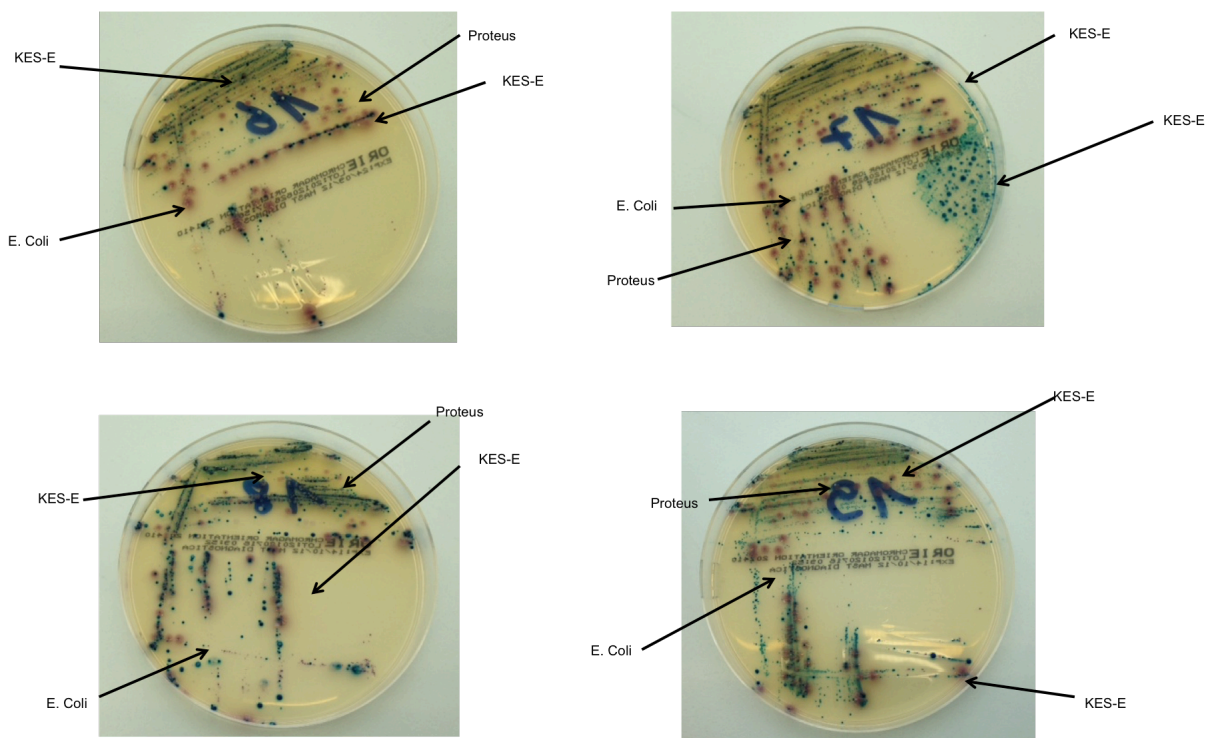
<b>Reagenzien</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GIT	Guanidine thiocyanate $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl	0,9 %, steril, 1000 ml	Braun AG (Melsungen, Deutschland)
RNAlater™	RNA Stabilization Reagent 250 ml	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Ethanol	70 %	Otto Fischar GmbH & Co KG (Saarbrücken, Deutschland)
Oberflächen- desinfektion	Freka®-NOL A-T	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT	reverse Transkriptase Puffer, dNTPs, Random Primer, Multi Scribe reverse Transkriptase	Applied biosystems (Foster City, USA)
PCR-Mastermix (2x)	TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Isopropanol	2-Propanol zur Analyse	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat	Natriumacetat	Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, USA)
Phenol	pH < 4,5	Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, USA)
Phenol-Chloroform- Isoamyl	25:24:1	Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, USA)
Eisessig	Essigsäure wasserfrei	Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, USA)
Buprenorphin	Temgesic™	Indivior UK Limited, Berkshire, UK

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Versuchsreihe Zeitpunkt T1

##### 3.1.1 Untersuchung der mikrobiellen Darmflora von C57BL/6N-Mäusen

Es wurden 8 Wochen alte männliche C57BL/6N-Mäuse (n = 20) von den Anbietern Charles River (CR), Janvier (J) und Harlan (H) durch zervikale Dislokation euthanasiert. Der Stuhl wurde aus dem Kolon gewonnen. Ein Ausstrich auf CHROMagar™ orientation medium erfolgte zur Differenzierung von *E. coli*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* und *Proteus* spp. Eine fünfte Gruppe wurde als "KES-E" bezeichnet. Zur Validierung der durch kulturelle Anzucht gewonnenen Ergebnisse erfolgte eine Analyse einzelner Proben aller Keimarten durch MALDI-TOF.

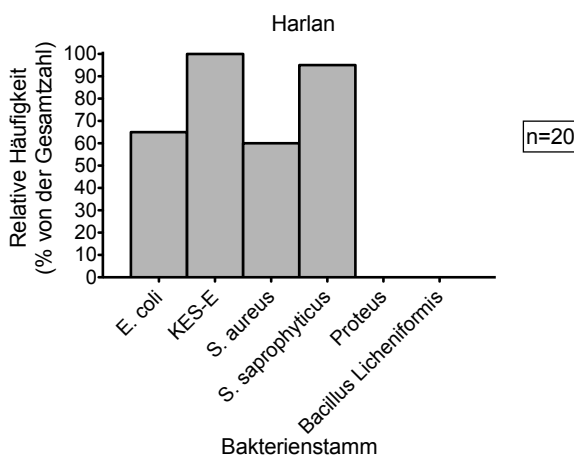
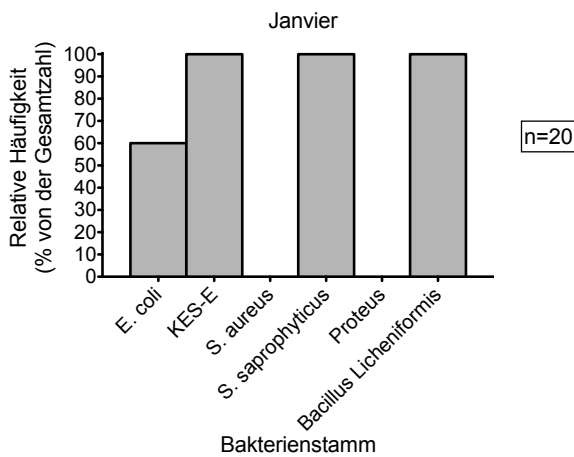
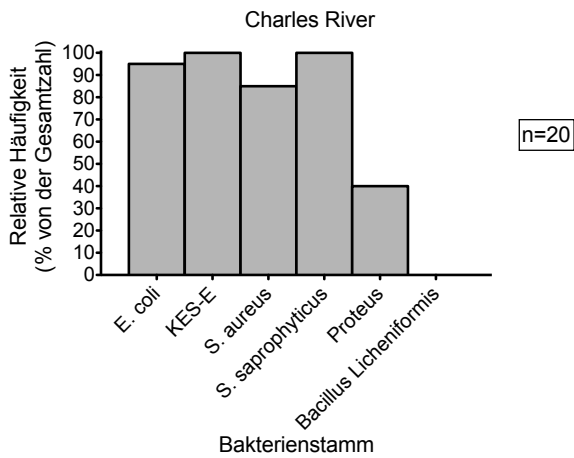


**Abb. 3:** Beispiele der Darstellungsmöglichkeit verschiedener Bakterienstämme auf dem CHROMagar™ orientation medium

Vertreter von KES-E und *S. saprophyticus* fanden sich fast bei allen Tieren. Unterschiede zeigten sich vor allem in der Verteilung der übrigen Bakteriengruppen. Konnte bei 17/20 Tieren (85 %) bei CR *S. aureus* nachgewiesen werden, so wiesen nur 12/20 Tiere (60 %) von H diesen Keim auf. Bei J konnte dieser Keim im Darm überhaupt

nicht nachgewiesen werden. *E. coli* wurde bei CR bei 19/20 Tieren (95 %) und bei J und H bei 12/20 bzw. 13/20 Tieren (60 bzw. 65 %) nachgewiesen. Bei allen Tieren von J zeigte sich ein Keim, der nicht durch seine Farbe auf dem Agar identifiziert werden konnte. Erst MALDI-TOF konnte hier den Nachweis von *Bacillus licheniformis* erbringen.

## Zeitpunkt der Erfassung 10/2012



**Abb. 4:** Bakterienstämme 10/2012

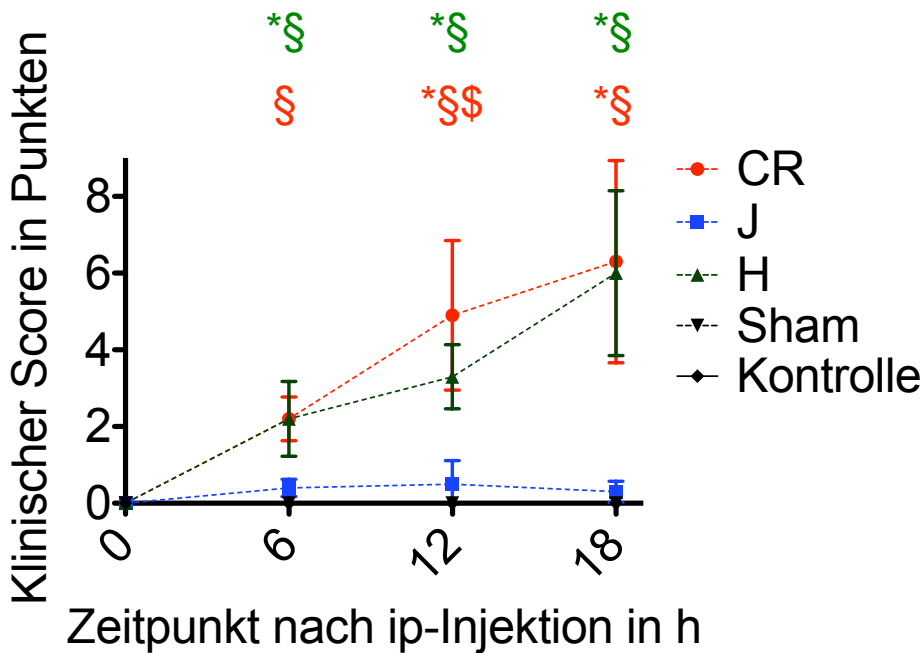
Relative Häufigkeit der Bakterienstämme in Stuhl von Mäusen der Anbieter Charles River, Janvier und Harlan während der Analyse im Oktober 2012.

(n = 20 für jeden Anbieter, E. coli = Escherichia coli, S. aureus = Staphylococcus aureus, S. saprophyticus = Staphylococcus saprophyticus, KES-E = "Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia und Enterokokken"-Gruppe)

### 3.1.2 Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf den Verlauf von Gewicht und Temperatur und den klinischen Score

Es konnten Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung der fäkalen Flora abhängig von der Herkunft des Spendertieres gezeigt werden. Um herauszufinden, ob diese Unterschiede die klinische Manifestation der durch IPSI ausgelösten Infektion beeinflussen, wurde der Stuhl der Spendertiere innerhalb eines Anbieters gepoolt, wie beschrieben aufbereitet und intraperitoneal in Empfängertiere eines Anbieters (CR) (n = 5 je Spendergruppe) injiziert. Es wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 18 Stunden nach Injektion das Gewicht, die Temperatur und der klinische Score protokolliert. Zu Beginn des Experiments zeigten alle Tiere normwertige Gewichts- und Temperaturwerte sowie ein unauffälliges (gesundes) klinisches Erscheinungsbild (klinischer Score = 0). Im gesamten Beobachtungszeitraum nach IPSI-Induktion waren bei den Sham- und Kontroll-Mäusen weder der klinische Score (Zusammensetzung aus Körperhaltung, Bewegung/Verhalten und Körperpflege) noch Temperatur oder Gewicht signifikant verändert. Die klinische Erscheinung von Mäusen, welchen Stuhl der Anbieter CR oder H injiziert wurde, verschlechterte sich demgegenüber rasch (Abb. 5). Dies zeigte sich in dem bereits nach 12 Stunden signifikant erhöhten klinischen Score (\* CR 12 h  $4,9 \pm 1,949$  vs. CR 0 h 0, \* H 12 h  $3,3 \pm 0,837$  vs. H 0 h 0, J 12 h  $0,5 \pm 0,612$  vs. J 0 h 0, \*  $p < 0,05$  Dunnett's multiple comparison test). 40 % (CR) bzw. 20 % (H) der Mäuse erreichten zudem das Ende der Observations-Periode nicht. Zudem wiesen die klinischen Scores von CR- und H-Mäusen im Verlauf eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den J-Mäusen auf (§ CR 18 h  $6,3 \pm 2,636$  und § H 18 h  $6 \pm 2,151$  vs. J 18 h  $0,3 \pm 0,274$ , §  $p < 0,05$  Bonferroni's multiple comparison test).



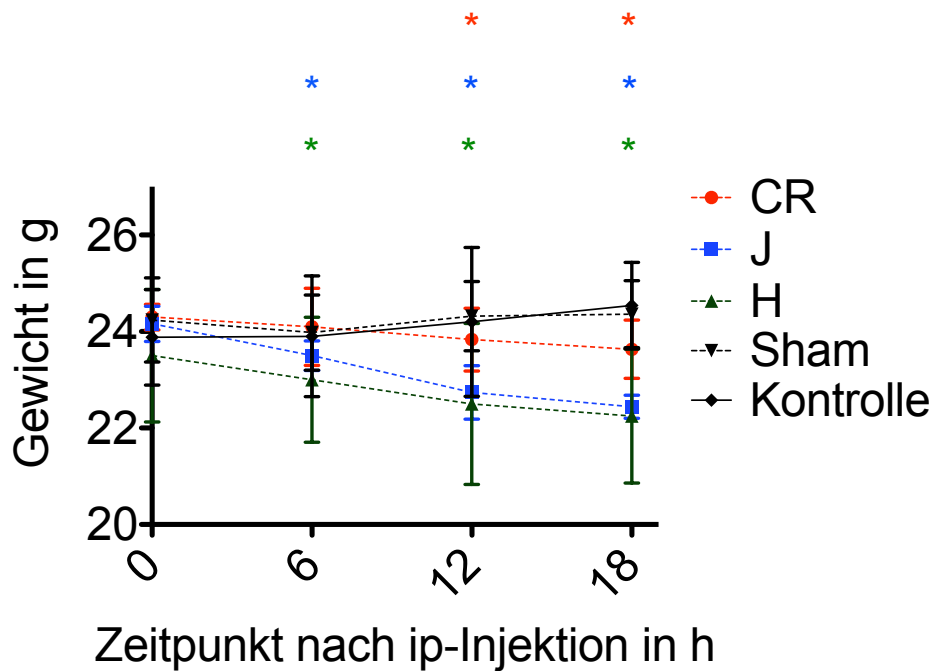


**Abb. 5:** Klinischer Score zum Zeitpunkt T1

Dargestellt ist der klinische Score (Körperhaltung, Bewegung/Verhalten, Körperpflege), erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot), J (blau) und H (grün) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 18 Stunden nach IPSI.

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, repeated measure ANOVA, \* p < 0,05 (vs. 0 h Zeitpunkt, Dunnett's multiple comparison test), § p < 0,05 (vs. J, Tukey's multiple comparison test), \$ p < 0,05 (vs. H, Bonferroni's multiple comparison test))

Das Körpergewicht zeigte sich in allen Behandlungsgruppen signifikant fallend (\* CR 0 h  $24,3 \pm 0,265$  g vs. CR 18 h  $23,633 \pm 0,603$  g; J 0 h  $24,16 \pm 0,365$  g vs. J 18 h  $22,44 \pm 0,241$  g; H 0 h  $23,5 \pm 1,374$  g vs. H 18 h  $22,25 \pm 1,387$  g, \* p < 0,05, Dunnett's multiple comparison test). In der Kontroll- und Sham-Gruppe kam es hingegen zu einer tendenziellen Gewichtszunahme (Sham 0 h  $25,24 \pm 0,973$  g vs. Sham 18 h  $24,36 \pm 0,695$  g, Kontrolle 0 h  $23,88 \pm 0,988$  vs. Kontrolle 18 h  $24,54 \pm 0,896$  g) (Abb. 6).

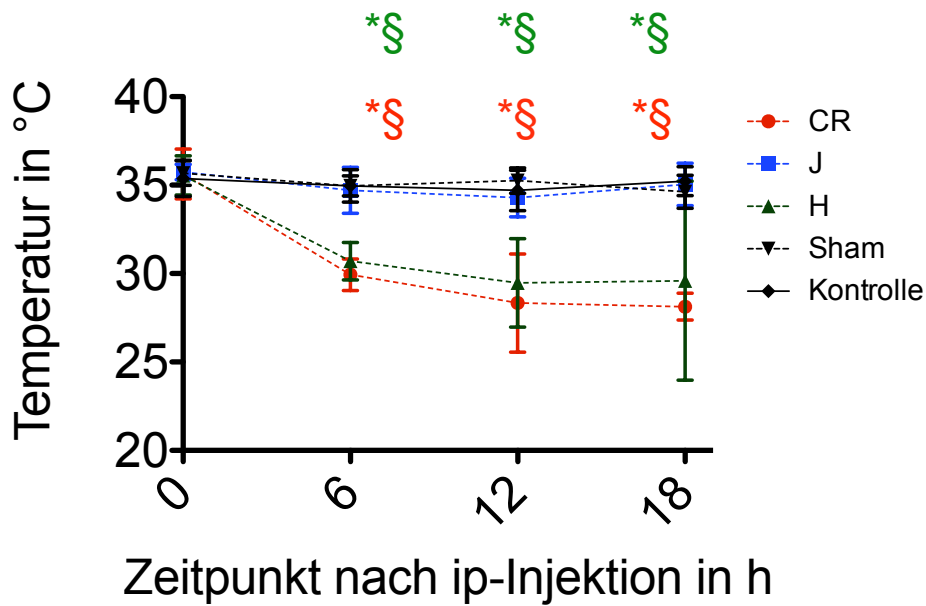


**Abb. 6:** Gewichtsverlauf zum Zeitpunkt T1

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf, erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot), J (blau) und H (grün) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 18 Stunden nach IPSI.

(J, Sham, Kontrolle n = 5, H n = 4, CR n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, repeated measure ANOVA, \* p < 0,05 (vs. 0 h Zeitpunkt, Dunnett's multiple comparison test))

In der Gruppe der Tiere, welche Stuhl von J-Spendern injiziert bekamen, zeigte sich keine signifikante Änderung der rektal gemessenen Körpertemperatur (J 0 h  $35,74 \pm 0,434$  °C vs. J 18 h  $35,04 \pm 1,203$  °C) (Abb. 7). Im Gegensatz dazu entwickelte sich bei mit CR- und H-Stuhl behandelten Mäusen innerhalb von 6 Stunden eine signifikante Hypothermie (\* CR 0 h  $35,633 \pm 1,415$  °C vs. CR 6 h  $29,933 \pm 0,896$  °C, \* H 0 h  $35,55 \pm 1,112$  °C vs. H 6 h  $30,7 \pm 1,055$  °C, \* p < 0,05 Dunnett's multiple comparison test).



**Abb. 7:** Temperaturverlauf zum Zeitpunkt T1

Dargestellt ist der Temperaturverlauf, erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot), J (blau) und H (grün) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 18 Stunden nach IPSI.

