

**Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Eberhard Karls Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Modulation proinflammatorischer Mechanismen
durch physiologische Darmbakterien am Beispiel
der durch *Yersinia enterocolitica* pYV induzierten
Interleukin-8-Sekretion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Matteo Quitadamo
aus
Ludwigsburg**

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Die Rolle der physiologischen Darmflora am Beispiel chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	1
1.1.1	Der Darm als Ort der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Immunsystem des Menschen	1
1.1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2	Der Einsatz probiotischer Bakterien zur Behandlung von Colitis	4
1.2.1	Definition probiotischer Bakterien	4
1.2.2	Voraussetzungen für die Wirksamkeit probiotischer Bakterien	6
1.2.3	Probiotische Mechanismen	7
1.2.4	Die Behandlung von Colitis mit probiotischen Bakterien	10
1.2.5	Sonstige Einsatzmöglichkeiten für probiotische Zubereitungen	12
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	13
2	<u>Material und Methoden</u>	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Zelllinien	17
2.1.4	Bakterienstämme	18
2.1.5	Chemikalien und Medien für Zellkulturen	18
2.1.6	Medien für Bakterienkulturen	19
2.1.7	Materialien für Apoptose-Versuche	21
2.1.8	Materialien für IL-8-ELISA	21

2.2	Methoden	22
2.2.1	Bakterienkulturen	22
2.2.1.1	Kultivierung von Bakterien für Infektionsversuche	22
2.2.2	Zellkulturen	23
2.2.2.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	23
2.2.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	24
2.2.2.3	Aussaat von HeLa-Zellen für Infektionsversuche	24
2.2.2.4	Infektion von HeLa-Zellen	24
2.2.3	Apoptose-Versuche	25
2.2.3.1	Prinzip der TUNEL-Methode	25
2.2.3.2	Prinzip der Durchflusszytometrie	25
2.2.3.3	Bestimmung der Apoptose-Induktion	26
2.2.4	ELISA: Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration in Zellkulturüberständen	28
2.2.4.1	Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA	28
2.2.4.2	Infektion von HeLa-Zellen zur IL-8-Induktion	29
2.2.4.3	Ablauf der IL-8-Messung mittels ELISA	29
2.2.5	Bestimmung der Adhäsion an bzw. Invasion in HeLa-Zellen durch Bakterien	30
2.2.6	Statistik	31
3	<u>Ergebnisse</u>	32
		32
3.1	Adhäsion an bzw. Invasion in HeLa-Zellen	32
3.2	Induktion von Apoptose	34
3.2.1	Nachweis der Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie	34
3.2.2	Nachweis der Apoptose-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie	37

3.3	Induktion von Interleukin-8 : Nachweis mittels ELISA	40
3.4	Modulation der durch <i>Y. enterocolitica</i> pYV induzierten IL-8-Sekretion: Nachweis mittels ELISA	42
3.5	Nachweis der Viabilität der HeLa-Zellen bei Infektion	48
3.6	Inhibition der Yersinien-Adhäsion bzw. -Invasion als möglicher Mechanismus der modulierten IL-8-Sekretion	52
4	<u>Diskussion</u>	54
4.1	Adhäsion und Invasion	56
4.1.1	Adhäsion	57
4.1.2	Invasion	58
4.2	Induktion von Apoptose	59
4.3	Induktion von Interleukin-8	60
4.4	Modulation proinflammatorischer Mechanismen am Beispiel der durch <i>Y. enterocolitica</i> pYV induzierten IL-8-Sekretion	62
4.4.1	Modulation der Yersinien-induzierten IL-8-Sekretion	64
4.4.2	Mechanismen der Yersinien-induzierten IL-8-Sekretion und mögliche Modulationsstellen für Bakterien der physiologischen Darmflora	66
4.5	Wertung der Daten im Hinblick auf ein Screening-Profil für probiotische Darmbakterien	72

4.6	Ausblick	73
5	<u>Zusammenfassung</u>	75
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	78
7	<u>Abkürzungen</u>	90
8	<u>Danksagungen</u>	94
9	<u>Lebenslauf</u>	95

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der physiologischen Darmflora am Beispiel chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

1.1.1 Der Darm als Ort der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Immunsystem des Menschen

Der Darm bietet mit ca. 100 – 400 m² eine breite Kontaktfläche zwischen menschlichem Organismus und Außenwelt¹¹⁰. Hier wird das Immunsystem mit einer riesigen Menge potentieller Antigene in Form von Mikroorganismen und Bestandteilen der Nahrung konfrontiert. Dabei besteht die besondere Leistung des gastrointestinalen Immunsystems darin, zwischen pathogenen Keimen, apathogenen Kommensalen sowie harmlosen Nahrungsbestandteilen zu differenzieren. Pathogene Keime müssen mit einer adäquaten Immunantwort bekämpft werden, die sich meist in einer Entzündung manifestiert. Auf harmlose Kommensale und Nahrungsbestandteile reagiert der Gastrointestinaltrakt mit sogenannter „oraler Toleranz“, da andernfalls eine überflüssige, unkontrollierte und chronische Entzündungsreaktion die Folge wäre, die den Organismus selbst schädigen würde.

Im Immunsystem des Darms lassen sich funktionell ein afferenter sowie ein efferenter Schenkel unterscheiden¹¹⁰. Der afferente Schenkel besteht aus Peyer-Plaques, Lymphfollikeln, M- sowie Epithelzellen. Zum efferenten Schenkel gehören die Lymphozyten der *Lamina propria* sowie intraepitheliale Lymphozyten¹¹⁰. Die Peyer-Plaques oder *Folliculi lymphatici aggregati* sind mehrere, zwei bis fünf cm große Verdickungen der Mukosa und Submukosa des terminalen Ileums, die sich gegenüber dem Mesenterialansatz ausbilden. Sie bestehen aus zahlreichen Lymphfollikeln (= B-Zell-Region) sowie parafollikulären T-Zell-Regionen¹²⁴. In der Epithelschicht oberhalb der Peyer-Plaques befinden sich die M-Zellen (*microfolded cells*). Sie tragen an ihrer Oberfläche schlanke Mikrofalten; basal bildet ihr Zelleib Taschen, in denen sich oft Lymphozyten und Makrophagen befinden¹²⁴. Aufgabe der M-Zellen ist die

Aufnahme von Antigenen aus dem Darmlumen und deren Transport in das unter ihnen gelegene lymphatische Gewebe¹¹⁰. Dort stehen unter anderem interdigitierende dendritische Zellen bereit, die als professionelle antigenpräsentierende Zellen angesehen werden. Die Lymphozyten der *Lamina propria* sowie intraepitheliale Lymphozyten nehmen die Effektorfunktionen (z. B. Bildung von sIgA) wahr und bilden somit den efferenten Schenkel¹²⁴. Ebenfalls zu erwähnen sind die α -Defensine 5 und 6, die in den Paneth-Körner-Zellen produziert werden und eine mikrobiozide Funktion erfüllen²⁹.

Epithelzellen, Makrophagen und insbesondere dendritische Zellen sind in der Lage, über sogenannte „*pattern-recognition receptors*“ (PRR) spezifische Strukturmoleküle von Mikroorganismen zu erkennen, welche als „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMP) bezeichnet werden¹. PAMPs sind beispielsweise Peptidoglykane, Lipoproteine, Lipopolysaccharide (gramnegative Bakterien) oder Teichonsäuren (grampositive Bakterien)²¹. Besonders wichtige PRRs sind die „*Toll-like receptors*“ (TLR) sowie die „*nucleotide binding site plus leucine-rich repeats*“ (NBS-LRR)²¹. Die Erkennung pathogener Mikroorganismen führt u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B⁵⁰. Dieses zytosolische Protein liegt normalerweise an einen Inhibitor gebunden vor. Zytokinvermittelt werden Proteinkinasen aktiviert, welche das Inhibitorprotein phosphorylieren; anschließend wird es ubiquitiniert und abgebaut. Die nun freigegebenen NF- κ B-Untereinheiten können daraufhin an die DNA binden und die Transkription proinflammatorischer Proteine stimulieren, so z. B. verschiedener Zytokine oder Adhäsionsmoleküle für die Migration von Entzündungszellen aus der Gefäßbahn⁵⁰.

In welcher Art und Weise es dem gastrointestinalen Immunsystem hierbei gelingt, Kommensale von pathogenen Keimen zu unterscheiden, wird noch nicht verstanden; es existieren jedoch verschiedene Hypothesen²¹. 1) Die Bakterien der normalen Flora könnten keine PAMPs bzw. die Darmepithelien keine PRRs exprimieren, 2) der direkte Kontakt zwischen Bakterien der Normalflora und apikalen Membranen des Darmepithels könnte ausbleiben, indem sich die Kommensale vornehmlich im Lumen bzw. in der Mukusschicht

oberhalb des Epithels aufhalten, 3) Kommensale könnten in der Lage sein, das Darmepithel dahingehend zu beeinflussen, dass proinflammatorische Signale herunterreguliert werden.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen gelten als Beispiel dafür, was geschieht, wenn dieses Gleichgewicht gestört wird.

1.1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen bezeichnet man den Morbus Crohn (MC) sowie die Colitis ulcerosa (CU). Es handelt sich in beiden Fällen um chronisch rezidivierende Erkrankungen, die sich als Schleimhautentzündung des Gastrointestinaltraktes manifestieren. Die Ätiologie ist nicht eindeutig geklärt, in beiden Fällen gilt jedoch eine genetische Prädisposition als gesichert; zudem werden unterschiedliche Umweltfaktoren diskutiert, die zum Ausbruch der Erkrankungen beitragen können (Ernährung, durchgemachte Infektionskrankheiten, orale Kontrazeptiva, Zigarettenkonsum beim Morbus Crohn)⁶⁷. Als Bindeglied zwischen genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren werden immunologische Dysfunktionen angesehen, was sowohl durch die Assoziation mit HLA-Typen als auch durch das Ansprechen auf immunsuppressive und immunmodulierende Medikamente unterstrichen wird¹¹².

Pathophysiologisch gelten beide Erkrankungen als überschießende Antwort des intestinalen Immunsystems auf luminal vorhandene Antigene, wobei das Hauptaugenmerk der physiologischen Darmflora sowie einer pathologisch erhöhten Permeabilität der Epithelbarriere im Darm gilt^{98,42}. Da die physiologische Darmflora stets vorhanden ist, wird postuliert, dass das Immunsystem des gesunden Darmes in der Lage ist, zwischen residenter, harmloser oder gar nützlicher Darmflora einerseits sowie pathogenen Keimen andererseits zu „unterscheiden“ (s. **Kap. 1.1.1**). Die immunologischen Prozesse im Darm stellen somit einen Balanceakt zwischen kontrolliert ablaufender Antwort auf die residente Flora einerseits sowie entzündlicher Antwort auf pathogene Keime andererseits dar. In diesem Zusammenhang wird auch vom Zustand einer „kontrollierten Entzündung“ gesprochen⁷⁶. Bei Patienten mit

chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist dieses Gleichgewicht nicht mehr vorhanden, der Darm unterhält durch eine überschießende Immunreaktion auf die Vielzahl vorhandener Antigene ein chronisches Entzündungsgeschehen.

Der Morbus Crohn kann den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen. Typisch ist dabei ein segmentaler Befall, wobei häufig das terminale Ileum betroffen ist (daher auch der Beiname „*Ileitis terminalis*“). Das Entzündungsgeschehen ist transmural, d.h. es sind alle Wandschichten des Darmes betroffen. Ebenfalls als typisch gelten verkäsende Granulome sowie Fistelbildung¹¹².

Das Entzündungsgeschehen bei der Colitis ulcerosa ist nicht segmental, sondern kontinuierlich und auf das Kolon begrenzt; typischerweise beginnt die Erkrankung distal und breitet sich nach proximal aus, wobei gelegentlich auch das terminale Ileum betroffen sein kann. Die Entzündung beschränkt sich hierbei auf *Tunica mucosa* sowie *Tela submucosa*, wobei Kryptenabszesse als typisches histologisches Merkmal gelten. Die Colitis ulcerosa gilt zudem als Präkanzerose und ist mit einem gehäuften Auftreten von Kolonkarzinomen bei den Betroffenen assoziiert¹¹¹.

1.2 Der Einsatz probiotischer Bakterien zur Behandlung von Colitis

1.2.1 Definition probiotischer Bakterien

Der Begriff „probiotisch“ leitet sich vom Griechischen „*pro bios*“ ab und bedeutet „für das Leben“. Den Terminus genau zu definieren ist schwierig, da die Definition dank immer neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse stetig erweitert wurde.

Bereits im Jahre 1906 bemerkte der französische Kinderarzt Tissier, dass im Stuhl von an Durchfall erkrankten Kindern bestimmte „bifide“ Bakterien nur in geringen Mengen nachzuweisen waren, während dieselben Bakterien im Stuhl gesunder Kinder in sehr viel größerem Ausmaß auftauchten¹¹⁸. Ähnliche Erfahrungen machte der deutsche Militärarzt Nissle, als er während des Ersten

Weltkrieges feststellte, dass der später nach ihm benannte Stamm *E. coli* Nissle 1917 in großen Mengen im Stuhl gesunder Soldaten nachzuweisen war. In den Fäzes von an Durchfall erkrankten Patienten konnte er jedoch nur in geringen Keimzahlen gefunden werden⁸. Der russische Nobelpreisträger Elie Metchnikoff stellte im Jahre 1907 die Hypothese auf, dass die lange Lebenszeit bulgarischer Bauern auf deren Verbrauch fermentierter Milchprodukte zurückzuführen sei und führte somit zum ersten Mal das Konzept dessen ein, was heute als „probiotisch“ bezeichnet wird³³.

Die erste Nennung des Begriffes erfolgte 1965 durch Lilly und Stillwell. Ihre Definition lautete: „Durch einen Mikroorganismus sezernierte Substanzen, die das Wachstum eines anderen stimulieren“⁵⁶. Der Begriff wurde somit zunächst auf von Mikroorganismen produzierte Substanzen und nicht auf die Mikroorganismen selbst bezogen. Parker erweiterte die Definition im Jahre 1974 und bezeichnete Probiotika als „Organismen und Substanzen, welche zur mikrobiellen Balance des Darmes beitragen“⁸². 1989 fügte Fuller die Viabilität der Mikroorganismen als Voraussetzung in eine neue Definition mit ein. Er bezeichnete ein Probiotikum als „einen lebenden mikrobiellen Nahrungszusatz, welcher durch Verbesserung der mikrobiellen Balance des Darmes das Wirtstier vorteilhaft beeinflusst“³¹. Im Jahre 1992 erfolgte durch Havenaar und Huis in't Veld eine weitere Verfeinerung der Begriffserklärung: „Eine viable Mono- oder Mischkultur von Mikroorganismen, welche bei Anwendung an Tier oder Mensch den Wirt durch Verbesserung der Eigenschaften der einheimischen Mikroflora vorteilhaft beeinflusst“³⁹. 1996 erschienen neue Definitionen, welche die positiven Auswirkungen probiotischer Keime nicht mehr nur auf die Balance der Darmflora beschränkten, sondern sie als allgemein gesundheitsfördernd einstufen. So definierte Salminen Probiotika als „eine lebende mikrobielle Kultur oder gezüchtetes Molkereiprodukt, welches die Gesundheit und Ernährung des Wirtes vorteilhaft beeinflusst“⁹³. Im Oktober 2001 fand im argentinischen Córdoba eine gemeinsam von der Organisation für Nahrung und Landwirtschaft (FAO) sowie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) abgehaltene Konferenz statt, die zum Ziel hatte, eine Einschätzung über

die wissenschaftliche Grundlage probiotischer Nahrungsmittel abzugeben²⁸. Für die Zwecke dieser Konferenz wurden Probiotika wie folgt definiert: „Lebende Mikroorganismen, welche bei Verabreichung in ausreichender Menge dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen verschaffen“. Im selben Jahr erschien die bis dahin differenzierteste Definition durch Schrezenmeir und de Vrese, die alle bekannten Voraussetzungen für die Definition des Begriffes wie folgt zusammenfassten:

„Eine Zubereitung von oder ein Produkt mit viablen, definierten Mikroorganismen in ausreichender Anzahl, welche (durch Implantierung oder Kolonisierung) die Mikroflora in einem Kompartiment des Wirtes verändern und hierdurch vorteilhafte gesundheitliche Auswirkungen in diesem Wirt ausüben“¹⁰⁰.

Die Autoren schlossen somit in ihrer Definition probiotische Produkte bzw. Zubereitungen mit ein und betonten neben der Viabilität der Mikroorganismen deren ausreichende Anzahl bei Verabreichung als notwendige Voraussetzung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Mikroorganismen folgende Voraussetzungen erfüllen müssen, um die Kriterien der gängigen Definitionen des Begriffes “probiotisch“ zu erfüllen:

- Es muss sich um Kulturen lebender Mikroorganismen handeln.
- Es handelt sich um definierte Gattungen, z. B. *Lactobacillus* oder *Bifidobacterium*.
- Sie müssen in ausreichender Anzahl verabreicht werden.
- Sie greifen in die Verhältnisse der normalen Mikroflora in einer Weise ein, die die Gesundheit des Wirtes positiv beeinflusst.

1.2.2 Voraussetzungen für die Wirksamkeit probiotischer Bakterien

Auf ihrem Weg von der oralen Aufnahme bis in den menschlichen Darm sind Mikroorganismen verschiedenen widrigen Umgebungsbedingungen ausgesetzt.