(J, Sham, Kontrolle n = 5, H n = 4, CR n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, repeated measure ANOVA, \*  $p < 0,05$  (vs. 0 h Zeitpunkt, Dunnett's multiple comparison test), §  $p < 0,05$  (vs. J, Bonferroni's multiple comparison test))

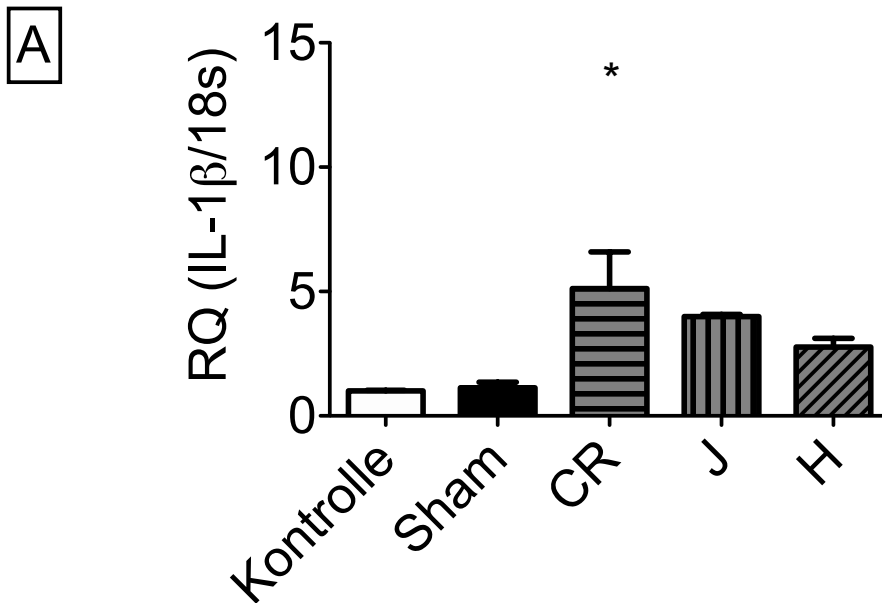
### 3.1.3 Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf molekulare Marker der Inflammation

Am Ende der Observations-Periode wurden die Tiere euthanasiert, mRNA aus den Milzen extrahiert und die Zytokinexpression mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie die Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 analysiert (Abb. 8-12). Verglichen mit den Kontroll-Tieren gab es bei den Sham-Tieren in allen untersuchten Genen keine signifikanten Abweichungen. Bei den Zytokinen zeigten sich bei TNF- $\alpha$  sowohl bei Sham- als auch bei J- und H-Tieren diskrete, jedoch nicht signifikante Steigerungen der Expression (Sham  $1,405 \pm 0,492$ , J  $1,755 \pm 0,2862$ , H  $1,717 \pm 0,6975$ ). Bei den weiteren Zytokinen kam es bei CR zu einer signifikanten Steigerung gegenüber Sham-Tieren (IL-1 $\beta$ : CR  $5,118 \pm 3,3$  vs. Sham  $1,135 \pm 0,3760$ ,  $p < 0,05$ , Dunnett's multiple comparison test und IL-6: CR  $579,6 \pm 463,4$  vs. Sham  $1,216 \pm 0,3211$ ,  $p < 0,05$ , Dunnett's multiple comparison test). Bei H kam es nur bei IL-6 zu einer signifikanten Steigerung (H  $750,5 \pm 256,6$  vs.

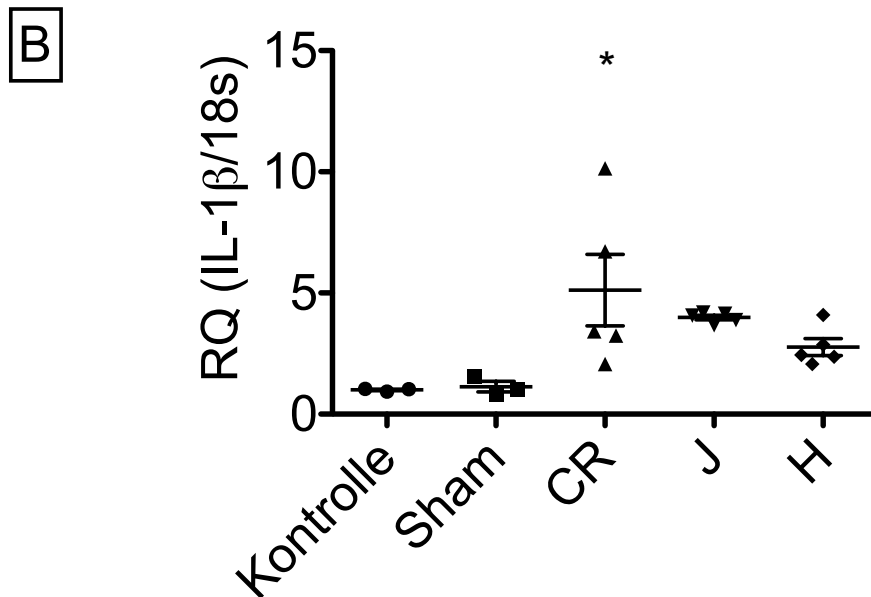
Sham  $1,216 \pm 0,3211$ ,  $p < 0,05$ , Dunnett's multiple comparison test). Bei J kam es bei den Zytokinen zu keinen signifikanten Änderungen (IL-1 $\beta$ : J  $3,99 \pm 0,2146$  vs. Sham  $1,135 \pm 0,3760$ ; IL-6: J  $57,09 \pm 9,023$  vs. Sham  $1,216 \pm 0,3211$ ; TNF- $\alpha$  J  $1,755 \pm 0,2862$  vs Sham  $1,405 \pm 0,492$ ). Im Vergleich zu der J-Gruppe zeigten sich bei der Expression von IL-6 bei CR und H ebenfalls signifikante Steigerungen (CR  $579,6 \pm 463,4$  und H  $750,5 \pm 256,6$  vs. J  $57,09 \pm 9,023$ ,  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test).

Das Expressionsmuster von TLR-4 verhielt sich eher umgekehrt zur Expression der Zytokine. Hier kam es zu einer Herabregulation des Rezeptors bei CR- und H-Mäusen im Vergleich zu Sham- und J-Mäusen (\* CR  $0,457 \pm 0,152$  und \* H  $0,3082 \pm 0,07088$  vs. Sham  $1,262 \pm 0,587$ , \*  $p < 0,05$ , Dunnett's multiple comparison test, § CR und § H vs. J  $1,074 \pm 0,1146$ , §  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test). Die Expression von TLR-2 ist in der Tendenz mit der von IL-1 $\beta$  vergleichbar (J  $1,486 \pm 0,1636$  und CR  $1,613 \pm 0,2794$  vs. H  $0,9909 \pm 0,1978$ ,  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test).

## IL-1 $\beta$ Expression in der Milz



## IL-1 $\beta$ Expression in der Milz



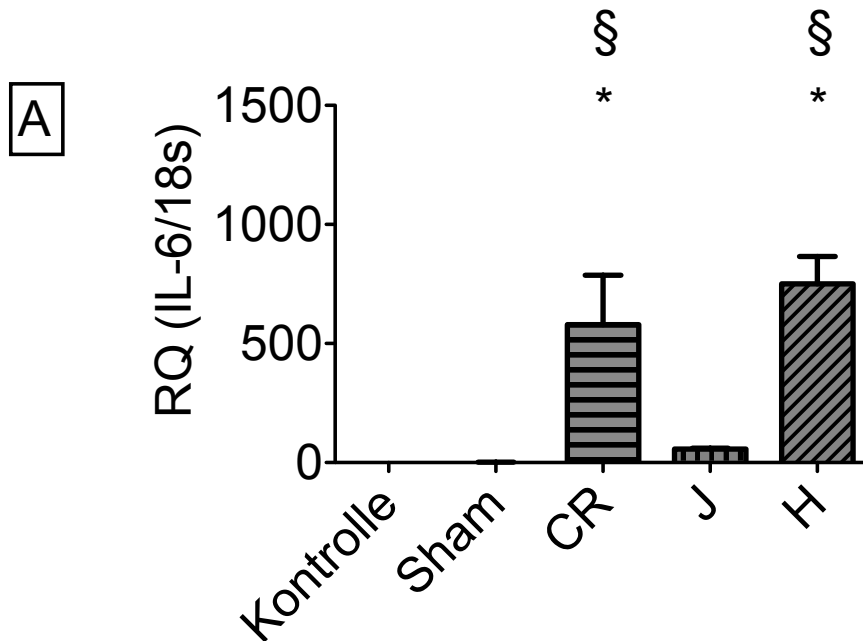
**Abb. 8:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von IL-1 $\beta$  in der Milz 18 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IL-1 $\beta$ /18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

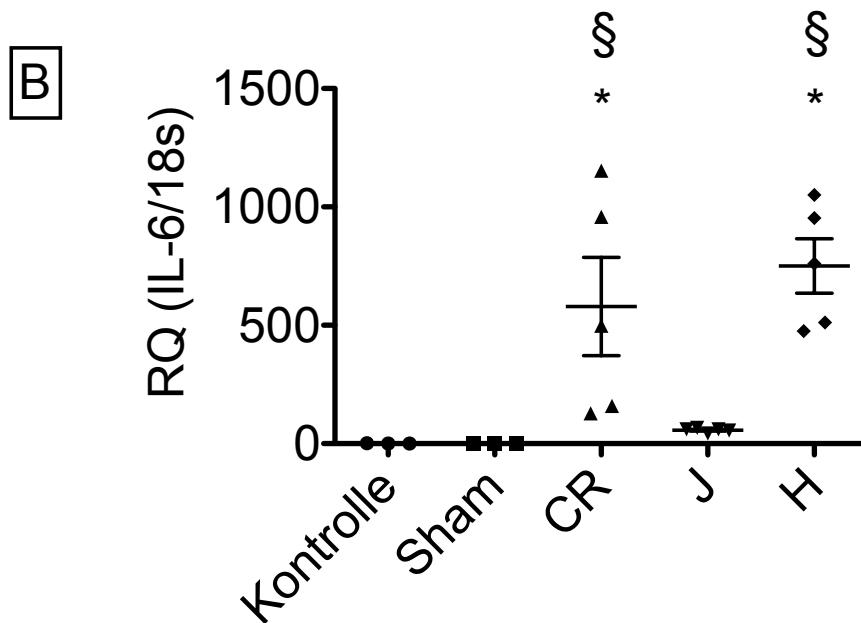
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Kontrolle und Sham n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Dunnett's multiple comparison test)

## IL-6 Expression in der Milz



## IL-6 Expression in der Milz



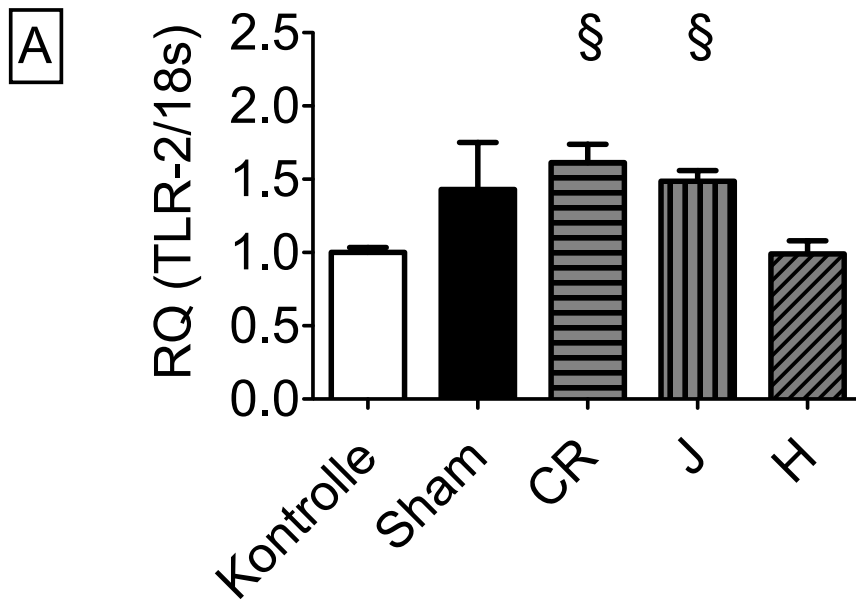
**Abb. 9:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von IL-6 in der Milz 18 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IL-6/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

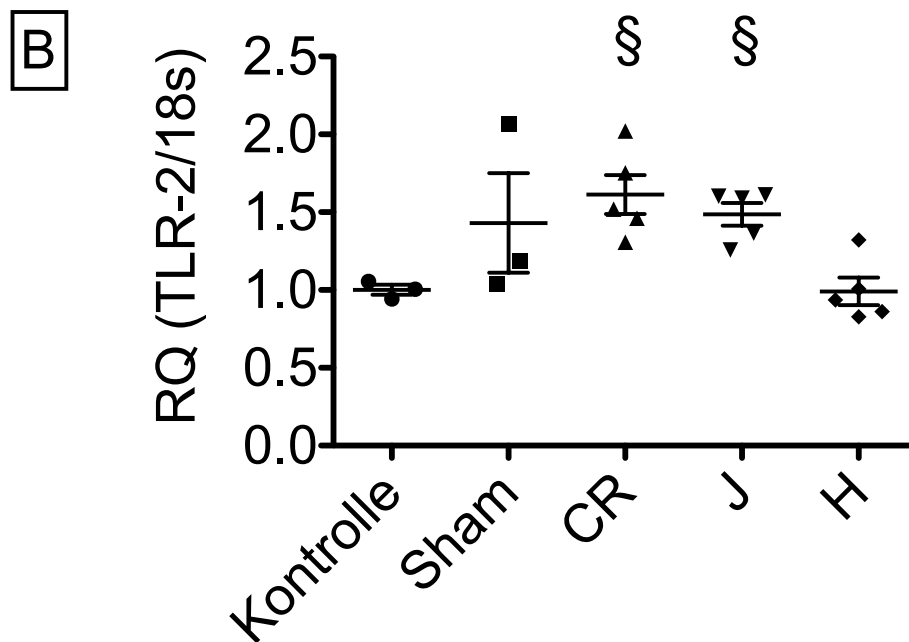
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Kontrolle und Sham n = 3, Mittelwert ± SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham, Dunnett's multiple comparison test), § p < 0,05 (vs. J, Tukey's multiple comparison test))

## TLR-2 Expression in der Milz



## TLR-2 Expression in der Milz



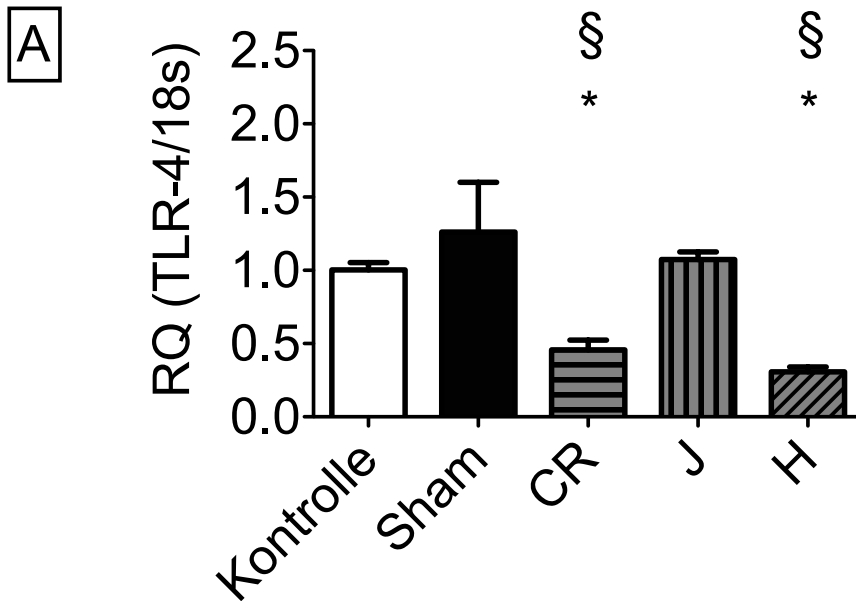
**Abb. 10:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TLR-2 in der Milz 18 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen-18s (TLR-2/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

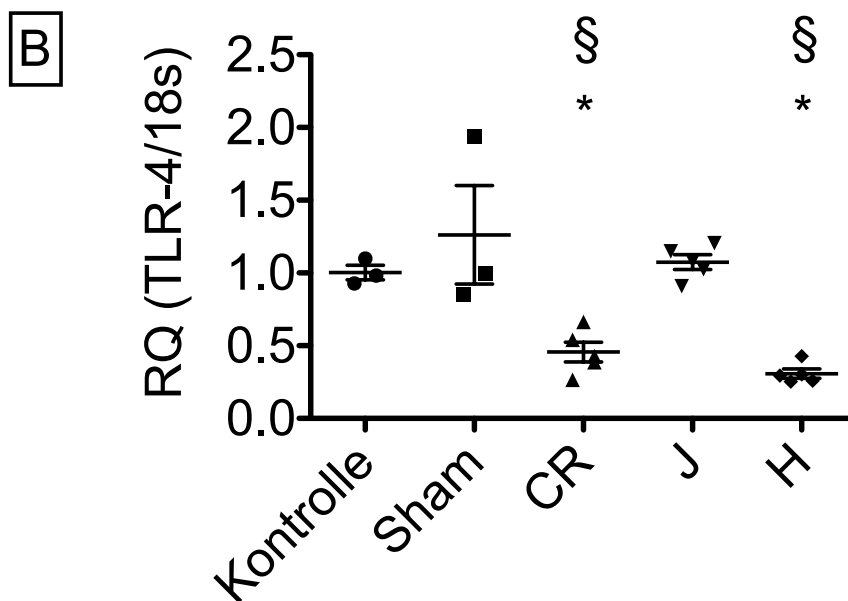
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Kontrolle und Sham n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, § p < 0,05 (vs. H, Tukey's multiple comparison test))

## TLR-4 Expression in der Milz



## TLR-4 Expression in der Milz



**Abb. 11:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TLR-4 in der Milz 18 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TLR-4/18s).