Diese gilt es für Probiotika zu überwinden, bis sie schließlich in den Darm gelangen und dort ihre Wirkungen entfalten können^{24,28}: Bereits vor der Aufnahme durch den Wirt müssen sie in der Lage sein, die industrielle Verarbeitung zu überleben und ihre Aktivität in den Transportvehikeln, in welche sie für den Verzehr eingearbeitet werden, aufrechtzuerhalten. Nach ihrer Aufnahme müssen sie die Passage durch den Magen überleben. Das dort herrschende saure pH-Milieu ist ein natürlicher Schutzmechanismus des Organismus, durch den Keime vor Erreichen des Darmtraktes in großer Zahl abgetötet werden. Um die Passage durch das Duodenum zu überstehen, müssen probiotische Bakterien zudem resistent gegenüber Gallenflüssigkeit sein; erst dann können sie lebend in den Darm ihres Wirtes gelangen. Dort müssen sie schließlich in der Lage sein, an die Oberfläche der Schleimhautepithelzellen zu adhären, und im intestinalen Milieu zu persistieren.

Die meisten im Handel befindlichen Probiotika sind Milchsäurebakterien, die auch physiologischerweise im menschlichen Darm vorkommen und zu den Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Streptococcus* gehören¹²². In den meisten Fällen dient dabei Joghurt als Transportvehikel. Andere Probiotika werden bereits in Kapseln verabreicht, so z. B. der Stamm *E. coli* Nissle 1917.

1.2.3 Probiotische Mechanismen

Gegenstand intensiver Forschung ist die Fragestellung, über welche konkreten Mechanismen probiotische Bakterien ihre vorteilhaften Wirkungen im Wirtsdarm entfalten. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Hypothesen betreffen die Konkurrenz um Bindungsstellen am Darmepithel, die Sekretion antimikrobieller Substanzen sowie die Stimulation und Modulation der Immunantwort.

Konkurrenz um Bindungsstellen am Darmepithel

Die Flora des menschlichen Darms umfasst mehr als 500 Spezies, wobei die Anzahl der vorhandenen Bakterienzellen ca. 95 % der Gesamtzellzahl im

menschlichen Körper ausmacht²⁴. Pathogene Keime, welche bis in den Darm gelangen, benötigen für ihre Persistenz Bindungsstellen am Schleimhautepithel, Nährstoffe, etc. Die riesige Menge bereits vorhandener Darmbakterien stellt für diese Keime eine natürliche Konkurrenz um diese Ressourcen dar. Diesen, durch natürliche Konkurrenz zwischen physiologischer Darmflora und pathogenen Keimen vermittelten Schutzmechanismus bezeichnet man als „Kolonisierungsresistenz“. Ein eindrückliches Beispiel, das die Bedeutung dieses Schutzmechanismus hervorhebt, ist das Bakterium *Clostridium difficile*: Wird die residente Darmflora im Rahmen einer Antibiotikatherapie (v.a. durch Clindamycin) abgetötet, kann es zur unkontrollierten Vermehrung dieses Keimes und zum Bild der antibiotikainduzierten „pseudomembranösen Colitis“ kommen.

Sekretion antimikrobieller Substanzen

Viele Bakterien produzieren Substanzen mit antimikrobieller Wirkung, die konkurrierende Spezies in deren Ausbreitung hemmen und somit dem jeweiligen Keim einen Vorteil bei der Sicherung seines Habitats verschaffen können. Als Prototyp gilt Colicin, ein Bakteriozin, welches von verschiedenen *Enterobacteriaceae* produziert wird⁸⁷. Zu diesen antimikrobiell wirksamen Substanzen zählt man⁴⁸:

- Toxine, die sowohl für den Wirt als auch für andere Bakterienspezies toxisch sein können. Beispielsweise haben Diphtherie- oder Tetanustoxine strukturelle Verwandtschaft mit den Colicinen.
- Bakteriolytische Enzyme, z. B. Lysostaphin
- Metabolische Nebenprodukte, z. B. organische Säuren oder Hydrogenperoxid
- Antibiotische Substanzen, z. B. Bacitracin
- Bakteriozine, z. B. Nisin

Die Stimulation und Modulation der Immunantwort

Es konnte vielfach gezeigt werden, dass probiotische Bakterien einen modulierenden Effekt auf das Immunsystem des Darmes besitzen. Unterschiedliche Forschungsgruppen berichteten hierbei über Effekte sowohl auf die humorale, zelluläre als auch die unspezifische Immunantwort.

Neumann *et al.* mono-assoziierten keimfreie Mäuse mit *Lactobacillus acidophilus* und stellten nach intravenöser Applikation gramnegativer Bakterien eine verbesserte Phagozytoseleistung der Makrophagen fest⁷⁴. Zudem konnten sie im Vergleich zu keimfreien Mäusen bei den mono-assoziierten Tieren doppelt so viele Kupfersche Sternzellen feststellen. Peltó *et al.* verabreichten im Rahmen einer doppelblinden Studie gegen Milch allergischen Patienten bzw. gesunden Individuen Milch mit oder ohne Zugabe von *Lactobacillus* GG und bestimmten die Expression von Phagozytoserezeptoren vor und nach Verabreichung⁸³. Bei den Milchallergikern verhinderte *Lactobacillus* GG einen signifikanten Anstieg in der Rezeptorexpression bei neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Bei den gesunden Probanden hingegen verursachte die Zugabe dieses Stammes einen signifikanten Anstieg der Rezeptorexpression bei neutrophilen Granulozyten. Hieraus schlossen die Autoren, dass *Lactobacillus* GG eine antiinflammatorische Immunomodulation bei den Allergikern bzw. eine Immunostimulation bei den Gesunden bedingte.

Auch über eine Modulation von Antikörperkonzentrationen wurde mehrfach berichtet. So beschrieben Perdigon *et al.* eine erhöhte Produktion von sIgA-sezernierenden Zellen während der Behandlung mit *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* und Joghurt⁸⁴. Matsuzaki *et al.* injizierten Mäusen intraperitoneal Ovalbumin und verabreichten ihnen anschließend hitzegetötete Bakterien der Spezies *Lactobacillus casei*, um den Einfluss auf die Produktion von IgE zu messen⁶⁵. Dabei stellte sich heraus, dass *L. casei* die IgE-Produktion im Serum der Mäuse inhibierte.

Vielfach untersucht wurde auch die Modulation der Zytokinexpression, so bei dendritischen Zellen oder Darmepithelien^{11,61,123}. Die Zytokinmuster, welche beispielsweise durch dendritische Zellen nach Antigenkontakt sezerniert werden, sind von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der

Immunantwort. So fördert beispielsweise Interleukin-12 in erheblichem Maße die Ausbildung einer inflammatorischen Th1-Antwort, welche u.a. durch die Aktivierung von NK-Zellen (*natural killer cells*) gekennzeichnet ist. Hohe Konzentrationen an Interleukin-10 hingegen begünstigen eine Th2- oder Th3-Antwort, womit antiinflammatorische Komponenten wie die Aktivierung von B-Zellen bzw. eine Unterdrückung der Immunantwort begünstigt werden.

Madsen *et al.* verabreichten Interleukin-10-defizienten Mäusen, die unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen-free* = nur durch apathogene Kommensale besiedelt) eine Colitis entwickeln, die probiotische Zubereitung VSL#3, die verschiedene Spezies der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* sowie *Streptococcus* enthält. Sie stellten hierbei fest, dass die Behandlung mit VSL#3 die Konzentrationen der durch die Darmmukosa sezernierten inflammatorischen Zytokine TNF- α sowie IFN- γ zu reduzieren vermochte. Bei den behandelten IL-10-defizienten Mäusen zeigte sich dabei eine Reduktion von Schleimhautulzera, epithelialen Hyperplasien sowie mononukleärer und neutrophiler Infiltrate ⁶¹.

1.2.4 Die Behandlung von Colitis mit probiotischen Bakterien

Wie bereits dargelegt, spielt die Darmflora in den Hypothesen zur Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine zentrale Rolle; ihr wird große Bedeutung bei der Induktion der unangemessenen und überschießenden Immunantwort zugesprochen ⁹⁸. Hierfür konnten von verschiedenen Forschungsgruppen vielfach Hinweise gefunden werden:

- Sowohl der Morbus Crohn als auch die Colitis ulcerosa sprechen auf eine Behandlung mit Breitbandspektrumantibiotika an ^{92,120}.
- Die Zusammensetzung der Darmflora bei gesunden Kontrollindividuen einerseits sowie erkrankten Patienten andererseits zeigt Unterschiede. Bei letzteren konnte in Biopsiematerialien eine höhere Anzahl von Bakterien festgestellt werden ^{105,106}.
- Bei einer Vielzahl von Infektionen während der Kindheit konnte eine erhöhte Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im

späteren Verlauf des Lebens gezeigt werden. Hierzu zählen u.a. Gastroenteritis, Tonsillitis und Infektionen des Respirationstraktes^{34,127}. Insbesondere *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* wurde in diesem Zusammenhang immer wieder genannt^{13,69}. Allerdings konnte dieser Zusammenhang von anderen Forschungsgruppen nicht bestätigt werden⁸⁹.

Der wichtigste Hinweis auf die Rolle der Darmflora zeigt sich jedoch in verschiedenen Tiermodellen. So untersuchten beispielsweise Waidmann *et al.* die Colitogenität verschiedener kommensaler Bakterien in Interleukin-2-defizienten, keimfreien Mäusen, die eine starke Tendenz zur Entwicklung einer Colitis besitzen^{123,107}. Dabei zeigte sich, dass IL-2-defiziente SPF-Mäuse eine Colitis entwickelten; dies war bei keimfreien Tieren nicht der Fall. Wurden die Tiere mit dem apathogenen Stamm *E. coli* mpk mono-kolonisiert, entwickelten sie ebenfalls eine Colitis, was im Falle einer Mono-Kolonisierung mit den als probiotisch eingestuften Stämmen *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* Nissle 1917 ausblieb. Wurden die Tiere nun mit *E. coli* mpk (colitogen) und *B. vulgatus* mpk (nicht colitogen) co-kolonisiert, blieb die Entwicklung einer Colitis ebenfalls aus. Die Anwesenheit von *B. vulgatus* mpk war also in der Lage, über einen unbekanntem protektiven Mechanismus die Entstehung einer Colitis zu verhindern.

Auch am Menschen wurde die Wirksamkeit probiotischer Mikroorganismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Rahmen von klinischen Studien bereits untersucht. Plein und Hotz verabreichten in einer doppelblinden, kontrollierten Studie zwanzig Patienten mit aktivem MC über einen Zeitraum von sieben Wochen entweder den probiotischen Hefepilz *Saccharomyces boulardii* oder ein Placebo⁸⁶. Dabei zeigte sich bei den mit *S. boulardii* behandelten Patienten eine signifikante Reduktion in der Häufigkeit des Stuhlganges sowie der Erkrankungsaktivität, welche bei den Placebo-behandelten Patienten nicht zu beobachten war.

Rembacken *et al.* verabreichten im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden Studie 116 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa entweder

Mesalazin (eine antiphlogistische Substanz) oder den probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917⁸⁸. Dabei stellte sich heraus, dass *E. coli* Nissle 1917 in einem der Behandlung mit Mesalazin äquivalenten Maße eine Remission herbeizuführen und aufrechtzuerhalten vermochte.

1.2.5 Sonstige Einsatzmöglichkeiten für probiotischen Zubereitungen

Abgesehen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde die Wirksamkeit probiotischer Mikroorganismen auch bei anderen Erkrankungen untersucht, wobei sich verschiedene weitere Anwendungsmöglichkeiten fanden:

- Patienten mit Laktoseintoleranz vertragen die in Joghurt enthaltene Laktose besser als diejenige in Milch. Einer der vermuteten Mechanismen ist die Laktosespaltung durch die im Joghurt vorhandenen Bakterien^{19,57,63}.
- Durch die Gabe von *Saccharomyces boulardii* war es möglich, die Dauer einer antibiotikaassoziierten Diarrhoe signifikant zu reduzieren⁵⁵.
- In verschiedenen Studien zeigte sich die Wirksamkeit von *Lactobacillus* spp. bei der Verkürzung sowie verminderten Häufigkeit von infektiöser Diarrhoe bei Kindern¹²¹.
- Die Verabreichung von *Lactobacillus acidophilus* während einer Bestrahlungstherapie verminderte in einer randomisierten und kontrollierten Studie die Häufigkeit von Diarrhoe⁹⁴.

Es muss jedoch betont werden, dass andere Forschungsgruppen die Wirksamkeit probiotischer Mikroorganismen nicht bestätigen konnten. So untersuchten Thomas *et al.* die Effizienz von *Lactobacillus* GG bei der Verhinderung von antibiotikaassoziierten Diarrhoe im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden Studie an 302 unter Antibiotikatherapie stehenden Patienten¹¹⁷. Die Patienten erhielten 14 Tage lang entweder 2×10^{10} koloniebildende Einheiten pro Tag *Lactobacillus* GG oder ein Placebo. In beiden Gruppen entwickelten knapp 30 % der Patienten eine Diarrhoe, womit kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Weitere untersuchte Einsatzgebiete mit teils gegensätzlichen, teils noch ausstehenden Ergebnissen betreffen z. B. Infektionen mit *Helicobacter pylori*, Darmkrebs, Reisediarrhoe und Allergien²⁸.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Frage, welchen Einfluss Bakterien der physiologischen Darmflora (insbesondere diejenigen mit probiotischen Eigenschaften) auf proinflammatorische Mechanismen ausüben; deren Modulation wird im Wirkungsprofil probiotischer Bakterien eine wichtige Rolle zugesprochen (s. **Kap. 1.2.3**). Als Modell wurde die Induktion des durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B regulierten, proinflammatorischen Chemokins Interleukin-8 (IL-8) durch das enteropathogene Bakterium *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ in HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen) gewählt, da die hieran beteiligten molekularen Mechanismen bereits gut beschrieben wurden^{35,45,102,104}. Auch die zentrale Rolle von IL-8 bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion im Darmmilieu konnte in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden^{26,49}. Zudem sollte untersucht werden, ob durch definierte *in vitro*-Parameter eine Einteilung von Darmbakterien in antiinflammatorisch oder probiotisch wirksam bzw. rein apathogen, aber nicht-probiotisch möglich sein würde. Bei den Versuchen sollte in mehreren Schritten vorgegangen werden:

1. Prüfung des Adäsionsvermögens der zu untersuchenden Testbakterien.

Die Fähigkeit zur Adhäsion an Wirtszellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion zwischen Bakterium und Wirt und ermöglicht den Mikroorganismen eine dauerhafte Persistenz in einem Wirtskompartiment. Dies gilt selbstverständlich sowohl für pathogene als auch für apathogene Stämme.

2. Nachweis, dass die Testbakterien selbst keine inflammatorischen oder toxischen Eigenschaften entfalten.

Hierzu sollte untersucht werden, ob die Testbakterien Zellen invadieren, sie zum Eintritt in den programmierten Zelltod (Apoptose) stimulieren oder die Sekretion von Interleukin-8 induzieren.

3. Untersuchung des Einflusses der Testbakterien auf die durch den Stamm *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion.

Die durch *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion wurde wie oben beschrieben als Modell einer proinflammatorischen Reaktion gewählt. Es sollte geprüft werden, inwieweit die Testbakterien diesen Mechanismus modulieren würden.

Die Experimente zur Adhäsion und Invasion der Testbakterien wurden im Rahmen einer Vorversuchsreihe von Frau cand. med. Sandra Kovačević durchgeführt; ihre Ergebnisse werden an entsprechender Stelle mit aufgeführt.

Verschiedene Autoren haben sich bereits mit der Fragestellung beschäftigt, über welche Selektionskriterien probiotische Bakterien als solche zu definieren sind^{24,119}. Allerdings galt hierbei das Hauptaugenmerk meist bekanntermaßen probiotischen Stämmen und der Fragestellung, welche Voraussetzungen diese erfüllen müssen, um an ihren Wirkort im Darm zu gelangen sowie den allgemeinen Mechanismen, über welche sie dort ihre für den Wirt vorteilhaften Wirkungen entfalten (s. **Kap. 1.2.2** sowie **1.2.3**). In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen drei unterschiedliche Gruppen von Bakterienstämmen gewählt (s. Kapitel „Material und Methoden, **Tab. 2.1**):

- Aus den Fäzes gesunder Erwachsener isolierte anaerobe und mikroaerophile Stämme der Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides* sowie *Veillonella*. Diese sollten auf mögliches probiotisches Potential hin untersucht werden.

- Darmkommensale der Gattung *E. coli*, die kein probiotisches Potential besitzen (*E. coli* mpk sowie *E. coli* K12).
- Der als probiotisch eingestufte Stamm *E. coli* Nissle 1917 sowie dessen Komplementante *E. coli* Nissle::*wzy*⁵³⁶. Bei ersterem ist die durch das Gen *wzy* kodierte O-Antigen-Polymerase aufgrund einer Punktmutation defekt, weswegen das O-Polysaccharid verkürzt ist. In letzteren wurde über ein Plasmid die O-Antigen-Polymerase des Stammes *E. coli* 536 eingeschleust³⁸. Die Komplementante enthält somit ein vollständiges Lipopolysaccharid.