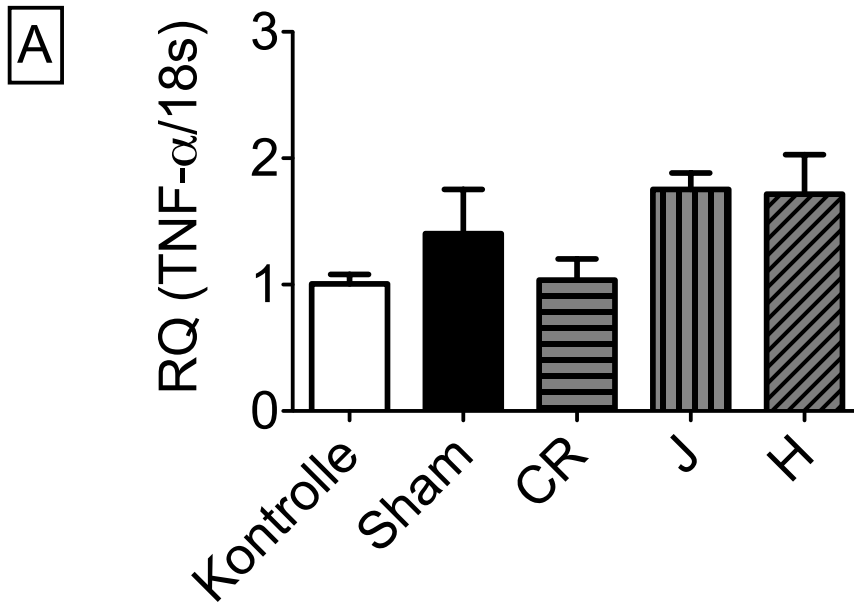
A) Dargestellt als Säulendiagramm

B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

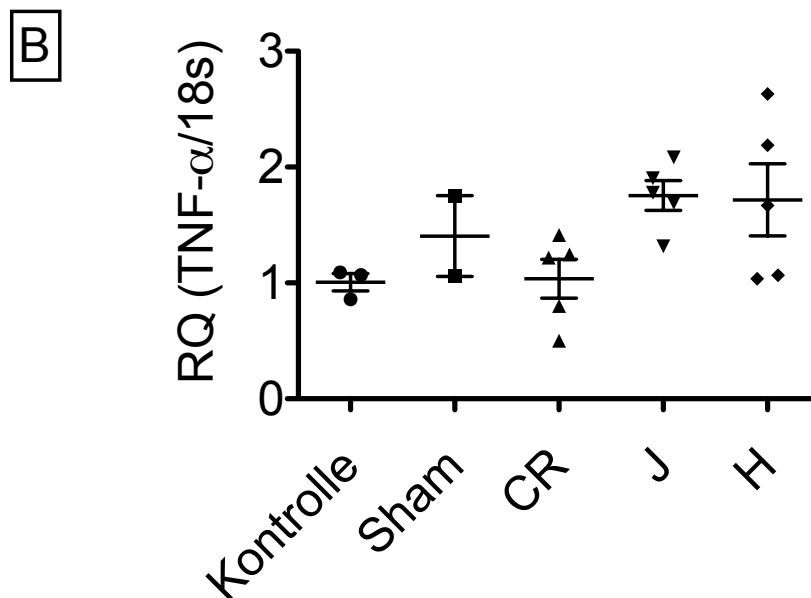
(n = 5, Kontrolle und Sham n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham, Dunnett's multiple comparison test), § p < 0,05 (vs. J, Tukey's multiple comparison test))



## TNF- $\alpha$ Expression in der Milz



## TNF- $\alpha$ Expression in der Milz



**Abb. 12:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TNF- $\alpha$  in der Milz 18 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TNF- $\alpha$ /18s).

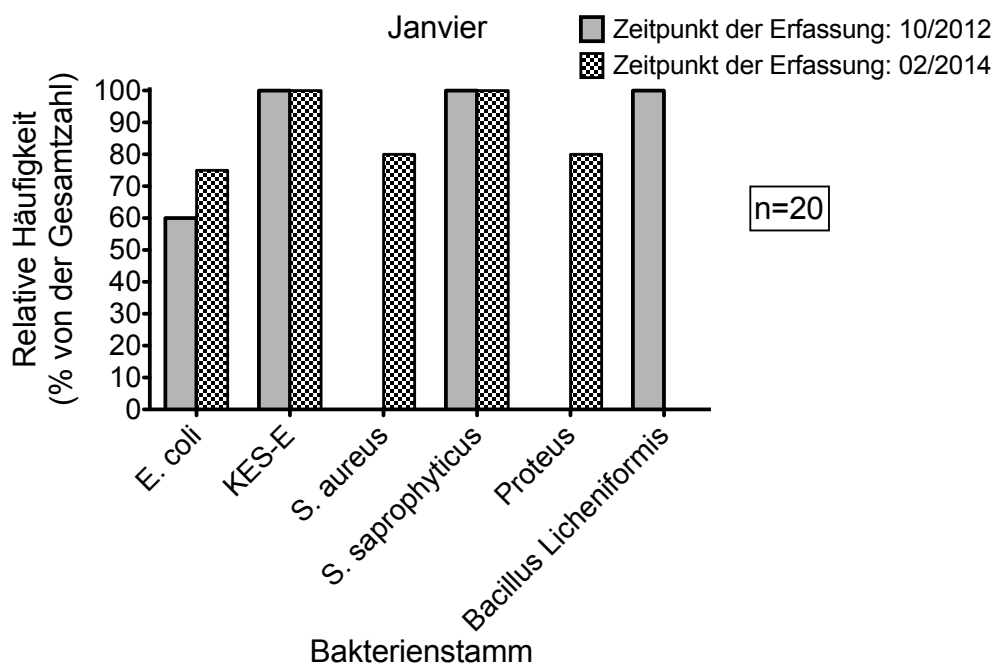
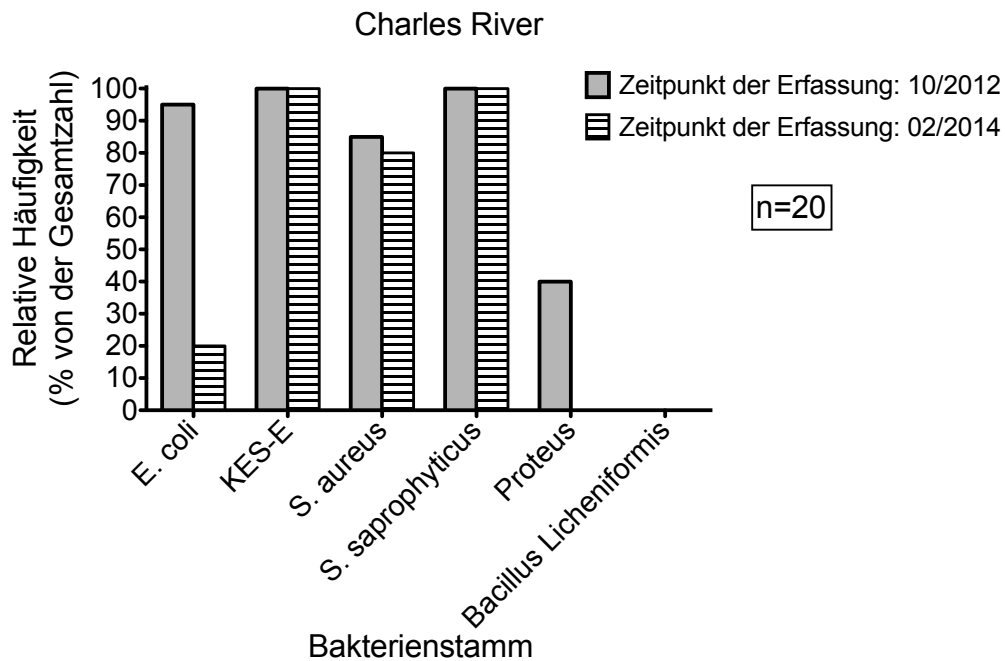
A) Dargestellt als Säulendiagramm

B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

## **3.2 Versuchsreihe Zeitpunkt T2**

### **3.2.1 Veränderungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora von C57BL/6N-Mäusen im zeitlichen Verlauf**

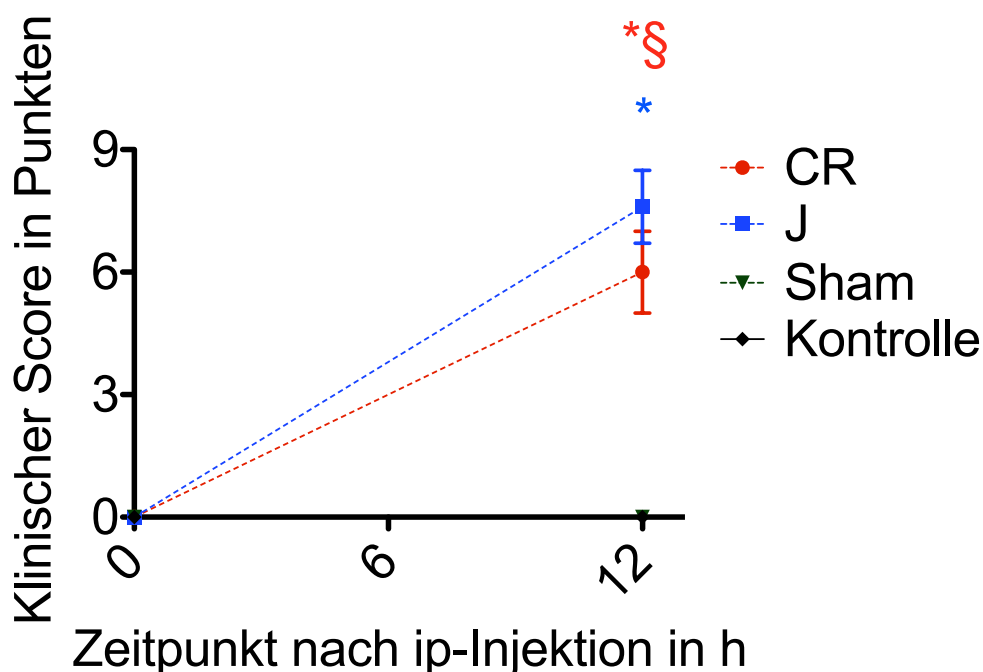
Zur Überprüfung der Stabilität der experimentellen Bedingungen im zeitlichen Verlauf wurden Stuhlextraktion und die Injektionsversuche 16 Monate nach den initialen Experimenten wiederholt. Aufgrund der vor allem bei CR und J auffälligen klinischen Unterschiede und des ähnlichen klinischen Verlaufs von CR und H wurden im Rahmen dieser zweiten Untersuchungsperiode Stuhlproben nur von CR- und H-Tieren gewonnen. Die kulturellen Untersuchungen zeigten eine deutliche Veränderung der bakteriellen Stuhlzusammensetzung über die Zeit (Abb. 13). Es fanden sich sowohl in CR- als auch in J-Mäusen *E. coli*, *KES-E* und *S. saprophyticus*. Jedoch zeigte sich *E. coli* aktuell nur in 4/20 (20 %) aller CR-Mäuse. 16 Monate zuvor lag dieser Anteil noch bei 19/20 (95 %). In beiden Gruppen konnte nun bei jeweils 16/20 Tieren (80 %) *S. aureus* nachgewiesen werden. Ein Nachweis von *Bacillus licheniformis* bei den J-Mäusen war nun jedoch nicht mehr möglich. Dort konnte zudem *Proteus* spp. nachgewiesen werden, wohingegen bei CR im Vergleich zu den Versuchen vor 16 Monaten kein Nachweis dieses Bakteriums gelang.



**Abb. 13:** Bakterienstämme zu den Zeitpunkten 10/2012 und 02/2014  
 Relatives Vorkommen der Bakterienstämme in Stuhl von Mäusen der Anbieter Charles River und Janvier während der Analysen im Oktober 2012 und im Februar 2014.  
 (n = 20 für jeden Anbieter, E. coli = Escherichia coli, S. aureus = Staphylococcus aureus, S. saprophyticus = Staphylococcus saprophyticus, KES-E = "Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia spp. und Enterokokken"-Gruppe)

### 3.2.2 Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf den Verlauf von Gewicht und Temperatur und den klinischen Score

Dieser Versuch wurde als Wiederholung der oben dargestellten Versuche durchgeführt. Im Unterschied dazu erfolgte die Injektion mit frischem Stuhl. Auf ein Einfrieren der Stuhlproben bei  $-80\text{ °C}$  wurde aus Gründen der Praktikabilität verzichtet. CR-Mäuse wurden mit gepooltem Stuhl behandelt und nach 12 Stunden euthanasiert. Auf die Erhebungen zu den Zeitpunkten 6 und 18 Stunden nach Injektion wurde verzichtet. Die Injektion von Stuhl mit dem im Vergleich zur Voruntersuchung veränderten mikrobiellen Profil zeigte auch eine Veränderung der klinischen Manifestation im Vergleich zu den Versuchen 16 Monate zuvor (Abb. 14). Die Injektion von J-Stuhl führte nun zu ähnlich großer klinischer Verschlechterung wie die Injektion von CR-Stuhl (J 12 h  $7,6 \pm 0,894$  vs. CR 12 h  $6 \pm 1$ ,  $p < 0,05$ , Bonferroni's multiple comparison test). Nach 12 Stunden war der klinische Score von J-Spendermäusen signifikant erhöht zu CR-Spendermäusen.

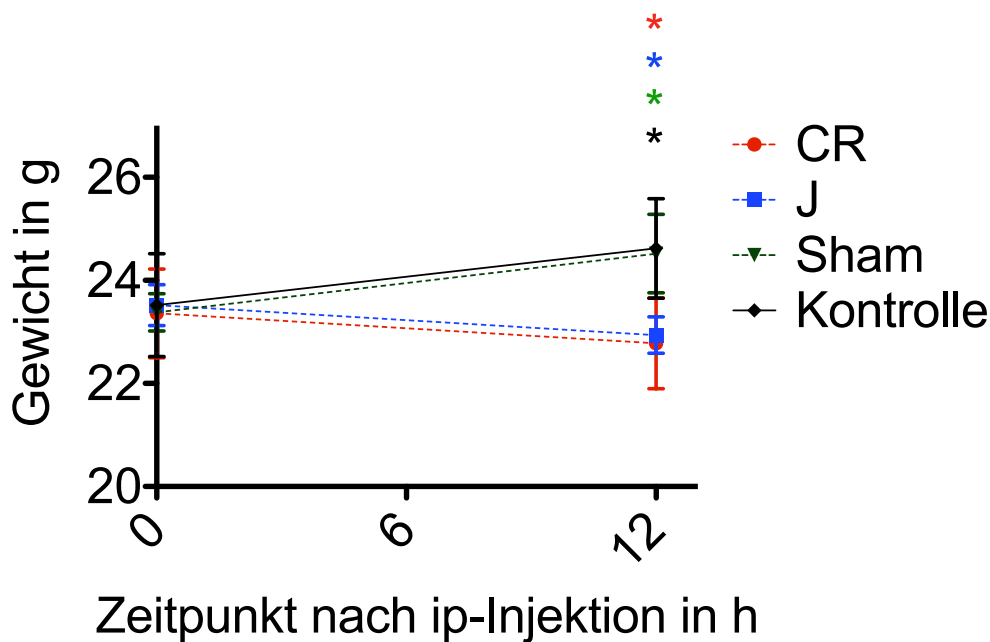


**Abb. 14:** Klinischer Score zum Zeitpunkt T2

Dargestellt ist der klinische Score (Körperhaltung, Bewegung/Verhalten, Körperpflege), erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot) und J (blau) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0 und 12 Stunden nach IPSI.

( $n = 5$ , Mittelwert  $\pm$  SD, paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$  (vs. 0 h Zeitpunkt), repeated measure ANOVA, §  $p < 0,05$  (vs. J, Bonferroni's multiple comparison test))

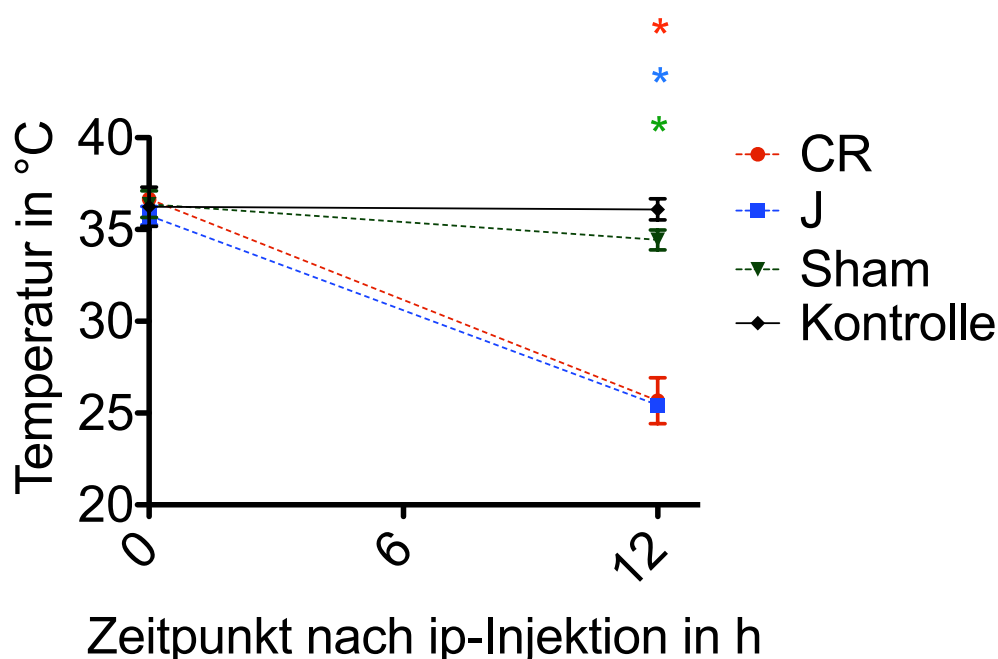
Das Körpergewicht zeigte bei CR- und J-Mäusen eine signifikante Gewichtsabnahme (CR 0 h  $23,6 \pm 0,862$  g vs. CR 12 h  $22,78 \pm 0,879$  g, J 0 h  $23,52 \pm 0,396$  g vs. J 12 h  $22,94 \pm 0,351$  g, paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$ ). In der Sham- und Kontroll-Gruppe kam es hingegen zu einer signifikanten Gewichtszunahme (Sham 0 h  $23,38 \pm 0,363$  g vs. Sham 12 h  $24,52 \pm 0,763$  g, Kontrolle 0 h  $23,52 \pm 0,998$  g vs. Kontrolle 12 h  $24,62 \pm 0,965$  g, paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$ ). Signifikante Intergruppenunterschiede zwischen CR und J zeigten sich jedoch nicht (Abb. 15).



**Abb. 15:** Gewichtsverlauf zum Zeitpunkt T2

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf, erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot) und J (blau) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0 und 12 Stunden nach IPSI. (n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$  (vs. 0 h Zeitpunkt))

Die Körpertemperatur zeigte sich 12 Stunden nach IPSI signifikant zu den jeweiligen Werten bei Versuchsbeginn erniedrigt. Bei beiden Versuchsgruppen betrug die Temperatur nach 12 Stunden etwa  $26^\circ\text{C}$  bei Ausgangswerten von etwa  $36^\circ\text{C}$  (\* CR 0 h  $36,66 \pm 0,378^\circ\text{C}$  vs. CR 12 h  $25,68 \pm 1,252^\circ\text{C}$ , \* J 0 h  $35,76 \pm 0,498^\circ\text{C}$  vs. J 12 h  $25,44 \pm 0,167^\circ\text{C}$ , paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$ ). Die Sham-Gruppe zeigte ebenfalls einen signifikanten Temperaturverlust (Sham 0 h  $36,38 \pm 0,726^\circ\text{C}$  vs. Sham 12 h  $34,44 \pm 0,541^\circ\text{C}$ , paired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$ ) Die Temperaturen in der Kontroll-Gruppe waren über den Beobachtungszeitraum konstant (Kontrolle 0 h  $36,24 \pm 1,064^\circ\text{C}$  vs. Kontrolle 12 h  $36,1 \pm 0,579^\circ\text{C}$ ) (Abb. 16).



**Abb. 16:** Temperaturverlauf zum Zeitpunkt T2

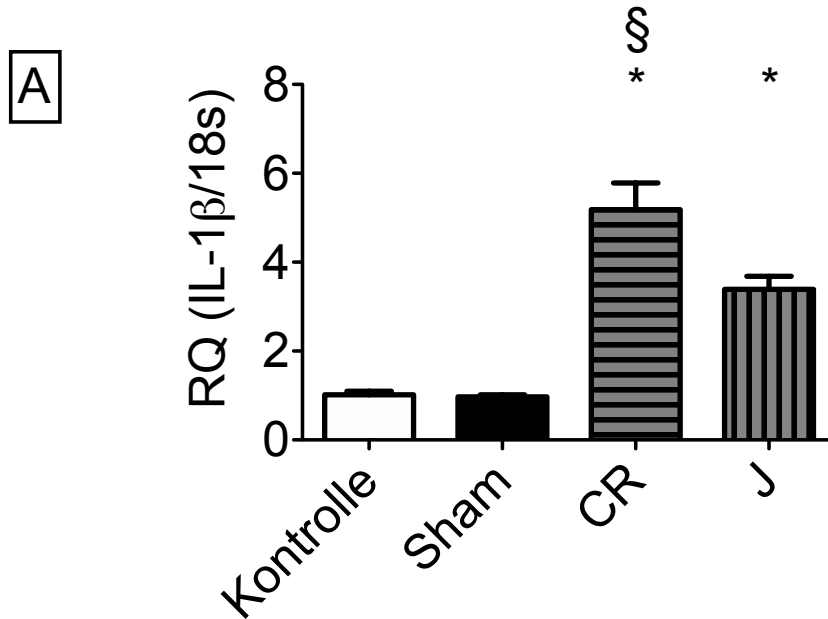
Dargestellt ist der Temperaturverlauf, erhoben an Tieren, die intraperitoneal Stuhl von CR (rot) und J (blau) injiziert bekamen zu den Zeitpunkten 0 und 12 Stunden nach IPSI. (n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, paired, two-tailed Student's t-test, \* p < 0,05 (vs. 0 h Zeitpunkt))

### 3.2.3 Auswirkungen der intraperitonealen Stuhlinjektionen auf molekulare Marker der Inflammation

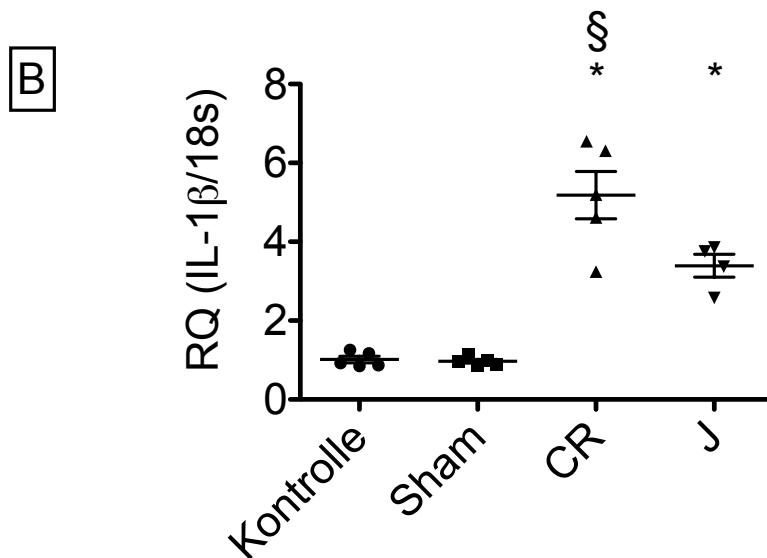
Nach 12 Stunden erfolgte im Anschluss an die oben beschriebene Datenerfassung die Euthanasierung mit anschließender quantitativer RT-PCR aus Milzgewebe. Wie in dem vorherigen Versuch zeigte sich auch hier eine signifikante Erhöhung von IL-1 $\beta$  bei CR-Mäusen gegenüber Tieren der Sham-Gruppe (CR  $5,184 \pm 1,345$  vs. Sham  $0,968 \pm 0,1066$ , p < 0,05, Tukey's multiple comparison test). Zudem war die Erhöhung signifikant gegenüber J-Mäusen (CR  $5,184 \pm 1,345$  vs. J  $3,393 \pm 0,5815$ , p < 0,05, Tukey's multiple comparison test). Aber auch die Expression bei J-Mäusen war nun signifikant erhöht gegenüber Sham-Mäusen (J  $3,393 \pm 0,5815$  vs. Sham  $0,968 \pm 0,1066$ , p < 0,05, Tukey's multiple comparison test) (Abb. 17). Die Expression von IL-6 war ebenfalls bei CR- und J-Stuhl injizierten Mäusen signifikant gegenüber den Sham-Tieren erhöht (\* CR  $124,6 \pm 49,59$ , \* J  $143,1 \pm 43,69$  vs. Sham  $1,11 \pm 0,4189$ , \* p < 0,05, Tukey's multiple comparison test). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen zeigte sich hier nicht, jedoch war die Expression bei J-Mäusen in der Tendenz höher als bei CR-Mäusen (Abb. 18). Ähnliches konnte bei der Expression von IL-10 gezeigt werden

(\*CR  $95,19 \pm 29,02$ , \* J  $94,77 \pm 22,9$  vs. Sham  $1,662 \pm 0,2445$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test) (Abb. 19). Im Gegensatz zum Vorversuch zeigte sich die Expression von TNF- $\alpha$  nun bei J-Mäusen signifikant sowohl zu CR- als auch zu Sham-Mäusen erhöht (\* J  $2,25 \pm 0,9581$  vs. CR  $0,66 \pm 0,1509$  vs. Sham  $0,728 \pm 0,1013$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test) (Abb. 23). Zeigte sich die Expression von TLR-2 im Vorversuch noch nicht signifikant gegenüber Sham-Mäusen erhöht, konnte nun ebendies nachgewiesen werden (\* CR  $2,066 \pm 0,3747$ , \* J  $2,27 \pm 0,4807$  vs. Sham  $1,264 \pm 0,1292$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test). Bei J-Tieren lag die Expression zwar höher als bei CR-Tieren, eine Signifikanz zeigte sich jedoch nicht (Abb. 20). Bei der Expression von TLR-4 gab es bei J-Tieren im Vorversuch nur eine geringe Herabregulation. Im aktuellen Versuch hingegen war die Herabregulation deutlicher als bei CR-Mäusen. Die Expression von TLR-4 war nun sowohl von CR- als auch J-Tieren signifikant gegenüber der bei den Sham-Tieren erniedrigt (\* CR  $0,224 \pm 0,03782$ , \* J  $0,124 \pm 0,01517$  vs. Sham  $1,176 \pm 0,09397$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test) (Abb. 21). Bei der Expression von TLR-9 zeigten sich ebenfalls signifikante Herabregulationen beider Behandlungsgruppen gegenüber Sham-Mäusen (\* CR  $0,256 \pm 0,04775$ , \* J  $0,426 \pm 0,1232$  vs. Sham  $0,778 \pm 0,1055$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test) (Abb. 22). In Ergänzung zu den im Rahmen der initialen Versuchsreihe untersuchten Proteinexpressionsmustern erfolgte neben der Bestimmung von TLR-9 auch eine Bestimmung der Interferone  $\beta$  und  $\gamma$ . Bei der Betrachtung dieser zeigte sich wie bei TNF- $\alpha$  eine signifikante Erhöhung der Expression von J-Mäusen gegenüber CR- und Sham-Mäusen (\* J IFN- $\beta$   $98,46 \pm 39,66$  vs. CR IFN- $\beta$   $15,39 \pm 5,03$  vs. Sham IFN- $\beta$   $6,913 \pm 5,921$ , \* J IFN- $\gamma$   $8,83 \pm 6,637$  vs. CR IFN- $\gamma$   $1,5 \pm 0,722$  vs. Sham IFN- $\gamma$   $1,466 \pm 0,2336$ , \*  $p < 0,05$ , Tukey's multiple comparison test) (Abb. 24/25).

## IL-1 $\beta$ Expression in der Milz



## IL-1 $\beta$ Expression in der Milz



**Abb. 17:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-1 $\beta$  in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IL-1 $\beta$ /18s).

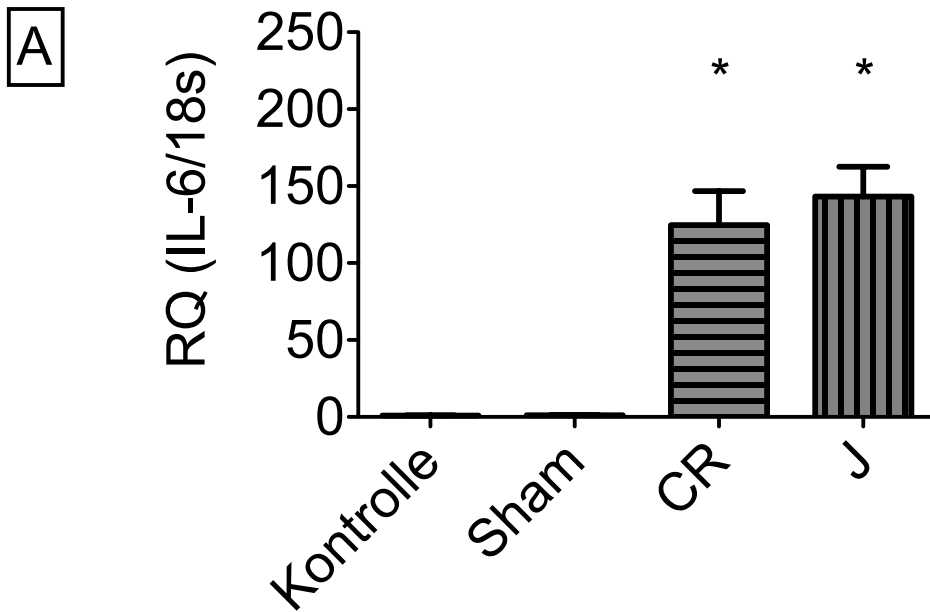
A) Dargestellt als Säulendiagramm

B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

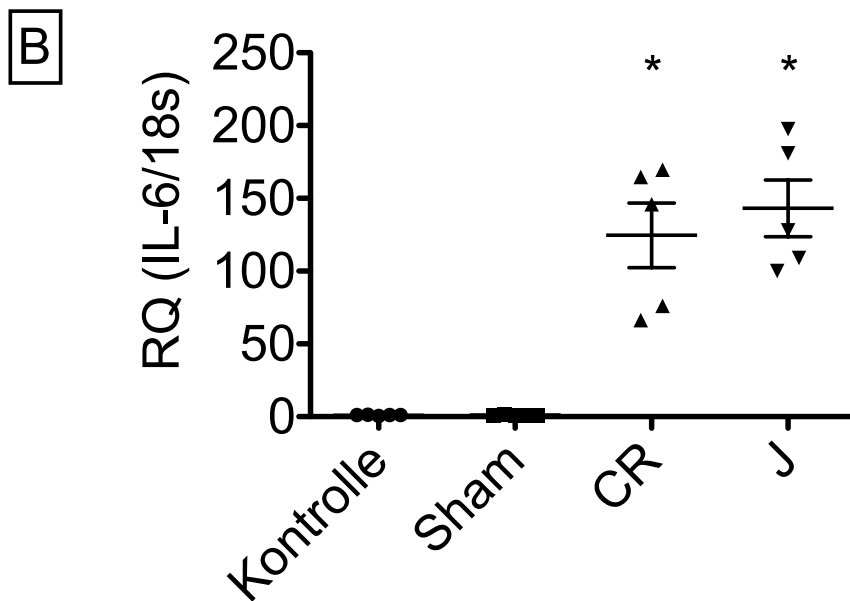
(n = 5, J group n = 4, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), § p < 0,05 (vs. J group), Tukey's multiple comparison test)



## IL-6 Expression in der Milz



## IL-6 Expression in der Milz



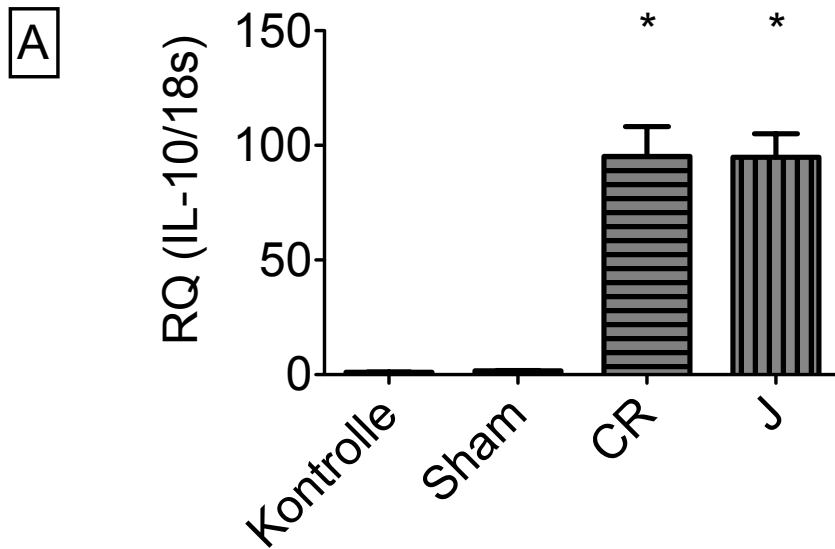
**Abb. 18:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-6 in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IL-6/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

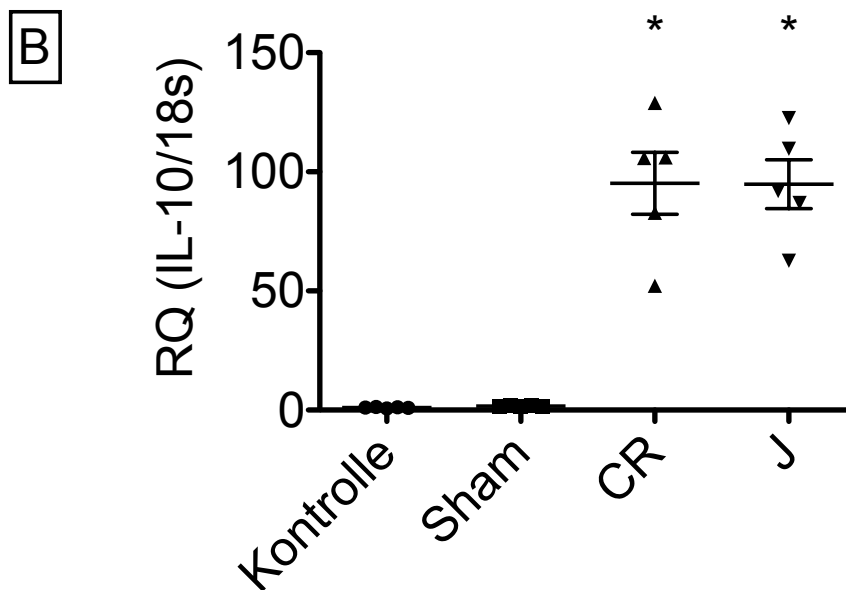
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Tukey's multiple comparison test)

## IL-10 Expression in der Milz



## IL-10 Expression in der Milz



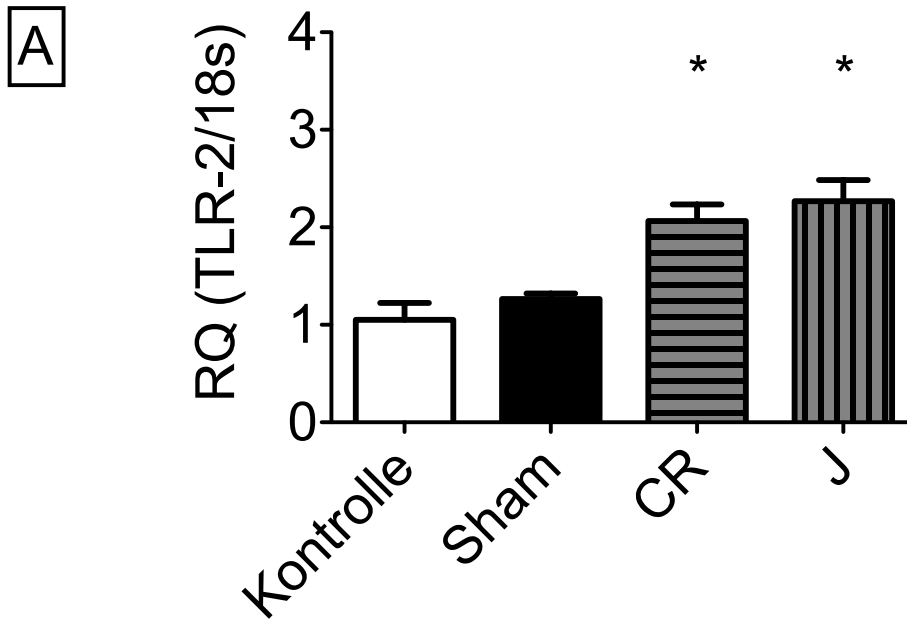
**Abb. 19:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-10 in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IL-10/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

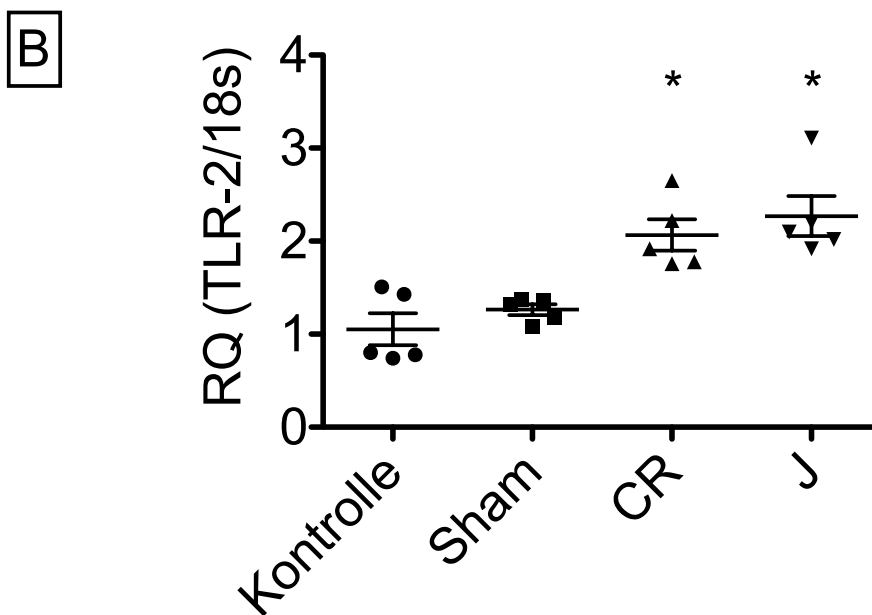
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Tukey's multiple comparison test)

## TLR-2 Expression in der Milz



## TLR-2 Expression in der Milz



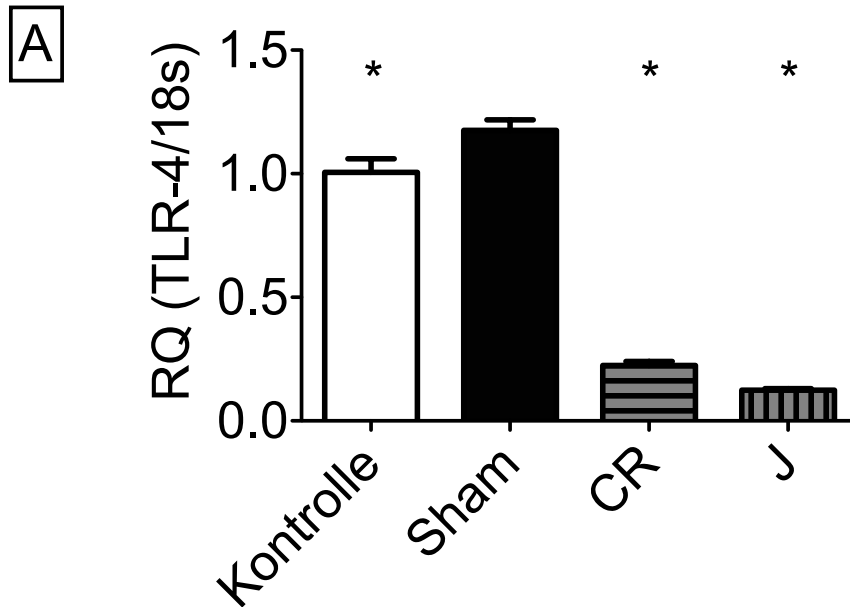
**Abb. 20:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-2 in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TLR-2/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