Der Vergleich zwischen diesen drei Gruppen im Hinblick auf die zu untersuchenden *in vitro*-Parameter sollte Aufschluss bezüglich der oben erwähnten Fragestellung nach einem Screening-Profil zur Unterscheidung probiotischer von nicht-probiotischen Darmkommensalen geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Festwinkel-Rotor-Zentrifuge (Biofuge Stratos)	Heraeus, Hanau
Ausschwingrotor-Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Heraeus, Hanau
Mini-Tisch-Zentrifuge (MiniSpin plus)	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Carl Zeiss, Jena
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
Pipettier-Hilfe	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen
Steril-Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Spectrophotometer (Ultrospec 3000 pro)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Washer (Columbus Wascher)	Tecan, Crailsheim
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
Anaerobier-Topf	E. Merck, Darmstadt
Anaerobier-Beutel	Oxoid, Hants, UK
Anaerotest-Indikatorstäbchen	E. Merck, Darmstadt
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Leica TCS SP2 AOBS Filter-free Special Confocal and Multiphoton Microscope	Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
ELISA-Platten (<i>Nunc-ImmunoTM Plate</i> <i>MaxisorpTM Surface</i>)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden)	Greiner, Nürtingen
Pipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, WI, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt, Berlin
Rundboden-Röhrchen (13 ml)	Greiner, Nürtingen
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (80, 175 cm ²)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläser, 12 mm Durchmesser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

2.1.3 Zelllinien

HeLa 229 (Epithel-Zellen eines Zervix- karzinoms)	ATCC, Rockville, MD, USA
--	--------------------------

2.1.4 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

<i>Yersinia enterocolitica</i> pYV ⁻ ("WA-C")	Heesemann ⁴⁰
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Deutsche Stammsammlung (DSM) 6601
<i>E. coli</i> Nissle::wzy536	Grozdanov <i>et al.</i> ³⁸
<i>E. coli</i> mpk	Waidmann <i>et al.</i> ¹²³
<i>E. coli</i> K12	Laborstamm
<p>Aus den Fäzes gesunder Erwachsener isolierte und von Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke zur Verfügung gestellte Wildtypstämme:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (<i>B. adolescentis</i>) • <i>Lactobacillus fermentum</i> (<i>L. fermentum</i>) • <i>Streptococcus salivarius salivarius</i> (<i>S. salivarius</i>) • <i>Bacteroides vulgatus</i> (<i>B. vulgatus</i>) • <i>Bacteroides distasonis</i> (<i>B. distasonis</i>) • <i>Veillonella atypica</i> (<i>V. atypica</i>) 	

2.1.5 Medien und Chemikalien für Zellkulturen

VLE RPMI 1640 (Zellkulturmedium)	Gibco BRL, USA
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Antibiotika:	
• Ampicillin [100 mg/ml]	Biosciences Inc., La Jolla, Ca, USA
• Gentamicin [10 mg/ml]	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
• Penicillin/Streptomycin [10.000 units/ml]	Gibco BRL, USA
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) Dulbecco	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Tab. 2.2: HeLa-Zellkulturmedium

VLE RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gln + 1 % Pen-Strep	Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> • 500 ml VLE RPMI 1640 • 50 ml Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert • 5 ml 200 mM L-Glutamin • 5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 units/ml]
--	--

2.1.6 Medien für Bakterienkulturen

Tab. 2.3: Bakterienkulturmedien

LB (Luria-Bertani)-Medium	Zusammensetzung: <ul style="list-style-type: none"> • 10 g/l Trypton • 5 g/l Hefeextrakt • 10 g/l Natriumchlorid <p>Fertigpulver von Fa. Becton Dickinson, Heidelberg</p>
BHI (<i>brain-heart-infusion</i>)-Medium	Zusammensetzung: <ul style="list-style-type: none"> • 27,5 g/l Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone) • 2,0 g/l D(+)-Glucose • 5,0 g/l Natriumchlorid • 2,5 g/l di-Natriumhydrogenphosphat <p>Fertigpulver von Fa. Merck, Darmstadt</p>
CMC (<i>chopped-meat-carbohydrate</i>)-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • 500 g Rindertartar + 1 l Aqua dest. + 25 ml 1 N NaOH: 1 h bei 100°C kochen, Überstand abnehmen, Fleisch trocknen. • Zugabe von: 1 l voll entsalztem

	<p>H₂O + 30 g Tryptose + 0,3 % Fleischextrakt + 5 g Hefeextrakt + 5 g K₂HPO₄ + 1 ml Rasazurin- Lsg. [1 mg/ml] + 0,5 g Cystein + 10 ml Haemin-Lsg [5 mg/ml]; pH auf 7,0 einstellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Autoklavieren, dann Zugabe von 0,4 % Glucose + 0,1 % Cellobiose + 0,1 % Maltose + 0,1 % Stärke + 0,1 ml Vitamin-K1 [10 mg/ml] • Fleischstückchen werden in Glaskolben aliquotiert, Zugabe der zubereiteten Brühe • 2 h in Autoklav
CIN- (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)- Agar-Platten	<ul style="list-style-type: none"> • Agar-Basis: <ul style="list-style-type: none"> - 20,0 g/l Spezial-pepton - 2,0 g/l Hefeextrakt - 20,0 g/l Mannit - 2,0 g/l Natriumpyruvat - 1,0 g/l Natriumchlorid - 0,01 g/l Magnesiumsulfat - 0,5 g/l Natriumdesoxychola - 0,03 g/l Neutralrot - 0,001 g/l Kristall-violett - 1,25 g/l Agar <p>pH 7,4 +/- 0,2</p> • <i>Yersinia</i>-Selektiv-Supplement: nach Herstellerangaben Fertigpulver von Fa. Oxoid, Hants, UK

2.1.7 Materialien für Apoptose-Versuche

Tab. 2.4: Chemikalien und Lösungen für Apoptose-Versuche

<i>In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton X-100 in 0,1 % Natrium-Citrat
Paraformaldehyd 4 %	4 ml Paraformaldehyd, 96 ml voll entsalztes H ₂ O (in Autoklav auf ca. 60°C erhitzt und mehrere Stunden gerührt)
Staurosporin	0,1 mg Staurosporin + 214 µl DMSO (jeweils Sigma-Aldrich, Deisenhofen) – Enkonzentration: 1 mM
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl)	E. Merck, Darmstadt
Fluoroprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich

2.1.8 Materialien für IL-8-ELISA

PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	E. Merck, Darmstadt
Substanz A (Streptavidin)	Dako, Neuss
Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase)	Dako, Neuss
Antikörper:	PharMingen, San Diego, CA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Purified anti-human IL-8</i> • <i>Biotinylated mouse anti-human IL-8</i> 	
Rekombinantes humanes IL-8	PharMingen, San Diego, CA, USA

Tab. 2.5 Puffer und Lösungen für IL-8-ELISA

Adsorptionspuffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ , pH 9,0, steril
Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20
Blockingpuffer	PBS + 10 % FKS
Detektionspuffer	PBS + 10 % FKS + 0,05 % Tween 20
Konjugat	<ul style="list-style-type: none"> • 5 µl Substanz A (Streptavidin) • 5 µl Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) • 490 µl PBS Mischen, 30 min inkubieren und mit PBS auf ein Volumen von 25 ml auffüllen
Substratpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05 M Na₂CO₃ • 0,05 M NaHCO₃ • 1 mM MgCl₂ pH 9,8
Entwicklerlösung	1 mg PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat) pro ml Substratpufferlösung

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkulturen

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien für Infektionsversuche

Zu den verwendeten Bakterienstämmen siehe **Tab. 2.1**.

Bei aeroben Bakterien wurde am Tag vor der geplanten Infektion eine Flüssigkultur in 2 ml LB-Medium angelegt. Diese wurde über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. 27°C (*Yersinia*) inkubiert. Am Infektionstag wurden die Bakterien verdünnt und subkultiviert, um sie in die Phase des exponentiellen Wachstums zu überführen.

Bei anaeroben und mikroaerophilen Keimen wurden die Kulturen über zwei bis drei Tage in 5 - 10 ml BHI- oder CMC-Flüssig-Medium unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am Infektionstag wurden die Bakterien mit PBS gewaschen und in frischem PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde die optische Dichte bestimmt, wobei eine OD_{600nm} von 1 einer Konzentration von $\sim 5 \times 10^8$ Bakterien pro ml entspricht. Die Bakterien konnten anschließend in der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) in die Proben gegeben werden. Die MOI wurde durch serielles Ausplattieren auf ihre Richtigkeit hin kontrolliert.

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Für alle Experimente wurden Zellen der Linie HeLa 229 verwendet; dies sind für Forschungszwecke eingesetzte Epithelzellen eines Zervixkarzinoms.

Die Zellen wurden hierfür in 175-cm²-Zellkulturflaschen überführt, als Nährmedium wurden 30 ml VLE RPMI 1640 hinzugegeben, welches zusätzlich 10 % fetales Kälberserum, 1 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin-/Streptomycin-Mischung enthielt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert bis ein konfluenter Zellrasen auf dem Flaschenboden entstand. Nach Absaugen des Mediums sowie Spülen des Zellrasens mit 20 ml PBS-Lösung wurden 5 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben, welches durch ca. fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur die Adhäsionsproteine der Zelloberflächen spaltet und somit die Zellen in Lösung überführt. Das Trypsin/EDTA wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 400 g und 21°C von dem Zellmedium getrennt. Die hierdurch gewonnenen Zellen wurden je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen überführt und weiterkultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl lebender Zellen pro ml der verwendeten Suspensionen zu bestimmen, wurde die Zellpopulation einer Zellkulturflasche wie in **Kap. 2.2.2.1** dargelegt geerntet. Nach Zentrifugation sowie Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde mit Trypan-Blau eine 1:10-Verdünnung hergestellt und mit einer Neubauer-Kammer (Kammerfaktor 1×10^4 Zellen/ml) ausgezählt. Die nicht blau gefärbten (= lebenden) Zellen in einem Großquadrat (= 4×16 Kleinquadrate) wurden ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt. Dieses wurde mit dem Kammer- sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl pro ml Lösung zu bestimmen.

2.2.2.3 Aussaat von HeLa-Zellen für Infektionsversuche

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen wie in **Kap. 2.2.2.1** und **2.2.2.2** dargelegt geerntet und ausgezählt. Anschließend wurde die gewünschte Menge Zellsuspension in 24- bzw. 6-well-Platten ausgesät. In die 24-well-Platten wurden dabei 1 ml Zellsuspension mit einer absoluten Zahl von 5×10^4 , in die 6-well-Platten 4 ml Zellsuspension mit einer absoluten Zahl von 5×10^5 Zellen pro well gegeben. Die Zellkulturplatten wurden dann bis zum folgenden Tag der Infektion im Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

2.2.2.4 Infektion von HeLa-Zellen

Zur Anzucht der Bakterienkulturen für die Infektion siehe **Kap. 2.2.1.1**.

Am Infektionstag wurden die HeLa-Zellen vor der Infektion mit PBS gewaschen und 1 ml (24-well-Platten) bzw. 2 ml (6-well-Platten) frisches, antibiotikafreies Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Bakterien wurden anschließend entsprechend der gewünschten MOI in die wells gegeben. Im Anschluß an die Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Zur Abtötung eventuell noch an den Zelloberflächen adhärierender Bakterien wurden 10 μl Antibiotikum pro ml

Zellkulturmedium hinzugegeben. Hierzu wurden Gentamicin (*E. coli*, *Yersinia*) bzw. Ampicillin (anaerobe und mikroaerophile Stämme) verwendet.

2.2.3 Apoptose-Versuche

2.2.3.1 Prinzip der TUNEL-Methode

Während des Vorgangs der Apoptose („programmierter Zelltod“) wird die zelluläre DNA gespalten, wobei sowohl ein- als auch zweisträngige DNA-Fragmente entstehen. Die Bruchstellen können in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden, indem freie 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden markiert werden (zur Markierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff *TMR red* verwendet). Das verwendete „*In Situ Cell Death Detection Kit*“ enthält hierzu das Enzym Terminale Deoxynukleotidyltransferase, welches im Rahmen der sogenannten TUNEL-Reaktion (= *TdT-dUTP terminal nick-end labeling*) markierte Nukleotide an freie 3'-OH-Enden knüpft. Anschließend werden die markierten Nukleotide entweder mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie detektiert.

2.2.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Einzelzellen nach fluoreszenzoptischen oder physikalischen Parametern erfasst, quantifiziert sowie sortiert werden. Ein Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeitssystem, mit welchem zu charakterisierende Zellen der Optik zugeführt und im Messpunkt konzentriert werden, einer Optik (Laser) zur Anregung und Detektion der Zellen sowie einem Datenverarbeitungssystem zur Umwandlung der optischen in elektronische Signale.

Mit Hilfe dieser Vorrichtung ist es möglich, Zellen aufgrund verschiedener Merkmale zu charakterisieren: Die relative Zellgröße kann mit Hilfe des Vorwärtsstreulichtes (Lichtbeugung) erfasst werden, wobei die Messung entlang der Achse des einfallenden Lichtes erfolgt und sich proportional zur Zellgröße verhält. Die relative Granularität wird durch das Seitwärtsstreulicht (Lichtbrechung und Reflexion) detektiert; sie wird in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht gemessen und verhält sich proportional zur Zellgranularität.

Die relative Fluoreszenz der zu untersuchenden Zellen ist proportional zu der Anzahl an deren Oberfläche gebundener, fluoreszierender Moleküle.

Die verwendete Lichtquelle arbeitete bei 488 nm; die Auswertung erfolgte über Punktwolkendiagramme („dot plots“).

2.2.3.3 Bestimmung der Apoptose-Induktion

Bei diesen Versuchen erfolgte sowohl eine durchflusszytometrische als auch eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Ansätze wurden 5×10^4 HeLa-Zellen in 24-well-Platten auf Deckgläsern von 12 mm Durchmesser ausgesät. Für die durchflusszytometrischen Ansätze erfolgte die Aussaat von 5×10^5 HeLa-Zellen in 6-well-Platten (Vorgehensweise jeweils gemäß **Kap. 2.2.2.3**).

Am zweiten Versuchstag wurden die Zellen gemäß **Kap. 2.2.2.4** infiziert und anschließend für 4 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1 µM Staurosporin (Endkonzentration), in die Negativkontrolle wurden 10 µl PBS pro ml Medium hinzugegeben. Staurosporin inhibiert mittels Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle eine Vielzahl von Kinasen und aktiviert einen bcl-2-regulierten Signaltransduktionsweg, der zur Apoptose der Zelle führt. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Zellmedium sowie Antibiotika zur Abtötung adhärenter Bakterien hinzugegeben. Die Zellkulturplatten wurden anschließend 18 h bei 37°C inkubiert.

Am dritten Versuchstag wurde mit den Ansätzen für die Fluoreszenzmikroskopie bzw. Durchflusszytometrie in getrennter Weise wie folgt verfahren:

Fluoreszenzmikroskopie:

1. Die Zugabe des Staurosporins in das well für die Positivkontrolle führte zur Abtötung eines Großteils der Zellen, die nun frei im Medium flottierten. Daher wurden die Zellkulturplatten zunächst bei 400 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, um die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie wieder in unmittelbarem Kontakt mit den Deckgläsern zu bringen.

- Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.
2. Danach wurden die Zellen durch einstündige Inkubation mit je 500 µl 4%igem Paraformaldehyd pro well bei Raumtemperatur fixiert.
 3. Nach Ablauf der Stunde wurde jedes Deckglas mehrmals in PBS gewaschen, mit der Zellseite nach unten in je 25 µl Permeabilisierungslösung gegeben und 1 min bei -20°C inkubiert. Ziel dieses Schrittes was es, mit Hilfe der Lösung die Zellmembranen durchlässig für die nachfolgenden Färbeschritte zu machen.
 4. Anschließend wurden die Deckgläser wieder mehrmals in PBS gewaschen und mit der Zellseite nach unten in je 20 µl TUNEL-Reaktionslösung gelegt. Diese wurde nach den Angaben des „*In Situ Cell Detection Kits*“ hergestellt („*enzyme solution*“ und „*label solution*“ im Verhältnis 1:10).
 5. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, anschließend wieder mehrmals in PBS gewaschen, mit der Zellseite nach unten in je 25 µl 1:10-verdünntes DAPI gelegt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Blaufärbung der Zellkerne und somit als Kontrolle der vorhandenen Gesamtzellzahl auf den Deckgläsern.
 6. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläser schließlich mit der Zellseite nach unten in Fluoroprep (einem fluoreszenzerhaltenden Eindeckmedium) auf Objektträgern fixiert. Diese wurden bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanmikroskop.

Durchflusszytometrie:

1. Zunächst wurden die Zellen mittels Zellschabern vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und die Zellsuspension bei 400 g und 21°C für 5 min in Rundboden-Röhrchen zentrifugiert. Das anschließende Vorgehen war analog zu den fluoreszenzmikroskopischen Ansätzen:

2. Nach Absaugen des Überstandes wurden in die Röhren je 500 µl 4%iges Paraformaldehyd gegeben. Das Zellpellet wurde mit einer Pipette im Paraformaldehyd gelöst und 1 h inkubiert. Danach wurden die Proben in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und die gewonnenen Zellpellets in 200 µl PBS gelöst. Diese Lösung wurde zur schnelleren Durchführung der nachfolgenden Färbeschritte in eine 96-well-Platte überführt.
3. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden je 25 µl Permeabilisierungslösung in die wells gegeben und die Zellen 1 min bei -20°C inkubiert.
4. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen mit je 20 µl TUNEL-Reaktionslösung für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert, nochmals gewaschen und zentrifugiert.
5. Anschließend erfolgte die Inkubation in 25 µl 1:10-verdünntem DAPI für 5 min bei 4°C.
6. Im letzten Schritt wurden die Zellen (nach erneutem Waschen und Zentrifugieren) wieder in Rundboden-Röhren überführt und dort in 500 µl PBS gelöst. Mittels dieser Zellsuspension erfolgte die Auswertung am Durchflusszytometer.