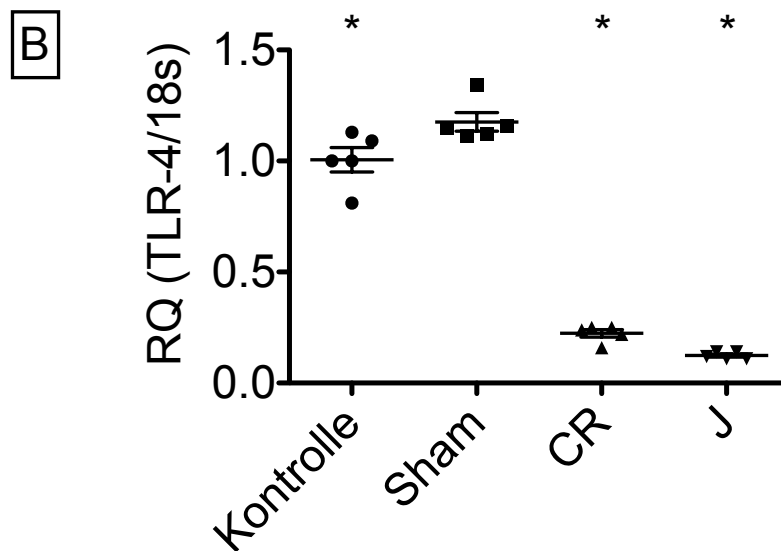
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Tukey's multiple comparison test)

## TLR-4 Expression in der Milz



## TLR-4 Expression in der Milz



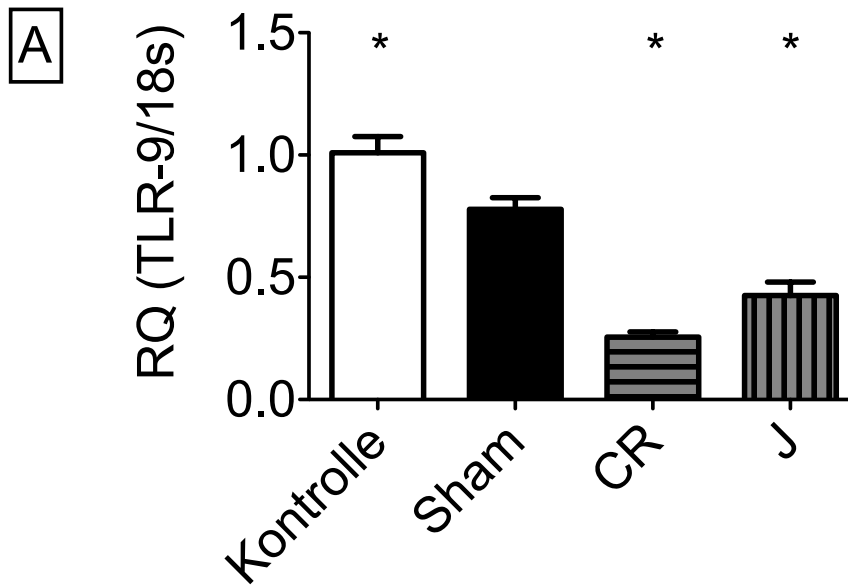
**Abb. 21:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-4 in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TLR-4/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

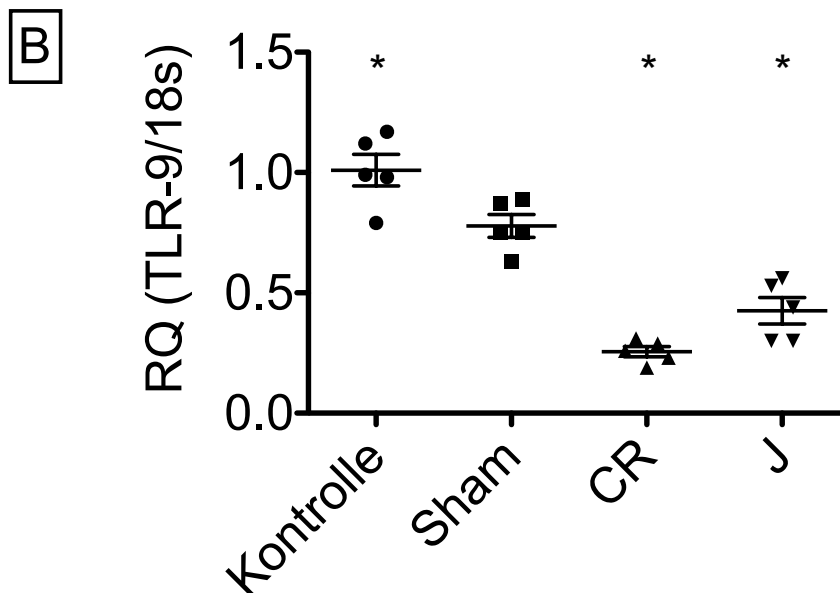
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Tukey's multiple comparison test)

## TLR-9 Expression in der Milz



## TLR-9 Expression in der Milz



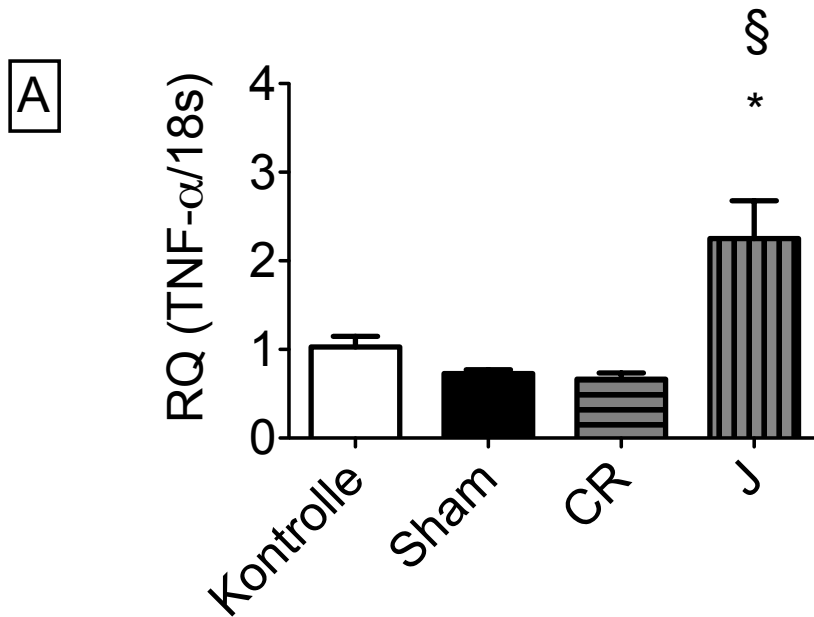
**Abb. 22:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-9 in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TLR-9/18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

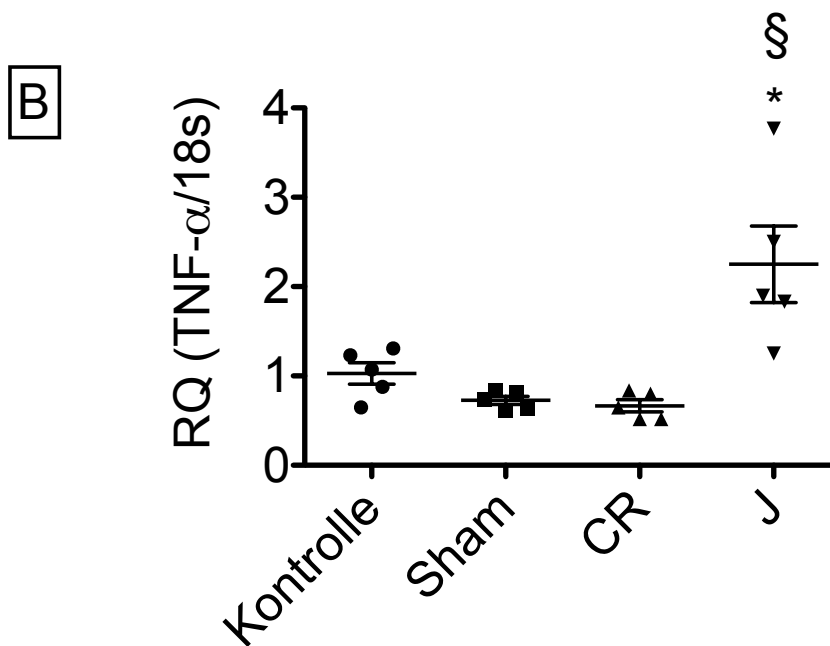
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), Tukey's multiple comparison test)

## TNF- $\alpha$ Expression in der Milz



## TNF- $\alpha$ Expression in der Milz



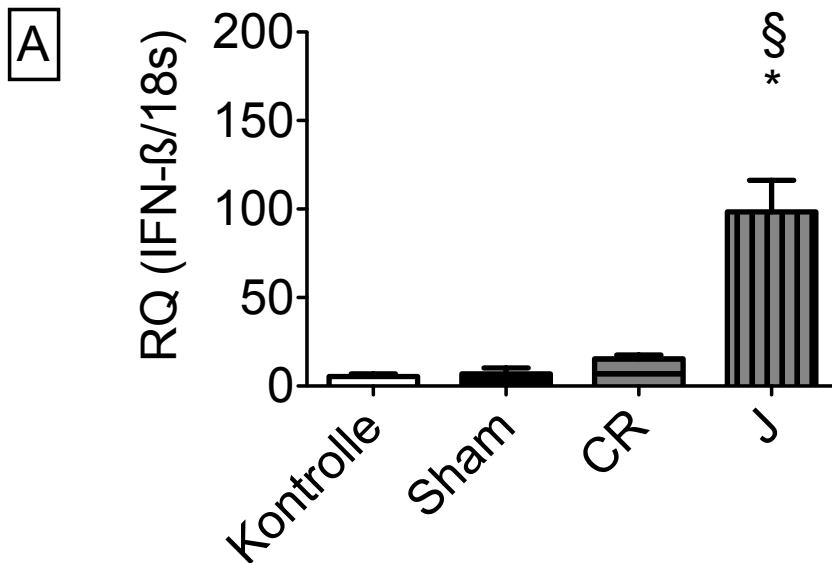
**Abb. 23:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TNF- $\alpha$  in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (TNF- $\alpha$ /18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

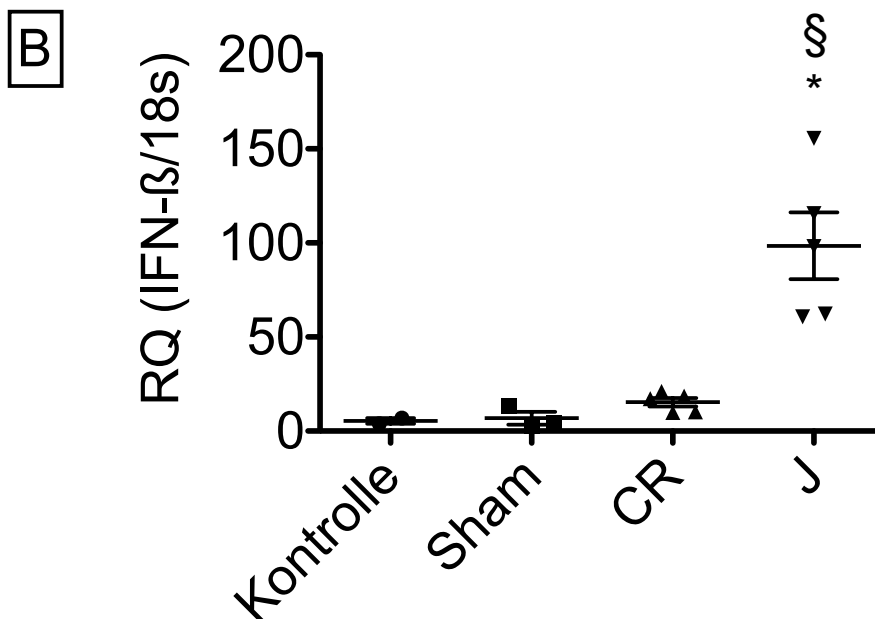
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), § p < 0,05 (vs. CR group), Tukey's multiple comparison test)

## IFN- $\beta$ Expression in der Milz



## IFN- $\beta$ Expression in der Milz



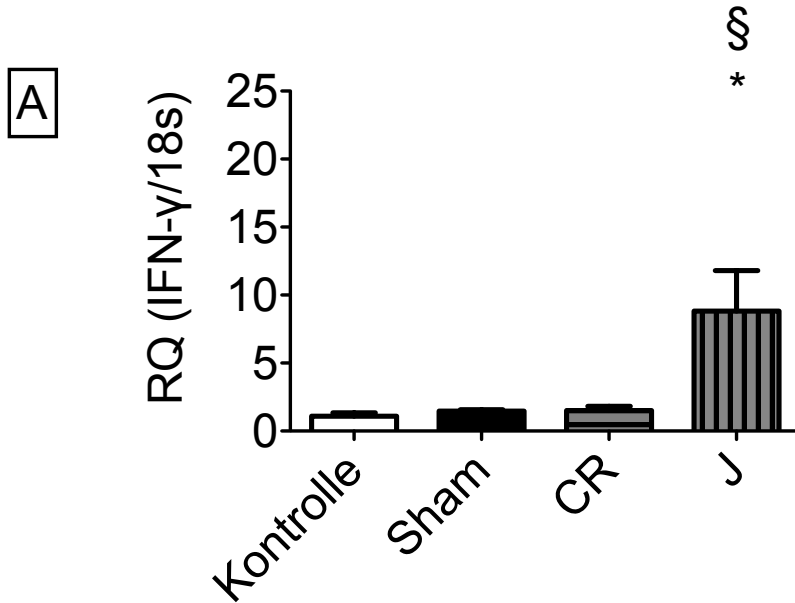
**Abb. 24:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IFN- $\beta$  in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IFN- $\beta$ /18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

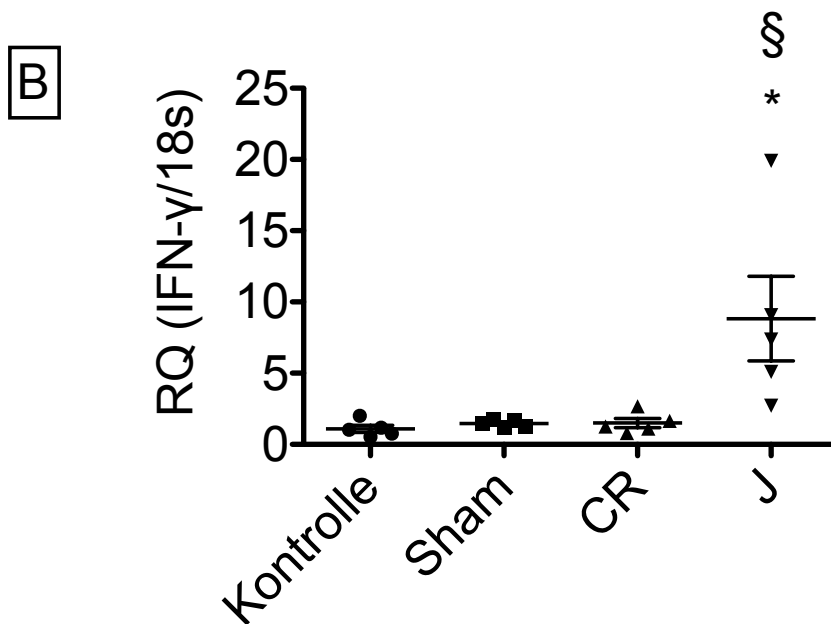
B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

(n = 5, Kontrolle n = 2, Sham n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), § p < 0,05 (vs. CR group), Tukey's multiple comparison test)

## IFN- $\gamma$ Expression in der Milz



## IFN- $\gamma$ Expression in der Milz



**Abb. 25:** Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IFN- $\gamma$  in der Milz 12 Stunden nach IPSI anhand des relativen Quotienten (RQ) zum Housekeeping-Gen 18s (IFN- $\gamma$ /18s).

A) Dargestellt als Säulendiagramm

B) Dargestellt als Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung

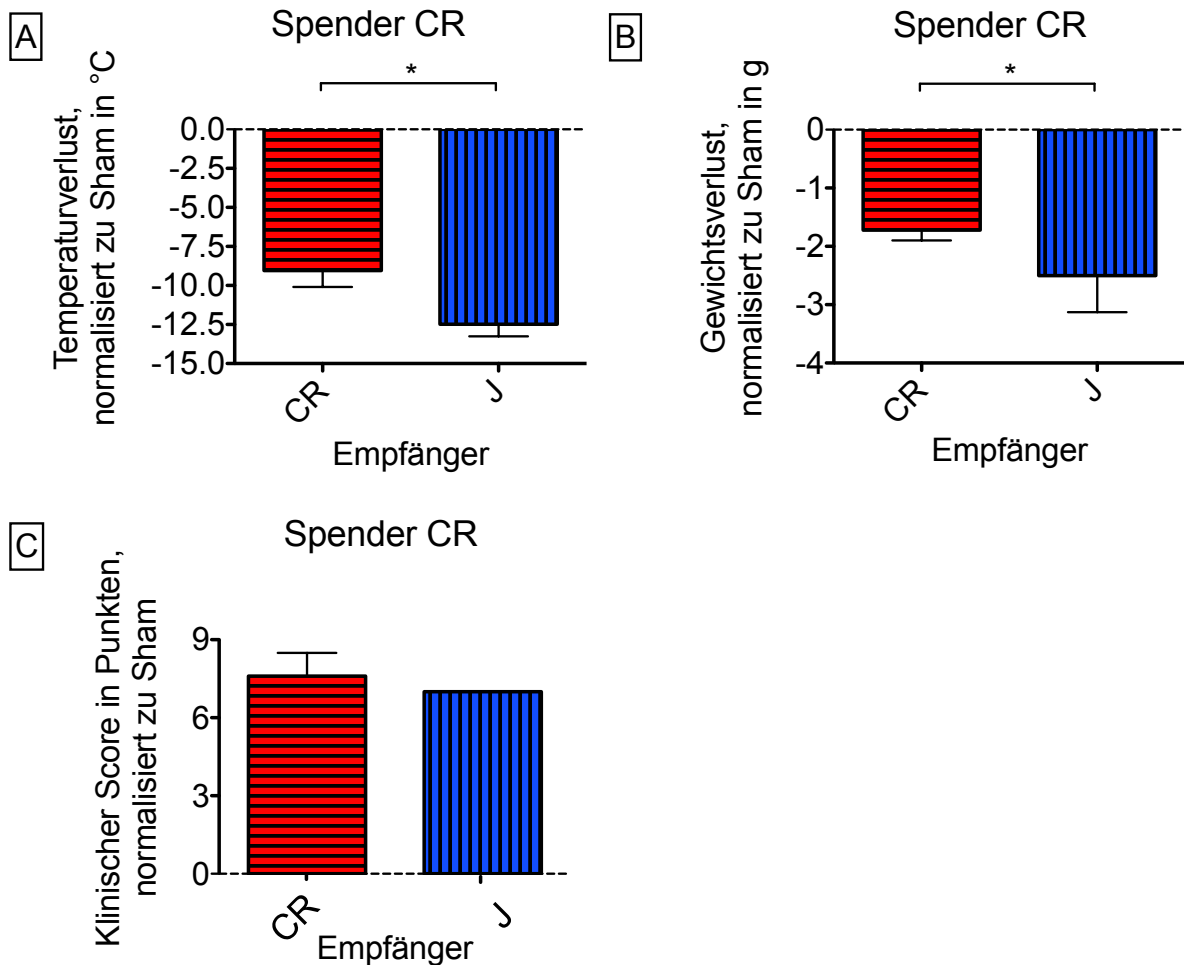
(n = 5, Mittelwert  $\pm$  SD, One-way ANOVA, \* p < 0,05 (vs. Sham), § p < 0,05 (vs. CR group), Tukey's multiple comparison test)



### **3.3 Einfluss der Herkunft des Rezipienten bei gleichem Stuhl-Spender**

#### **3.3.1 Spendertierherkunft CR**

Um den Einfluss der Herkunft des Empfängertieres auf die Manifestation der klinischen Symptomatik nach IPSI zu untersuchen, wurden Mäuse sowohl von CR als auch von J mit Stuhl von Spendertieren eines Lieferanten behandelt und der klinische Verlauf beobachtet. Bei mit CR-Stuhl behandelten J-Mäusen zeigten sich signifikant größere Gewichts- und Temperaturabnahmen verglichen mit Empfängertieren von CR (Temperaturverlust: \* Empfänger CR  $-9,04 \pm 1,052$  °C vs. Empfänger J  $-12,48 \pm 0,7701$  °C, Gewichtsverlust: \* CR  $-1,72 \pm 0,1789$  g vs. J  $-2,5 \pm 0,6285$  g, unpaired, two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0,05$ ) (Abb. 26). Im klinischen Score zeigten sich keine signifikanten Inter-Gruppen-Unterschiede (CR  $7,6 \pm 0,8944$  vs. J  $7 \pm 0$ ).

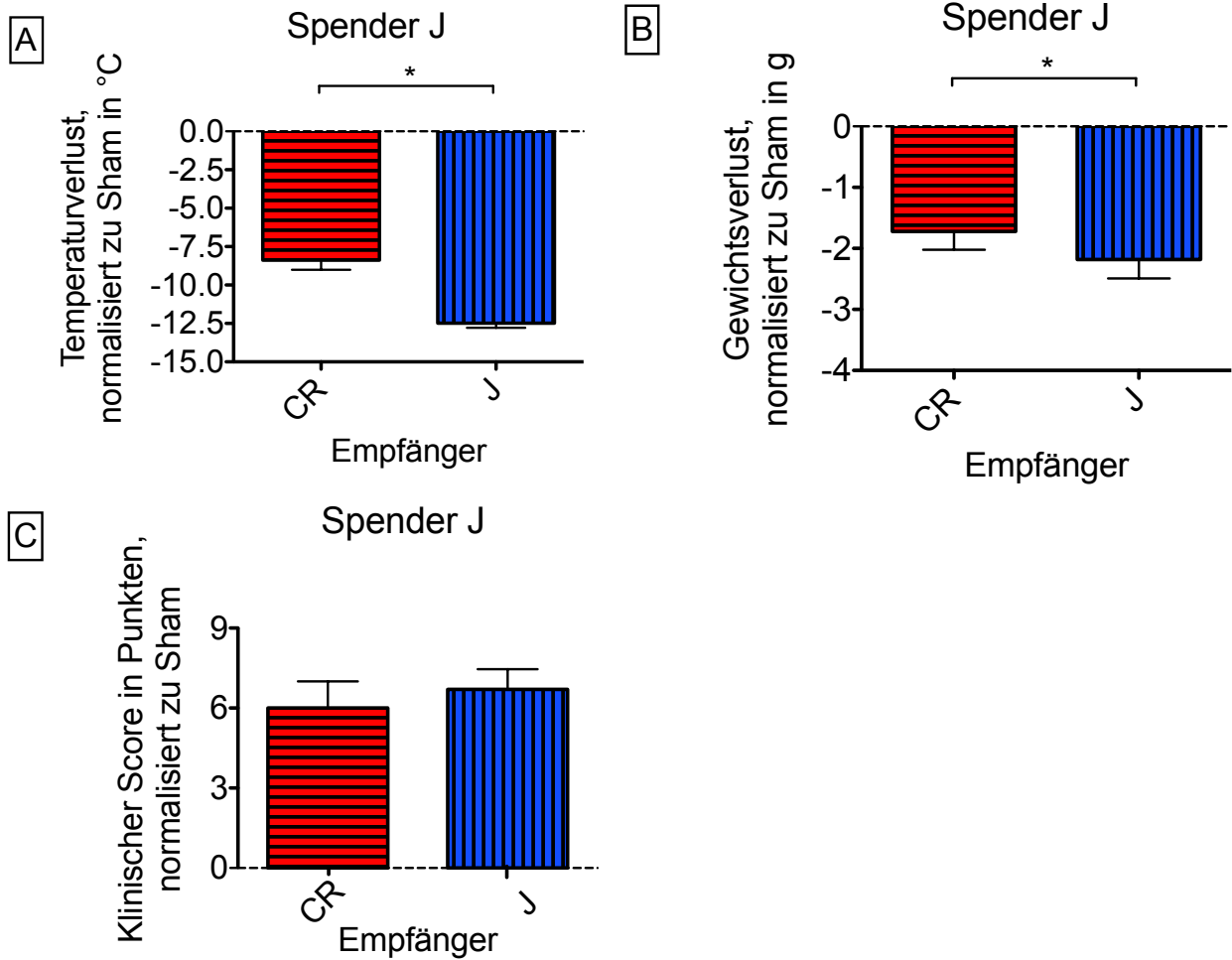


**Abb. 26:** Dargestellt sind der Temperaturverlust (A), der Gewichtsverlust (B) und der klinische Score (Körperhaltung, Bewegung/Verhalten, Körperpflege, C) von CR- (rot) und J-Mäusen (blau) 12 Stunden nach IPSI. Die Werte sind normalisiert auf die Werte der Sham-Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt und Spender (angezeigt von der unterbrochenen Linie)

(n = 5, Mittelwert ± SD, unpaired, two-tailed Student's t-test, \* p < 0,05)

### 3.3.3 Spendertierherkunft J

Injizierte man Stuhl von J, zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier waren Gewichts- und Temperaturverlust der J-Mäuse signifikant im Vergleich zu CR-Mäusen (Temperaturverlust: \* Empfänger CR  $-8,38 \pm 0,6301$  °C vs. Empfänger J  $-12,48 \pm 0,2966$  °C, Gewichtsverlust: \* CR  $-1,72 \pm 0,3033$  g vs. J  $-2,18 \pm 0,3114$  g, unpaired, two-tailed Student's t-test, \* p < 0,05) (Abb. 27). Der klinische Score zeigte keine signifikanten Unterschiede (CR  $6 \pm 1$  vs. J  $6,7 \pm 0,7583$ ).



**Abb. 27:** Dargestellt sind der Temperaturverlust (A), der Gewichtsverlust (B) und der klinische Score (Körperhaltung, Bewegung/Verhalten, Körperpflege, C) von CR- (rot) und J-Mäusen (blau) 12 Stunden nach IPSI. Die Werte sind normalisiert auf die Werte der Sham-Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt und Spender (angezeigt von der unterbrochenen Linie). (n = 5, Mittelwert ± SD, unpaired, two-tailed Student's t-test, \* p < 0,05)

## 4. Diskussion

Die eingangs formulierten Fragestellungen lassen sich aus unseren Resultaten wie folgt beantworten:

- I. In der ersten Beobachtungsperiode zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stuhlzusammensetzung verschiedener Anbieter. *S. aureus* war bei CR und H bei mehr als der Hälfte aller Tiere nachweisbar, bei J hingegen bei keinem Einzigen. Nur bei J wurde dafür *Bacillus licheniformis* bei fast allen Tieren nachgewiesen.
- II. Über die Zeit konnten Veränderungen des Spender-Mikrobioms nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von *E. coli* verminderte sich bei CR deutlich. Zudem war *S. aureus* sowohl bei CR als auch bei J nachweisbar. *Bacillus licheniformis* war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.
- III. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der klinischen Manifestation einer experimentellen Sepsis unter Verwendung des IPSI-Modells. Der klinische Score war bei CR- und H-Mäusen bereits nach 12 Stunden signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht. Bei J-Mäusen zeigte sich kaum eine Differenz.
- IV. Das Spender-Mikrobiom hatte auf die molekularbiologische Manifestation einer experimentellen Sepsis Auswirkungen. Die Expression der Zytokine (bis auf TNF- $\alpha$ ) zeigte sich in der ersten Beobachtungsperiode bei CR erhöht und bei J nicht signifikant verändert. Die Expression von TLR-4 war bei CR im Gegensatz zu J signifikant reduziert.
- V. Es zeigten sich Einflüsse des Empfänger-Mikrobioms auf die Manifestation einer experimentellen Sepsis. Bei J-Empfängertieren kam es zu einer signifikanten Gewichts- und Temperaturabnahme im Vergleich zu CR-Empfängertieren.

Der Darmflora, auch intestinales Mikrobiom genannt, kommt in der Erforschung der Pathogenese und auch möglicher Therapieansätze der Sepsis ein steigendes Interesse entgegen. Von besonderer Bedeutung sind diese Zusammenhänge bei tierexperimentellen Ansätzen der Sepsisforschung, welche ein Modell mit abdominalem Infektfokus verfolgen (zum Beispiel CLP oder CASP). Bei der Etablierung eines validen und reproduzierbaren Modells auf Basis der intraperitonealen Stuhlinjektion stellten wir uns daher die Frage, ob Unterschiede in der Lieferquelle von Versuchstieren gleichen genetischen Hintergrundes Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung des

Dickdarmstuhls haben und ob diese auch einen Effekt auf die Manifestation eines septischen Krankheitsbildes nach IPSI haben.

Die Darmflora ist nicht bei allen Tieren einer Gattung identisch. Genetische Voraussetzungen, klimatische Begebenheiten oder Ernährungsgewohnheiten sorgen für einen einzigartigen Fingerabdruck der Darmflora eines Individuums (Benson et al., 2010; Nguyen et al., 2015; Schloissnig et al., 2012). Bei kommerziellen Anbietern von Inzucht-Stämmen dürfte eigentlich ein nahezu identisches Mikrobiom bei Versuchstieren erwartet werden. Jedoch nehmen bei gleicher Nahrung, gleichem genetischen Hintergrund und gleichen Umweltbedingungen auch andere Faktoren auf die Zusammensetzung der Darmflora Einfluss. So wurde zum Beispiel der mütterliche Einfluss durch eine Übertragung bei der Geburt untersucht. Turnbaugh et al. (2009) und Ubeda et al. (2012) zeigten, dass Mäuse einer Familie eine gleichartigere Zusammensetzung der Darmflora haben als nicht verwandte Mäuse. Für die Darmflora ist zudem die Anzahl der Tiere pro Käfig eine zu beachtende Angabe. Durch Koprophagie, also der peroralen Aufnahme von Kot, kann es zu einer Homogenisierung des intestinalen Mikrobioms von Mäusen in einem Käfig kommen (Deloris Alexander et al., 2006). Hierbei erfolgt ein Austausch des intestinalen Mikrobioms zwischen den Mäusen. Dieser Vorgang ist jedoch nicht bei allen Mausstämmen gleich. Tang et al. (2002) haben Unterschiede bei der Defäkation einzelner Mausstämme festgestellt. Es zeigten sich zum Beispiel Unterschiede in der Anzahl an Defäkationen. Dies wiederum kann zu Unterschieden in der Zeit und Effektivität verschiedener Mausstämme beim Vorgang der Homogenisierung des Mikrobioms innerhalb eines Käfigs führen. Mausstamm und Anzahl der Tiere in einem Käfig sollten daher konstant gehalten werden.

Zur Bestimmung der Zusammensetzung des Mikrobioms der Mäuse bedienten wir uns eines semi-quantitativen chromogenen Screening-Agars und des MALDI-TOF. Bei dem Agar handelt es sich um ein ursprünglich für die Differenzierung von Harnwegspathogenen entwickeltes Medium (Merlino et al., 1996). Der Einsatz des Agars ist jedoch nicht auf den Harntrakt beschränkt und findet in anderen Bereichen wie zum Beispiel der Stuhl-Diagnostik Verwendung (Filus et al., 2003). MALDI-TOF diente der Validierung und Ergänzung. Diese Technik ist im Laufe der letzten Jahre zu einem Goldstandard in der Identifizierung von Bakterien in mikrobiologischen

Forschungslaboren geworden (Schubert und Kostrzewa, 2017). Die Analyse wurde auf wichtige Kandidatenkeime begrenzt (*E. coli*, *S. aureus*, KES-E, *S. saprophyticus*, *Proteus* und *Bacillus licheniformis*), eine weitere Differenzierung war für die Bearbeitung der Fragestellung nicht notwendig.

Es zeigten sich in der ersten Analyse zum Zeitpunkt T1 deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der aeroben fäkalen bakteriellen Flora von C57BL/6N-Mäusen innerhalb der drei untersuchten Anbieter CR, J und H (Abb. 4). *E. coli* fand sich bei fast allen Mäusen von CR, wohingegen das Vorkommen bei J und H deutlich reduziert war. Auffälliger war jedoch, dass *S. aureus* bei J nicht nachgewiesen werden konnte. Bei CR und H kam *S. aureus* hingegen sehr häufig vor. Zudem wurde während dieser ersten Beobachtungsperiode nur in Tieren von J *Bacillus licheniformis* nachgewiesen. Bei *S. aureus* handelt es sich um ein gram-positives Kokken-Bakterium. Es besiedelt unter anderem Haut, die oberen Atemwege und den unteren Verdauungstrakt und kann, bei entsprechender Disposition, auch pathogene Eigenschaften entwickeln. In solchen Fällen tritt meist eine eitrige Entzündung mit Abszessbildung auf, ein typisches klinisches Erscheinungsbild einer *S. aureus*-Infektion (Baker, 1998). Da die Probengewinnung unter sterilen Bedingungen erfolgte und bei J kein *S. aureus* nachgewiesen werden konnte, scheint eine Kontamination der Proben selbst durch Fell oder Haut unwahrscheinlich. Die hohe Rate an *S. aureus* innerhalb eines Anbieters kann vielmehr durch eine fäkal-orale Übertragung erklärt werden, wie Kernbauer et al. (2015) zeigen konnten. Um eine Verbreitung des Keimes durch Koprophagie nachzuweisen, injizierten die Autoren zwei Mäusen *S. aureus* intravenös und setzten diese in einen Käfig mit drei nicht infizierten Mäusen. Im Verlauf zeigte sich bei allen Mäusen eine ähnliche Ausscheidung an *S. aureus*.

Betrachtet man den klinischen Score (Abb. 5) und die Temperatur (Abb. 7), zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Tieren, welche Stuhl mit *S. aureus*-Nachweis (von CR und H) erhalten haben und denen ohne solchen (J). Bei CR- und H-Stuhl-erhaltenden Tieren zeigten sich ein deutlich erhöhter klinischer Score und eine Hypothermie. Es legt daher die Vermutung nahe, dass *S. aureus* als Virulenzfaktor für die Manifestation der Sepsis in diesem Versuchsaufbau eine wichtige Rolle spielt. *S. aureus* hat über die Produktion mehrerer Zytokine eine immunogene Wirkung. In der Zellwand eingebettete Peptidoglykane fungieren als TLR-2-Liganden (Chau et al.,

2009). Die Signaltransduktion hierüber führt zu einer massiven Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren. Hierdurch wird das angeborene Immunsystem aktiviert (Takeuchi und Akira, 2010). Zudem berichten weitere Arbeitsgruppen von einer Vermittlung der Phagozytose des Bakteriums durch TLR-2 und andere Rezeptoren (Hoebe et al., 2005 und Kubica et al., 2008). Während der systemischen Infektion mit *S. aureus* wurde für TLR-2 zudem eine schützende Wirkung durch eine Kontrolle des Gleichgewichts von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen (Yimin et al., 2013). Die Rolle von TLR-2 ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Bei Versuchen mit TLR-2-defizienten Mäusen zeigten sich eine erhöhte Anfälligkeit des Wirts für Staphylokokken-Infektionen, eine verringerte pro-inflammatorische Zytokinproduktion und eine erhöhte Letalität (Takeuchi et al., 2000). Eine verringerte Überlebensrate über eine Erhöhung von TNF- $\alpha$ - und IL-6-Spiegel bei mit *S. aureus* infizierten TLR-2-defizienten Mäusen konnte auch von Gillrie et al. (2010) nachgewiesen werden. Betrachtet man in unserer Arbeit die Expression von TLR-2, zeigt sich eine Hochregulation bei CR-Stuhl-erhaltenden Mäusen im Vergleich zu J-Stuhl-erhaltenden Mäusen. *S. aureus* könnte mutmaßlich ein hierzu beitragender Faktor sein. Li et al. (2003) zeigten ebenfalls, dass eine Infektion mit *S. aureus* zu einer Hochregulation von TLR-2 führen kann. Um die Rolle der Virulenzfaktoren der Staphylokokken bei der Manifestation einer durch intraperitoneale Stuhlinjektion hervorgerufenen Sepsis in allen Einzelheiten zu verstehen, sind vor allem weitere in vivo Versuche notwendig. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse der Versuche mit TLR-2-defizienten Mäuse zeigen, muss zudem die Interaktion von *S. aureus* mit TLR-2 weiter untersucht werden.

Bei der Analyse von TLR-4 zeigte sich im Gegensatz zu TLR-2 eine signifikante Herabregulation bei CR- und H-Stuhl erhaltenden Gruppen. Skinner et al. (2005) zeigten in ex vivo Experimenten ebenfalls eine Herabregulation von TLR-4. Hierzu wurden Monozyten mit LPS stimuliert. Nach 20 Stunden zeigten diese eine deutliche Herabregulation von TLR-4. Sie vermuteten hier einen negativen Feedback-Mechanismus, der im Falle des Misserfolgens zu einer erhöhten septischen Letalität beitragen könnte. Williams et al. (2003) beobachteten darüber hinaus, dass eine frühe Hochregulation mit der Letalität von Mäusen mit polymikrobieller Sepsis korreliert. Als Begründung für eine Herabregulation könnten die Ergebnisse von Cabral et al. (2006) und Jiang et al. (2005) dienen. Es wurde hier gezeigt, dass die Stimulation von TLR-3

bzw. TLR-2 die Expression von TLR-4 bzw. TLR-5 herabregulieren kann. Durch die Gabe von Antikörpern gegen TLR-3 bzw. TLR-2 kam es zu keiner Herabregulierung der weiteren TLR.