2.2.4 ELISA: Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration in Zellkulturüberständen

2.2.4.1 Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA

Der „*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) ist eine auf Antigen-Antikörper-Reaktion basierende immunologische Methode, um selbst geringste Konzentrationen eines Proteins nachweisen zu können. Dabei fungiert das zu messende Molekül als Antigen, welches durch spezifische Antikörper detektiert werden kann.

Im ersten Schritt wird hierzu der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper (sogenannter „*capture antibody*“) beschichtet. Anschließend werden die Zellkulturüberstände mit den zu detektierenden Molekülen hinzugegeben, welche an die Antikörper binden. Im letzten Schritt wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (sogenannter „*detection*“)

antibody“) hinzugegeben, welcher ebenfalls an das zu detektierende Molekül bindet und gleichzeitig eine Farbreaktion katalysiert. Die Intensität der hervorgerufenen Farbreaktion verhält sich hierbei proportional zu der Konzentration des zu messenden Moleküls. Unter Zuhilfenahme einer Standardkurve, welche mit rekombinanten Zytokinen erstellt wird, kann schließlich die absolute Konzentration ermittelt werden.

2.2.4.2 Infektion von HeLa-Zellen zur IL-8-Induktion

Zunächst wurden im Rahmen eines Infektionsversuches Zellkulturüberstände gewonnen. Am ersten Versuchstag erfolgte die Aussaat von 5×10^4 Zellen pro Ansatz in 24-well-Platten gemäß **Kap. 2.2.2.3**, am zweiten Tag wurden die Zellen wie in **Kap. 2.2.2.4** dargelegt infiziert.

Als Positivkontrolle diente hierbei der Bakterienstamm *Yersinia enterocolitica* pYV (MOI 20), der ein hohes Induktionspotential für Interleukin-8 besitzt. In die Negativkontrolle wurden 10 µl PBS pro ml Medium hinzugegeben. Nachdem die Bakterien in den gewünschten MOIs in die wells hinzugegeben worden waren, wurden die Zellkulturplatten für 2 min bei 300 g und 21°C zentrifugiert, um einen möglichst sofortigen Kontakt zwischen Bakterien und Zellen zu ermöglichen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen schließlich mit PBS gewaschen sowie frisches Zellkulturmedium und Antibiotikum hinzugegeben. Im letzten Schritt wurden die Zellen für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert, anschließend die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Ablauf der IL-8-Messung mittels ELISA

Zu den verwendeten Puffern und Lösungen siehe **Tab. 2.5**.

Zunächst wurde eine ELISA-Platte mit dem monoklonalen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei in jedes well 50 µl eines Adsorptionspuffers gegeben wurde, der eine Primärantikörperkonzentration von 3 µg/ml in 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 9,0) enthielt. Am nächsten Tag wurde die Platte nach viermaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer mit je 200 µl Blockingpuffer pro well für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Platte wieder viermal gewaschen und je

100 µl der vorher aufgetauten und gemischten Zellkulturüberstände in die wells gegeben. Rekombinantes, humanes IL-8 in verschiedenen Konzentrationen (12,5 – 800 pg/ml), welches zuvor in Zellkulturmedium verdünnt worden war, diente hierbei als Referenz zur Erstellung der Standardkurve bei der photometrischen IL-8-Bestimmung. Die ELISA-Platte wurde dann nochmals über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten und letzten Tag wurden nach viermaligem Waschen 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers [0,5 µg/ml] in Detektionspuffer in jedes well pipettiert und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden je 50 µl Konjugat (setzt das P-Nitrophenyl-Phosphat in der Entwicklerlösung um) in jedes well gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nach einem letzten viermaligen Waschschrift 50 µl Entwicklerlösung in jedes well pipettiert und die Platte für ca. 15 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration mit dem ELISA-Photometer bei 405 nm bei einer Referenzwellenlänge von 490 nm.

2.2.5 Bestimmung der Adhäsion an bzw. Invasion in HeLa-Zellen durch Bakterien

Am ersten Versuchstag erfolgte die Aussaat von 5×10^4 Zellen pro Ansatz in 24-well-Platten gemäß **Kap. 2.2.2.3**, am zweiten Tag wurden diese gemäß **Kap. 2.2.2.4** infiziert.

Als Positivkontrolle diente der Stamm *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ in einer MOI von 100, in die Negativkontrolle wurden 10 µl PBS pro ml Medium hinzugegeben. Auch bei den Testbakterien betrug die MOI jeweils 100. Im weiteren Verlauf wurde mit den Versuchsansätzen in getrennter Weise wie folgt vorgegangen:

Adhäsion:

Die Inkubationszeit nach erfolgter Infektion betrug 30 min. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Bakterien zu entfernen und 10 min in 1 ml Aqua dest. steril (4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch mit Pipettenspitzen vom Boden der Zellkulturplatte gelöst

und von der Zellsuspension serielle Verdünnungsreihen hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden je 100 µl auf CIN-Agar-Platten (Yersinien-Selektiv-Nährböden) ausplattiert und für 2 Tage bei 27°C inkubiert.

Invasion:

Die Inkubationszeit nach erfolgter Infektion betrug 1 h. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 1 ml Zellkulturmedium sowie Antibiotikum in jedes well gegeben, um adhärente, nicht invadierte Bakterien abzutöten. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und 10 min in 1 ml Aqua dest. steril (4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch mit Pipettenspitzen vom Boden der Zellkulturplatte gelöst. Um die Zellen endgültig zu lysieren und somit intrazelluläre Bakterien freizugeben, wurde die Lösung in eine Spritze aufgezogen und dreimal durch eine Heparinkanüle (Größe 20) gedrückt. Zuletzt wurde von der Lösung eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt; von jeder Verdünnung wurden je 100 µl auf CIN-Agar-Nährboden ausplattiert und für 2 Tage bei 27°C inkubiert.

Nach 2 Tagen wurden die Platten begutachtet und eine Verdünnungsstufe repräsentativ für die Auswertung ausgesucht. Hierzu wurde die Anzahl sichtbarer Kolonien auf jeder Platte bestimmt.

2.2.6 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Bei den in der Arbeit aufgeführten Daten handelt es sich entweder um Mittelwerte aus drei Einzelversuchen oder um repräsentative Einzelversuche in Dreifachbestimmung. Die Bewertung der Datensignifikanz erfolgte über den Student-t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte. Eine Differenz zwischen den Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen¹³¹.

3 Ergebnisse

3.1 Adhäsion an bzw. Invasion in HeLa-Zellen

Im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit, die von Frau cand. med. Sandra Kovačević durchgeführt wurden, war geprüft worden, in welchem Ausmaß die zu untersuchenden Testbakterien an HeLa-Zellen adhäreren bzw. sie invadieren. Ihre Ergebnisse werden zur Vervollständigung der Daten an dieser Stelle mit aufgeführt (s. **Abb. 3.1** und **3.2**).

Als Positivkontrolle in den Versuchen diente *Yersinia enterocolitica* pYV; die MOI betrug für alle Bakterien jeweils 100. In den nachstehenden Diagrammen wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) adhärenter bzw. invadierter Yersinien in der Positivkontrolle jeweils als 100 % definiert, die Werte für die Testbakterien wurden hierzu in Verhältnis gesetzt.

Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass die Testbakterien im Vergleich zu *Y. enterocolitica* pYV nur ein verschwindend geringes Maß an Invasion in die infizierten HeLa-Zellen zeigten (s. **Abb. 3.2**). Eine leichte Invasivität war lediglich bei *B. adolescentis* zu beobachten, wobei auch hier die Anzahl invadierter Zellen signifikant niedriger als in der Positivkontrolle lag. Hiermit konnte der apathogene Charakter der Testbakterien im Hinblick auf invasives Verhalten bestätigt werden.

Die Fähigkeit zur Adhäsion war in geringem Maße vorhanden, jedoch deutlich niedriger ausgeprägt als bei *Y. enterocolitica* pYV (s. **Abb. 3.1**).