Während dieser ersten Beobachtungsperiode (T1) wurde im Stuhl von Tieren von *J* *Bacillus licheniformis* nachgewiesen. Dies ist interessant, da *Bacillus licheniformis* normalerweise nicht Teil des intestinalen Mikrobioms von gesunden Säugetieren ist. *Bacillus licheniformis* gehört zu den Sporenbildnern und kann als gram-positives Bodenbakterium sowohl aus Böden als auch aus sich zersetzendem Pflanzenmaterial isoliert werden (Sneath et al., 1986). Es wurde zudem als prädominantes Pathogen zum Beispiel in roher Milch gefunden (Kalogridou-Vassiliadou, 1992; Scheldeman et al., 2006) und ist in landwirtschaftlicher Umgebung (Futter, Dünger) und in verschiedenen unverarbeiteten Lebensmitteln zu finden (Crielly et al., 1994). *Bacillus licheniformis* kann vor allem bei immungeschwächten Menschen schwerwiegende Infektionen hervorrufen. So konnte unter anderem bei Katheterinfektionen (Blue et al., 1995), bei Peritonitiden (Park et al., 2006; Sugar und McCloskey, 1977) und bei Ophtalmitiden (Thurn und Goodman, 1988) eine Bakteriämie mit *Bacillus licheniformis* nachgewiesen werden. Der *Bacillus* findet demgegenüber jedoch auch als Bestandteil probiotischer Nahrung Verwendung. Jørgensen et al. (2016) zeigten ein verbessertes Wachstum bei mit *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* gefütterten Schweinen. Darüberhinaus kann diese Beeinflussung der Darmflora des Wirtes für eine Stärkung des Immunsystems und sogar für eine Reduktion des Antibiotikagebrauchs sorgen (De Baets et al., 2009). Aufgrund einer solchen Stimulation des Immunsystems ist eine Ergänzung der Nahrung von Labortieren mit Probiotika nicht zu empfehlen. Insbesondere für Versuche mit ähnlichen Fragestellungen wie in dieser Arbeit, können die durch Probiotika hervorgerufenen Effekte die Ergebnisse verändern und die Interpretation erschweren. Brown et al. (2012) berichteten über ein übermäßiges Wachstum spezifischer Bakterien nach einer Veränderung des intestinalen Mikrobioms durch die Ernährung. Sie schlussfolgerten, dass eine solche Veränderung zu einer inadäquaten inflammatorischen Antwort führen kann. *Bacillus licheniformis* könnte daher zu einer Verdrängung anderer gram-positiver Bakterien führen. Der *Bacillus* gehört wie *S. aureus* zum Stamm der Firmicutes (Jordan et al., 2008). Da in unseren Versuchen bei *J*-Tieren anfangs kein *S. aureus* im Mikrobiom nachweisbar war, könnte die Ursache in einer



solchen Verdrängung liegen. Wie *Bacillus licheniformis* in den Stuhl aus der Gruppe der J-Mäuse gelangen konnte, konnte nicht hinreichend aufgeklärt werden. Auf Nachfrage bei den Anbietern ließen sich keine weiteren Angaben über Details zu Fütterung und etwaigen Nahrungs-Zusatzstoffe erhalten.

Um Veränderungen des Mikrobioms innerhalb der Mäuse eines Anbieters im Laufe der Zeit zu detektieren, untersuchten wir die Darmflora von C57BL/6N-Mäusen von J und CR 16 Monate nach der ersten Analyse (Zeitpunkt T2). Es zeigte sich ein deutlich verändertes Dickdarm-Mikrobiom im Vergleich zu den ersten Untersuchungen (Abb. 13). Diese Ergebnisse konnten auch andere Forschungsgruppen nachweisen. So zeigten Saric et al. (2008) ebenfalls eine Veränderung des fäkalen Mikrobioms über die Zeit. Hoy et al. (2015) fanden ebenfalls interindividuelle Unterschiede des Mikrobioms bei Inzucht-Mäusen als auch Veränderungen in der Darmflora eines Individuums über die Zeit. Dies bedeutet, dass sich das Mikrobiom einer Maus im Laufe ihres Lebens ändern kann. Das Alter der Mäuse sollte folglich bei allen Versuchen möglichst gleich sein. Ein weiterer Grund für Änderungen des Mikrobioms im Laufe der Zeit könnte der Status einer Maus im Käfig sein. Die soziale Position einer Maus innerhalb des Käfigs kann zu unterschiedlichen Ausprägungen von Stress führen. Cao et al. (2005) zeigten, dass psychologischer Stress die Passage der Nahrung durch den Dünndarm verlangsamen kann. Diese Verlangsamung kann zu einem quantitativen Anstieg von *E. coli*-Bakterien und somit einer Veränderung des Mikrobioms durch Selektion führen (Wang und Wu, 2005). Ein weiterer Stressor ist der Transport der Mäuse. Wir erhielten je Box 20 Mäuse von den einzelnen Anbietern. Durch den Transport in unser Labor kann es bereits zu einer Änderung im Mikrobiom kommen. Ma et al. (2012) beschrieben eine solche Veränderung am Tag nach dem Transport in eine andere Einrichtung mit Wechsel des Käfigs. Nach fünf Tagen zeigte sich das fäkale Mikrobiom wieder identisch mit dem Mikrobiom vor dem Transport.

Während die Organentnahme im ersten Versuchsteil (T1) nach 18 Stunden erfolgte, zogen wir im zweiten Versuchsteil (T2) diesen Zeitpunkt auf 12 Stunden nach Injektion vor. Im ersten Versuchsteil zeigte sich sowohl nach 12 als auch nach 18 Stunden ein sehr niedriger klinischer Score bei J-Mäusen. Im zweiten Versuchsteil war der klinische Score bei J-Mäusen dagegen deutlich erhöht. Es ist daher davon auszugehen, dass die

unterschiedlichen Ergebnisse nicht in Zusammenhang mit dem vorgezogenen Endzeitpunkt stehen.

Bestätigend zum ersten Versuchsteil zeigte sich im zweiten Teil eine Herabregulation von TLR-4 in beiden Versuchsgruppen. Bei TLR-2 kam es sogar zu einem signifikanten Anstieg. Dies ist als Hinweis auf einen möglichen Einfluss von *S. aureus* zu werten. Ein direkter Zusammenhang konnte in unserem Versuchsaufbau jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei klinisch kranken Mäusen zeigten sich eine erniedrigte Körpertemperatur, ein Gewichtsverlust und ein erhöhter klinischer Score. Adäquat hierzu kam es zu einer deutlichen Hochregulation pro-inflammatorischer Gene wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ . In verschiedenen Studien wurde bereits über die prognostische Funktion von IL-6 bei septischen Patienten berichtet (Patel et al., 1994 und Pettilä et al., 2002). Eine erhöhte Expression von IL-6 war jeweils mit einer erhöhten Letalität verbunden. Diese Aussage konnte in einem CLP-Modellversuch noch erweitert werden. IL-6 diente hier nicht nur als Indikator des Überlebens, sondern konnte auch jene Mäuse identifizieren, welche von einer Behandlung am meisten profitieren könnten (Osuchowski et al., 2009).

In dem dritten Versuchsteil wurde der Einfluss verschiedener Rezipienten auf die Manifestation der experimentellen Sepsis untersucht. Dazu wurden Mäuse von CR und J in zwei Versuchsreihen jeweils mit Stuhl von CR als auch mit Stuhl von J behandelt. Bei J-Rezipienten kam es sowohl bei Injektion von CR- als auch von J-Stuhl zu Gewichts- und Temperaturabnahmen (Abb. 26 und 27). Unsere Daten lassen hier vermuten, dass nicht nur Spendertiere genau ausgewählt werden müssen, sondern auch die Empfängertiere. Wie oben erwähnt, kann insbesondere *Bacillus licheniformis* das Immunsystem stimulieren. Durch eine solche Stärkung des Immunsystems ist das Vorkommen des *Bacillus* insbesondere beim Empfängertier zu vermeiden, um eine Fehlinterpretation zu verhindern. Ergebnisse anderer Autoren bestätigen diese Vermutung. Gauguet et al. (2015) brachten Mäuse mit und ohne Nachweis von segmentierten filamentösen Bakterien in einem Käfig unter. Innerhalb von 14 Tagen fand ein Austausch des Mikrobioms statt. Hierdurch kam es zu einer verringerten Empfindlichkeit für durch *S. aureus* hervorgerufene Pneumonien und zu einem Anstieg der Überlebensrate. Dies zeigt, dass die gemeinsame Unterbringung die Lieferantenspezifischen Unterschiede in der Stuhlzusammensetzung ebenso wie deren Einfluss auf den klinischen Phänotyp eliminieren kann. Wie diese Ergebnisse zeigen, ist es nicht

verwunderlich, dass eine Vielzahl an Krankheiten und Dysfunktionen mit einem Ungleichgewicht in Zusammensetzung, Anzahl und Lebensraum des Darmmikrobioms in Zusammenhang stehen. Darüber hinaus scheint das Darmmikrobiom zum Wachstum und zur Entwicklung des Wirtes beizutragen (Sekirov et al., 2010).

Zur Entstehung eines septischen Schocks tragen bestimmte Kandidatenkeime bei. Hierzu gehören die oben bereits erwähnten segmentierten filamentösen Bakterien (SFB). Sie üben einen großen Einfluss auf das Immunsystem und Entzündungsantworten aus (Ivanov et al., 2009; Umesaki et al., 1995). Cabrera-Perez et al. (2016) konnten für mit SFB kolonialiserte Mäuse in dem CLP-Modell eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen eine Sepsis zeigen. Auf der anderen Seite konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Kolonialisierung mit SFB zu einer Exazerbation von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis führen kann (Teng et al., 2016 und Wu et al., 2010). Dem Auftreten von SFB sollte also in Mausversuchen besondere Beachtung geschenkt werden, da diese einen potentiellen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Durch die Aufzucht der Mäuse unter keimfreien Bedingungen können solche Einflüsse reduziert werden. Zudem werden so gewisse Einflüsse wie die mütterliche Übertragung verhindert (McCafferty et al., 2013). Keimfrei aufgezogene Mäuse weisen darüber hinaus eine geringere Anfälligkeit für einen septischen Schock auf als konventionell aufgezogene Mäuse (Wells et al., 2004). In einem Versuchsaufbau mit keimfrei aufgezogenen Mäusen kann zudem die Wirkung einzelner Bakterien auf Gesundheits- und Krankheitsaspekte besser untersucht werden. Ein solcher Versuch wurde zum Beispiel in einem präklinischen Modell der Multiplen Sklerose unternommen. Während keimfrei aufgezogene Mäuse üblicherweise eine Resistenz gegenüber einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis aufweisen, entwickelten sie diese nach Kolonialisierung mit SFB (Lee et al., 2011).

Das intestinale Mikrobiom kann wie oben beschrieben modulierende Effekte (Veränderung des Wachstums, Exazerbation von Autoimmunerkrankungen) auf das Immunsystem ausüben. In experimentellen Modellen der Peritonitis und abdominalen Sepsis ist ein gutes Verständnis des intestinalen Mikrobioms daher wichtig. Solche Modelle sind aufgrund erhöhter Letalität bei Patienten mit isolierter abdominalen Infektion im Vergleich zu anderen Infektionen bedeutend (De Waele et al., 2014). Um die Pathogenese der abdominalen Sepsis zu erforschen und neue therapeutische

Vorgehensweisen zu entwickeln, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Tiermodelle entwickelt (Deitsch, 2005). Die Auswahl des Tiermodells hängt dabei stark von der Fragestellung ab. Sollen zum Beispiel typische pathophysiologische Veränderungen während einer polymikrobiellen Sepsis untersucht werden, sind CLP- und CASP-Modell weit verbreitet. Diese Modelle sind jedoch für bestimmte Fragestellungen aufgrund der technischen Anforderungen, Invasivität, hoher benötigter n-Zahlen, fraglicher Reproduzierbarkeit und variierender anatomischer Voraussetzungen zum Teil nicht nutzbar (Schabbauer, 2012). Die Übertragung der Ergebnisse dieser Modelle auf klinische Studien ist zudem nicht immer möglich. Labortiere entstammen häufig Inzuchtstämmen, haben das gleiche Alter, gleiches Gewicht und gleiches Geschlecht. Die Ernährung ist ebenfalls identisch. In klinischen Studien dagegen wird ein heterogenes Patientenkollektiv untersucht, in welchem zudem weitere Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Nierenerkrankungen einen Einfluss auf den Verlauf und die Letalität ausüben (Dejager et al., 2011). Ein weiterer Faktor ist das Alter der Patienten mit Sepsis. Es beträgt zumeist mehr als 50 Jahre. Das Alter der Mäuse in den experimentellen Sepsis-Modellen beträgt meist zwei bis drei Monate, in etwa einem Menschenalter von 10 Jahren entsprechend. In einer Studie mit CLP konnte gezeigt werden, dass ältere Mäuse eine erhöhte Letalität im Vergleich zu jüngeren Mäusen aufweisen (Turnbull et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde das IPSI-Modell verwendet. Es spiegelt viele Eigenschaften einer humanen Sepsis mit abdominellem Fokus wider. Die Durchführung ist im Vergleich zu den CLP- und CASP-Modellen einfacher. Zudem kann das infektiöse Material quantitativ und qualitativ bestimmt werden und in einem leicht zu erlernenden standardisierten Vorgehen appliziert werden. Hierdurch ist eine gute Reproduzierbarkeit und Steuerung des Krankheitsverlaufes und der Letalität zu erreichen (Gonnert et al., 2011). Störgrößen wie operative Fähigkeiten, anatomische Größenvariabilitäten des Caecums oder Größe der Ligaturen kommt keine so große Bedeutung zu. Da die Letalität durch die Menge des Inoculums der infektiösen Proben gut gesteuert werden kann, sind zudem Aussagen über die Wirkungen unterschiedlicher Dosen möglich. Der Zeitraum der Untersuchung ist ebenfalls variabel. Andere Forschungsgruppen haben bereits verschiedene Modifikationen an dem Modell vorgenommen und somit die Einsatzmöglichkeiten erweitert. Cameron et al. (1996) injizierten lebende E. coli-

Bakterien in anderweitig sterilem Kot intraperitoneal. Hierdurch wurde das Krankheitsbild von einer polymikrobiellen zu einer rein gram-negativen Sepsis verändert. In unserer Arbeit erfolgte eine Modifikation durch die Injektion des Stuhls eines Anbieters in Rezipienten verschiedener Anbieter. Gonnert et al. (2011) injizierten ähnlich wie in unserer Arbeit ein definiertes und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenes Volumen intraperitoneal. Im Unterschied zu unserer Arbeit erfolgte eine Injektion menschlichen Stuhls in Ratten. Dieses Einfrieren von Proben hat jedoch Einfluss auf die Menge vitaler Bakterien nach dem Auftauen (Metzler-Zebeli et al., 2016). Techniken des Lagerns und Aufbewahrens der Stuhlproben müssen daher weiter untersucht werden.

Unsere Arbeit liefert Hinweise auf die Notwendigkeit für kontrollierte und homogene Ausgangsbedingungen für tierexperimentelle Modelle der Peritonitis und Sepsis. Dies gilt insbesondere für Modelle, welche eine fäkale Kontamination anwenden (IPSI, CASP oder CLP) und untereinander verglichen werden. Gemäß den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit sollte folgenden Punkten bei der Entwicklung und Durchführung genannter tierexperimenteller Versuchsansätze besondere Beachtung geschenkt werden:

- Innerhalb eines Experimentes sollten Tiere eines Wurfes bevorzugt werden.
- Die Tiere sollten gleiches Geschlecht und Alter haben.
- Der genetische Hintergrund und der Lieferant sollten identisch sein.
- Nach Erwerb der Tiere sollte eine definierte Anzahl an Mäusen je Käfig für zum Beispiel zwei Wochen unter gleichen Bedingungen gehalten werden (Gauguet et al., 2015).
- Auf eine geringe zeitliche Abfolge bei aufeinanderfolgenden Experimenten ist zu achten.
- Es sollte eine ausreichend große n-Zahl zur Minimierung der Beeinflussung der interindividuellen Unterschiede des intestinalen Mikrobioms verwendet werden.
- Eine Analyse des intestinalen Mikrobioms sollte vor Beginn und im Verlauf des Experimentes erfolgen. Diese ist in einer Veröffentlichung zu erwähnen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss Anbieter-spezifischer Unterschiede des Darmmikrobioms von C57BL/N-Mäusen auf das Sepsismodell der intraperitonealen Stuhlinjektion untersucht.

Bei der Zusammensetzung des Darmmikrobioms der Spendertiere zeigten sich bereits deutliche Unterschiede. Bei Mäusen von CR wurde bei 17/20 Tieren *S. aureus* nachgewiesen, bei Mäusen von H bei 12/20 Tieren. Im Gegensatz hierzu konnte *S. aureus* bei Mäusen von J im Caecum nicht nachgewiesen werden. Dafür konnte bei J-Tieren *Bacillus licheniformis* nachgewiesen werden. Dieser *Bacillus* kann die Darmflora beeinflussen und eine Stärkung des Immunsystems bewirken. Eine Besiedlung der Darmflora mit diesem Keim ist daher für inflammatorische Tiermodelle problematisch. Um eine Aussage über Veränderungen im zeitlichen Verlauf treffen zu können, erfolgte eine erneute Analyse des Darmmikrobioms 16 Monate nach den initialen Versuchen. Es kam zu einer deutlichen Abnahme von *E. coli* bei Mäusen von CR. In der ersten Beobachtungsperiode hatten 19/20 Tieren einen Nachweis von *E. coli*, in der zweiten Periode nur noch 4/20 Tieren. *S. aureus* konnte nun auch bei 18/20 Tieren von J nachgewiesen werden. Ein Nachweis von *Bacillus licheniformis* gelang nicht mehr.

Nach intraperitonealer Injektion erfolgte eine klinische Einschätzung der Tiere. Nach 12 Stunden zeigten sich signifikante Erhöhungen des klinischen Scores bei mit CR- und H-Stuhl injizierten Mäusen. Bei J-Stuhl erhaltenden Mäusen kam es zu keiner wesentlichen klinischen Verschlechterung. Es erfolgte eine Analyse der Expression verschiedener Zytokine und TLR, um Auswirkungen der Unterschiede des Spender-Mikrobioms auch auf molekularbiologischer Ebene nachzuweisen. Mäuse mit intraperitonealer Injektion von CR-Stuhl zeigten bei den Zytokinen einen signifikanten Anstieg der Expression. TLR-4 wurde zudem signifikant herabreguliert. Bei J-Stuhl erhaltenden Mäusen zeigten sich in der ersten Beobachtungsperiode keine Anstiege der Zytokinexpression. In der zweiten Beobachtungsperiode wurden die Zytokine sowohl bei CR- als auch bei J-Stuhl erhaltenden Mäusen signifikant heraufreguliert.

Um Einflüsse des Empfänger-Mikrobioms auf eine durch IPSI hervorgerufene experimentelle Sepsis herauszufinden, erfolgte eine Injektion in Mäuse von CR und J.

Es konnten signifikante Gewichts- und Temperaturverluste bei Empfängertieren von J im Vergleich zu Empfängertieren von CR nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen bei der Entwicklung und Durchführung tierexperimenteller Versuchsansätze helfen. Das IPSI-Modell bildet hierbei viele Eigenschaften einer humanen Sepsis mit abdominellem Fokus ab. Die Durchführung ist einfach zu erlernen. Störgrößen anderer Methoden (CLP/CASP) wie operative Fähigkeiten, anatomische Größenvariationen des Caecums oder Größe der Ligatur werden ausgeschaltet. Zudem ist durch eine quantitative und qualitative Bestimmung des infektiösen Materials eine bessere Reproduzierbarkeit und Steuerung des Krankheitsverlaufes und der Letalität möglich. Da die Darmflora der Mäuse einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse tierexperimenteller Studien haben kann, sollte eine Analyse des intestinalen Mikrobioms vor Beginn und im Verlauf des Experimentes erfolgen und bei Veröffentlichung der Daten erwähnt werden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Darstellung des angefertigten Filters.....	26
<b>Abb. 2:</b> Exemplarische Darstellung des Wachstums der einzelnen Kolonien auf einer CHROMagar™ orientation medium-Platte .....	28
<b>Abb. 3:</b> Beispiele der Darstellungsmöglichkeit verschiedener Bakterienstämme auf dem CHROMagar™ orientation medium.....	41
<b>Abb. 4:</b> Bakterienstämme 10/2012 .....	43
<b>Abb. 5:</b> Klinischer Score zum Zeitpunkt T1.....	45
<b>Abb. 6:</b> Gewichtsverlauf zum Zeitpunkt T1 .....	46
<b>Abb. 7:</b> Temperaturverlauf zum Zeitpunkt T1 .....	47
<b>Abb. 8:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von IL-1 $\beta$ in der Milz 18 Stunden nach IPSI.....	49
<b>Abb. 9:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von IL-6 in der Milz 18 Stunden nach IPSI.....	50
<b>Abb. 10:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TLR-2 in der Milz 18 Stunden nach IPSI.....	51
<b>Abb. 11:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TLR-4 in der Milz 18 Stunden nach IPSI.....	52
<b>Abb. 12:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T1 von TNF- $\alpha$ in der Milz 18 Stunden nach IPSI.....	53
<b>Abb. 13:</b> Bakterienstämme zu den Zeitpunkten 10/2012 und 02/2014.....	55
<b>Abb. 14:</b> Klinischer Score zum Zeitpunkt T2.....	56
<b>Abb. 15:</b> Gewichtsverlauf zum Zeitpunkt T2 .....	57
<b>Abb. 16:</b> Temperaturverlauf zum Zeitpunkt T2 .....	58
<b>Abb. 17:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-1 $\beta$ in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	60
<b>Abb. 18:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-6 in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	61
<b>Abb. 19:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IL-10 in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	62



<b>Abb. 20:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-2 in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	63
<b>Abb. 21:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-4 in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	64
<b>Abb. 22:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TLR-9 in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	65
<b>Abb. 23:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von TNF- $\alpha$ in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	66
<b>Abb. 24:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IFN- $\beta$ in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	67
<b>Abb. 25:</b> Dargestellt ist die Expression zum Zeitpunkt T2 von IFN- $\gamma$ in der Milz 12 Stunden nach IPSI.....	68
<b>Abb. 26:</b> Dargestellt sind der Temperaturverlust (A), der Gewichtsverlust (B) und der klinische Score (C) von CR- (rot) und J-Mäusen (blau) 12 Stunden nach IPSI .....	70
<b>Abb. 27:</b> Dargestellt sind der Temperaturverlust (A), der Gewichtsverlust (B) und der klinische Score (C) von CR- (rot) und J-Mäusen (blau) 12 Stunden nach IPSI .....	71

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Definition von Infektionen, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und MODS .....	9
<b>Tab. 2:</b> Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score.....	10
<b>Tab. 3:</b> Dargestellt sind humane Toll-like-Rezeptoren mit ihren Liganden und Herkunftsarten nach Frederiksen et. al, 2019. ....	14
<b>Tab. 4:</b> Injektionsschema Versuchsreihe Zeitpunkt T1 .....	27
<b>Tab. 5:</b> Injektionsschema Versuchsreihe Zeitpunkt T2 .....	28
<b>Tab. 6:</b> Darstellung von Größe, Morphologie und Besonderheiten der auf CHROMagar <sup>TM</sup> orientation medium wachsenden Bakterien .....	29
<b>Tab. 7:</b> Zeitliche Abfolge der Inkubation im Thermocycler .....	33
<b>Tab. 8:</b> Darstellung der in der RTq-PCR zur Detektion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , TLR-2, TLR-4 und TLR-9 verwendeten Primer .....	34
<b>Tab. 9:</b> Verwendete Geräte/Software nach Bezeichnung/Modell und Hersteller .....	37
<b>Tab. 10.1:</b> Verwendete Labormaterialien nach Bezeichnung/Modell und Hersteller .....	38
<b>Tab. 10.2:</b> Verwendete Labormaterialien nach Bezeichnung/Modell und Hersteller .....	39
<b>Tab. 11:</b> Verwendete Reagenzien nach Bezeichnung und Hersteller .....	40

## 8. Literaturverzeichnis

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801

Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Toll-like receptor family: receptors essential for microbial recognition and immune responses. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 15

Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall J-R. Influence of Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis on Outcome of Critically Ill Infected Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 77-84

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310

Arbibe L, Mira J-P, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG. Toll-like receptor 2-mediated NF- $\kappa$ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 2000; 1: 533-540

Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 231-266

Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 431-437

Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua K, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson DA, Pomp D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 18933-18938

Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 169-176

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5

Blackwell TS, Christman JW. The Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cytokine Gene Regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9

Blue SR, Singh VR, Saubolle MA. *Bacillus licheniformis* bacteremia: five cases associated with indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 629-633

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644-1655

Bowie A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285: 732-736

Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. *Nutrients* 2012; 4: 1095-1119

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Int Care Med* 2004; 30: 580-588

Cabral ES, Gelderblom H, Hornung RL, Munson PJ, Martin R, Marques AR. *Borrelia burgdorferi* Lipoprotein-Mediated TLR2 Stimulation Causes the Down-Regulation of TLR5 in Human Monocytes. *J Infect Dis* 2006; 193: 849-859

Cabrera-Perez J, Babcock JC, Dileepan T, Murphy KA, Kucaba TA, Badovinac VP, Griffith TS. Gut Microbial Membership Modulates CD4 T Cell Reconstitution and Function after Sepsis. *J Immunol* 2016; 197: 1692-1698

Cameron EM, Zhuang J, Menconi MJ, Phipps R, Fink MP. Dantrolene, an inhibitor of intracellular calcium release, fails to increase survival in a rat model of intra-abdominal sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 1537-1542

Cao S-G, Wu W-C, Han Z, Wang M-Y. Effects of psychological stress on small intestinal motility and expression of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide in plasma and small intestine in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 737-740

Chau TA, McCully ML, Brintnell W, An G, Kasper KJ, Vinés ED, Kubes P, Haeryfar SMM, McCormick JK, Cairns E, Heinrichs DE, Madrenas J. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat Med* 2009; 15: 641-648

Celes MRN, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: Going to the Heart of the Matter. *Pathobiology* 2013; 80: 70-86

Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* 2013; 27: 669-684

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-891

Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, LaCasse E, Picketts DJ, Wright KE, Korneluk RG. Inhibitor of Apoptosis Protein cIAP2 Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Survival. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 699-708

Crielly EM, Logan NA, Anderton A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 256-263

De Baets L, Vaniwaarden P, Meeus N, Schimmel H, Philipp W, Emons H. First certified reference materials for molecular fingerprinting of two approved probiotic *Bacillus* strains. *Int J Food Microbiol* 2009; 129: 16-20

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011; 19: 198-208

Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 2005; 24: 19-23

Deloris Alexander A, Orcutt RP, Henry JC, Baker J, Bissahoyo AC, Threadgill DW. Quantitative PCR assays for mouse enteric flora reveal strain-dependent differences in composition that are influenced by the microenvironment. *Mamm Genome* 2006; 17: 1093-1104

De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Type I interferons. *Int Rev Immunol* 1998; 17: 53-73

De Waele J, Lipman J, Sakr Y, Marshall JC, Vanhems P, Barrera Groba C, Leone M, Vincent J-L. Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 420

Dinarello CA. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock. *Chest* 1997; 112: 321S-329S

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003: *Crit Care Med* 2007; 35: 1244-1250

Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel DN. Differences in Innate Defense Mechanisms in Endotoxemia and Polymicrobial Septic Peritonitis. *Infect Immun* 2001; 69: 7271-7276

Fahlman C, Jacobsen FW, Veiby OP, McNiece IK, Blomhoff HK, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. *Blood* 1994; 84: 1528-1533

Feuerer M, Eulenburg K, Loddenkemper C, Hamann A, Huehn J. Self-Limitation of Th1-Mediated Inflammation by IFN-gamma. *J Immunol* 2006; 176: 2857-2863

Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence* 2014; 5: 143-153

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LAJ. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78–83

Frederiksen HR, Haukedal H, Freude K. Cell Type Specific Expression of Toll-Like Receptors in Human Brains and Implications in Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int* 2019: 1-18

Fultz MJ, Barber SA, Dieffenbach CW, Vogel SN. Induction of IFN- $\gamma$  in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol* 1993; 5: 1383-1392

Gauguet S, D'Ortona S, Ahnger-Pier K, Duan B, Surana NK, Lu R, Cywes-Bentley C, Gadjeva M, Shan Q, Priebe GP, Pier GB. Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect Immun* 2015; 83: 4003-4014

Gillrie MR, Zbytnuik L, McAvoy E, Kapadia R, Lee K, Waterhouse CCM, Davis SP, Muruve DA, Kubes P, Ho M. Divergent roles of Toll-like receptor 2 in response to lipoteichoic acid and *Staphylococcus aureus* in vivo. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1639-1650

Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Coussens NP, Dockstader W, Ramaswamy S, Weiss JP. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 4186-4191

Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. Characteristics of Clinical Sepsis Reflected in a Reliable and Reproducible Rodent Sepsis Model. *J Surg Res* 2011; 170: e123-e134

Graf J, Brunkhorst FM, Reinhart K. Sepsis - Langzeitfolgen und sozioökonomische Bedeutung. *Die Medizinische Welt - aus der Wissenschaft in die Praxis* 2007; 58: 31-314

Hardy KJ, Sawada T. Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 1021-1026

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52: 269-279

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621-636



Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745

Hilbert T, Steinhagen F, Senzig S, Cramer N, Bekeredjian-Ding I, Parcina M, Baumgarten G, Hoefft A, Frede S, Boehm O, Klaschik S. Vendor effects on murine gut microbiota influence experimental abdominal sepsis. *J Surg Res* 2017; 211: 126-136

Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005; 433: 523-527

Hoffmann JA. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 1999; 284: 1313-1318

Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835

Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist* 2004; 53: 10-28

Hoy YE, Bik EM, Lawley TD, Holmes SP, Monack DM, Theriot JA, Relman DA. Variation in Taxonomic Composition of the Fecal Microbiota in an Inbred Mouse Strain across Individuals and Time. *PLoS ONE* 2015; 10: e0142825

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 2009; 139: 485-498

Janeway CA, Medzhitov R. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 2002; 296: 298-300

Jiang W, Sun R, Wei H, Tian Z. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 17077-17082

Jørgensen JN, Laguna JS, Millán C, Casabuena O, Gracia MI. Effects of a Bacillus - based probiotic and dietary energy content on the performance and nutrient digestibility of wean to finish pigs. *Anim Feed Sci Technol* 2016; 221: 54-61

Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 107-146

Kalogridou-Vassiliadou D. Biochemical Activities of Bacillus Species Isolated from Flat Sour Evaporated Milk. *J Dairy Sci* 1992; 75: 2681-2686

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19: 24-32

Kernbauer E, Maurer K, Torres VJ, Shopsin B, Cadwell K. Gastrointestinal Dissemination and Transmission of Staphylococcus aureus following Bacteremia. *Infect Immun* 2015; 83: 372-378

Kim D, Kim JY. Anti-CD14 antibody reduces LPS responsiveness via TLR4 internalization in human monocytes. *Mol Immunol* 2014; 57: 210-215

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243-1254

Klaschik S, Tross D, Klinman DM. Inductive and Suppressive Networks Regulate TLR9-Dependent Gene Expression in Vivo. *J Leukoc Biol* 2009; 85 (5): 788-795

Krause K, Metz M, Makris M, Zuberbier T, Maurer M. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 477-484

Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. A Potential New Pathway for Staphylococcus aureus Dissemination: The Silent Survival of S. aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 2008; 3: e1409

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-1596

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock, DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198

Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 4615-4622

Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LAB, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 838-845

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Li H, Yao Y, Yao S, Dong N, Yu Y, Sheng Z. Potential role of JAK/STAT in regulating Toll-like receptor 2 gene expression in rats with postburn Staphylococcus aureus sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2003; 15: 139-142

Li M, Wu Y, Hu Y, Zhao L, Zhang C. Initial gut microbiota structure affects sensitivity to DSS-induced colitis in a mouse model. *Sci China Life Sci* 2018; 61: 762-769

Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest* 1990; 85: 731-738

Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G, Gesu G. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 363-369

Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, Holzmann B, Stier A, Ofegger K, Heidecke CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; 21: 505-511

Ma BW, Bokulich NA, Castillo PA, Kananurak A, Underwood MA, Mills DA, Bevins CL. Routine Habitat Change: A Source of Unrecognized Transient Alteration of Intestinal Microbiota in Laboratory Mice. *PLoS ONE* 2012; 7: e47416

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554

McCafferty J, Mühlbauer M, Gharaibeh RZ, Arthur JC, Perez-Chanona E, Sha W, Jobin C, Fodor AA. Stochastic changes over time and not founder effects drive cage effects in microbial community assembly in a mouse model. *ISME J* 2013; 7: 2116-2125

McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR. Transforming growth factor-beta and IL-1 beta act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 1993; 151: 970-978

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397

Merlino J, Siarakas S, Robertson GJ, Funnell GR, Gottlieb T, Bradbury R. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1788-1793

Metzler-Zebeli B, Lawlor P, Magowan E, Zebeli Q. Effect of Freezing Conditions on Fecal Bacterial Composition in Pigs. *Animals* 2016; 6: 18

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: New Perspectives on an Old Cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226: 205-218

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, MacVittie TJ, Parrillo JE. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169: 823-832

Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* 2015; 8: 1-16

Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 259-264

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-1172

Osuchowski MF, Connett J, Welch K, Granger J, Remick DG. Stratification is the key: Inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37: 1567-1573

Park DJ, Yun JC, Baek JE, Jung EY, Lee DW, Kim M-A, Chang S-H. Relapsing *Bacillus licheniformis* peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient. *Nephrology* 2006; 11: 21-22

Patel RT, Deen KI, Youngs D, Warwick J, Keighley MR. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 1994; 81: 1306-1308

Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 49-55

Pettilä V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Int Care Med* 2002; 28: 1220-1225

Poltorak A, Smirnova I, Liu M. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, Murphey ED, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 725-735

Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8<sup>+</sup> T cells into cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271-279

Saric J, Wang Y, Li J, Coen M, Utzinger J, Marchesi JR, Keiser J, VeselkovK, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Species Variation in the Fecal Metabolome Gives Insight into Differential Gastrointestinal Function. *J Proteome Res* 2008; 7: 352-360

Schabbauer G. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. *Drug Discov Today Dis Models* 2012; 9: e17-e21

Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunjaev SR, Weinstock GM, Bork P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* 2012; 493: 45-50

Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandlungen Dt. Kongresses für Innere Medizin* 1914; 31: 257-280

Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol* 2017; 17-20

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406-17409

Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 859-904

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 762-774

Shankar-Hari M, Harrison DA, Rubenfeld GD, Rowan K. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. *Br J Anaesth* 2017; 119: 626-636

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin

GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus D. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 775-787

Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar S, McCormick JK, Mele T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes* 2014; 7: 233

Skinner NA, Maclsaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 270-278

Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986

Sprung CL, Sakr Y, Vincent J-L, Gall J-RL, Reinhart K, Ranieri VM, Gerlach H, Fielden J, Groba CB, Payen D. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Int Care Med* 2006; 32: 421-427

Sugar AM, McCloskey RV. *Bacillus licheniformis* Sepsis. *JAMA* 1977; 238: 1180

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000; 408: 600-605



Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2004; 17: 1-14

Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Staphylococcus aureus* Infection. *J Immunol* 2000; 165: 5392-5396

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* 1999; 11: 443-451

Tang X, Orchard SM, Sanford LD. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behav Brain Res* 2002; 136: 555-569

Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, Umesaki Y, Wu H-SJ. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity* 2016; 44: 875-888

Thurn JR, Goodman JL. Post-traumatic ophthalmitis due to *Bacillus licheniformis*. *Am J Med* 1988; 85: 708-710

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 317-343

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-276

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 1989; 264: 10867-10871

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480-484

Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, Hotchkiss RS, Buchman TG, Coopersmith CM. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis: *Crit Care Med* 2009; 37: 1018-1023

Ubeda C, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Leiner I, Equinda M, Khanin R, Pamer EG. Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *J Exp Med* 2012; 209: 1445-1456

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-Dependent Mechanisms of Cell Stimulation by Bacterial Endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-457

Ulloa L, Tracey KJ. The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends Mol Med* 2005; 11: 56-63

Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H. Segmented Filamentous Bacteria Are Indigenous Intestinal Bacteria That Activate Intraepithelial Lymphocytes and Induce MHC Class II Molecules and Fucosyl Asialo GM1 Glycolipids on the Small Intestinal Epithelial Cells in the Ex-Germ-Free Mouse. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 555-562

Vincent J-L. Emerging therapies for the treatment of sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol* 2015; 28: 411-416

Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-775

Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall, J-R, Payen D. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344-353

Wang J, Basagoudanavar SH, Wang X, Hopewell E, Albrecht R, Garcia-Sastre A, Balachandran S, Beg AA. NF- $\kappa$ B RelA Subunit Is Crucial for Early IFN- Expression and Resistance to RNA Virus Replication. *J Immunol* 2010; 185: 1720-1729

Wang S-X, Wu W-C. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2016

Wells CL, Hess DJ, Erlandsen SL. Impact of the indigenous flora in animal models of shock and sepsis. *Shock* 2004;22: 562-568

Wang X, Quinn PJ. Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. in: Wang X, Quinn PJ, Hrsg. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010: S. 3–25

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity* 1997; 7: 837-847

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201

Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 2003; 31: 1808-1818

Witsell AL, Schook LB. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4754-4758

Wu H-J, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. *Immunity* 2010; 32: 815-827

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol* 2002; 169: 6668-6672

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 1144-1150

Yang YC, Tsai S, Wong GG, Clark SC. Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1988; 134: 292-296

Yoo C-H, Yeom J-H, Heo J-J, Song E-K, Lee S-I, Han M-K. Interferon  $\beta$  protects against lethal endotoxic and septic shock through SIRT1 upregulation. *Sci Rep* 2014; 4: 4220

Yimin, Kohanawa M, Zhao S, Ozaki M, Haga S, Nan G, Kuge Y, Tamaki N. Contribution of Toll-Like Receptor 2 to the Innate Response against *Staphylococcus aureus* Infection in Mice. *PLoS ONE* 2013; 8: e74287

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163: 1-5

Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer, K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998; 66: 2300-2309

## 9. Danksagung

Für die Unterstützung und Begleitung im Verlauf meiner Promotion möchte ich besonders danken:

Herrn PD Dr. med. Sven Klaschik für die Überlassung des Themas, für die freundliche und sachliche Kommunikation sowie einer exzellenten Unterstützung und dem Ansporn bei Fragen und Problembewältigungen.

Herrn PD Dr. med. Tobias Hilbert für die ausgezeichnete Betreuung und die konstruktiven Beiträge, vor allem bei der Durchsicht meiner Promotionsarbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Stilla Frede und Frau Susanne Schulz, für die Einarbeitung in verschiedene Methoden, ein offenes Ohr und die Unterstützung bei Versuchsdurchführungen.

Frau Prof. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding und Herrn Dr. med. Marijo Parcina für die Unterstützung und fachliche Anleitung während den mikrobiologischen Versuchen.

Frau Dr. med. Nina Cramer für die gute Zusammenarbeit insbesondere bei den Versuchen im HET.

Meiner Familie und meinen Freunden für fortwährende Unterstützung und Motivation.