Adhäsion

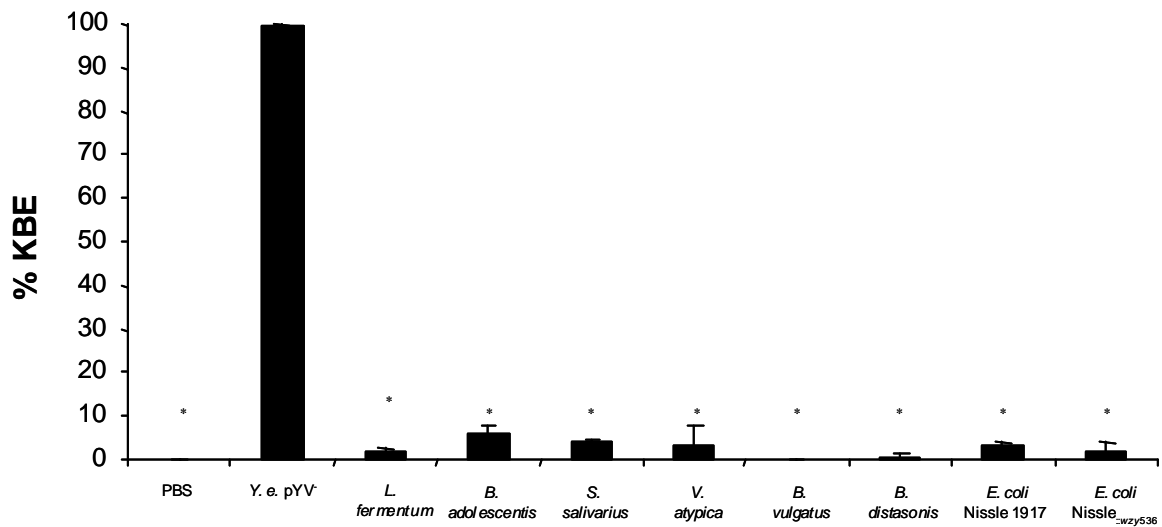


Abb. 3.1: Adhäsion der Testbakterien an HeLa-Zellen. Die MOI beträgt jeweils 100. In dieser Darstellung wurde die Positivkontrolle (= Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV) als 100 % definiert, die Anzahl koloniebildender Einheiten der Testbakterien wurde hierzu in Verhältnis gesetzt. Negativkontrolle: PBS. Es wird ersichtlich, dass die Teststämme im Vergleich zur Positivkontrolle nur sehr gering adhären. Versuchsergebnisse von Frau cand. med Sandra Kovačević. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Positivkontrolle.

Invasion

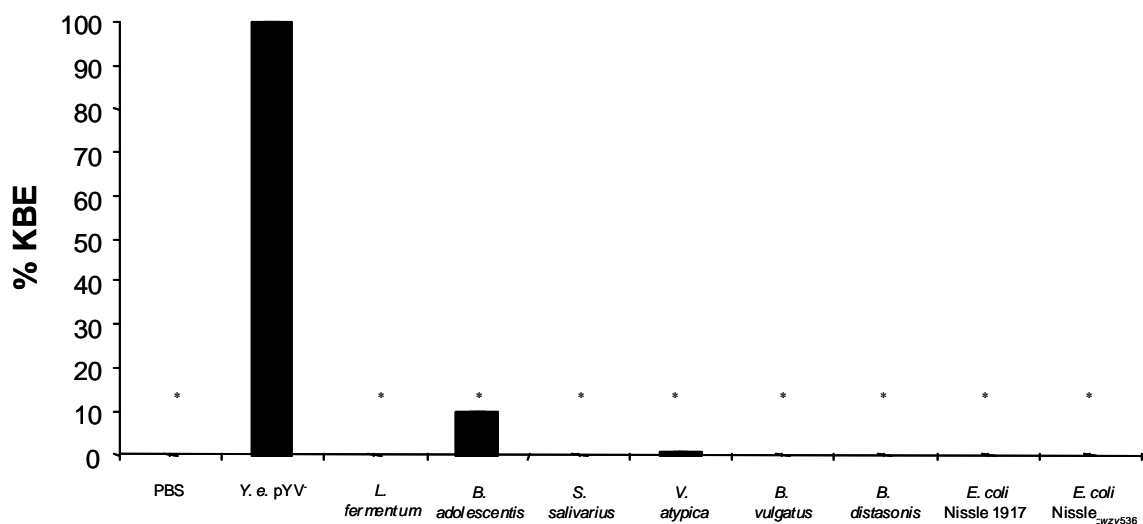


Abb. 3.2: Invasion der Testbakterien in HeLa-Zellen. Die MOI beträgt jeweils 100. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.1**. Versuchsergebnisse von Frau cand. med Sandra Kovačević. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Positivkontrolle (*Y. enterocolitica* pYV).

3.2 Induktion von Apoptose

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob die Testbakterien in HeLa-Zellen den Eintritt in die Apoptose induzieren. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit den betreffenden Bakterien infiziert; als Positivkontrolle diente 1 μM Staurosporin, als Negativkontrolle PBS. Am Tag nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und anschließend permeabilisiert. Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Assay fluoreszenzmarkiert. Die Ergebnisse wurden sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch ausgewertet.

3.2.1 Nachweis der Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie

Abb. 3.3 zeigt beispielhaft eine durchflusszytometrische Analyse der Daten. Die X-Achse der Diagramme repräsentiert hierbei die Zellgröße, d.h. je größer die Zellen, umso weiter rechts erscheinen diese im Diagramm. Die Y-Achse repräsentiert die Fluoreszenz, d.h. je ausgeprägter die Fluoreszenz der Zellen, desto weiter oben werden sie im Diagramm sichtbar. Apoptotische Zellen bzw. apoptotische Körperchen, in welche die Zellen als Resultat des programmierten Zelltodes zerfallen, sind kleiner als nicht-apoptotische Zellen und haben infolge der TUNEL-markierten DNA-Strangbrüche eine höhere Fluoreszenz. Somit werden sie am wahrscheinlichsten im oberen linken Quadranten des Diagrammes erwartet. Nicht-apoptotische Zellen sind größer und können mehr unspezifische Fluoreszenz sowie Autofluoreszenz aufweisen; sie sind vorwiegend in den rechten Quadranten zu finden. Zur genauen Eingrenzung apoptotischer Zellpopulationen in den Diagrammen ist jedoch immer der direkte Vergleich mit der Positiv- bzw. Negativkontrolle wichtig.

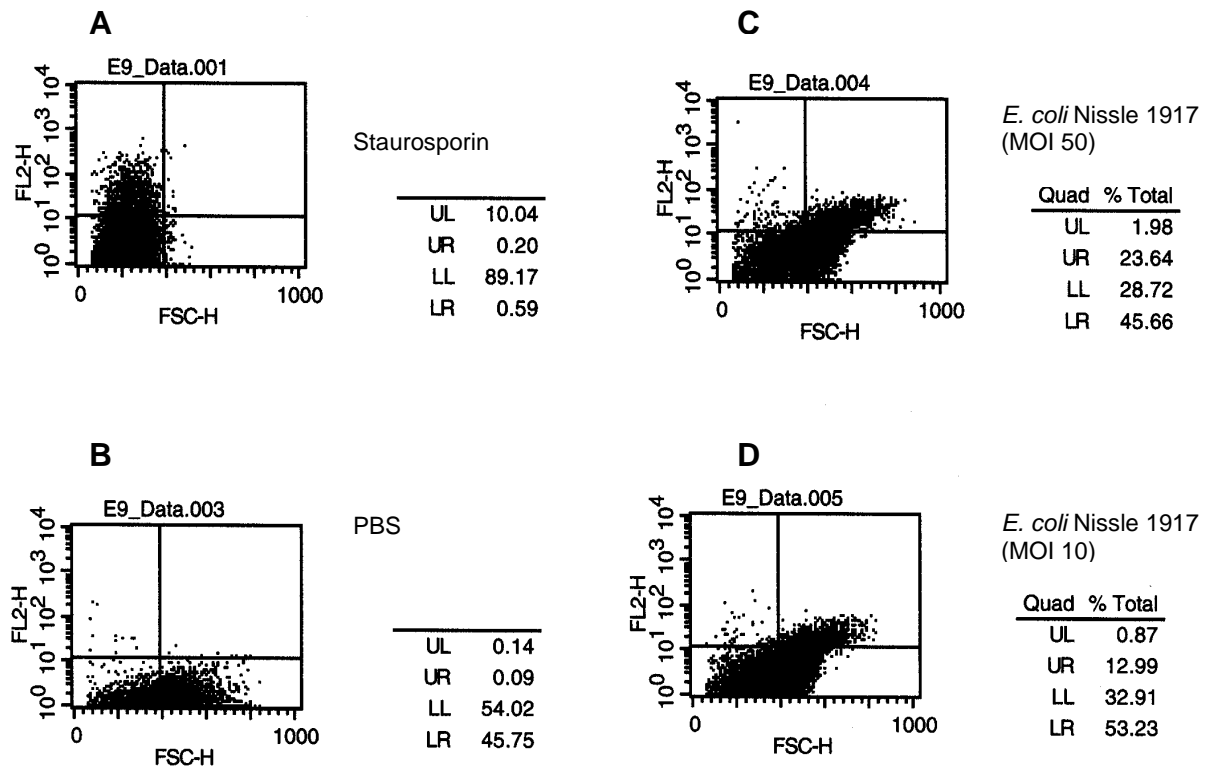


Abb. 3.3: Darstellung apoptotischer Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie.

Diagramm A zeigt ein Beispiel für eine Positivkontrolle (1 μ M Staurosporin), Diagramm B für eine Negativkontrolle (PBS). Die Zellpopulationen in Diagramm C und D wurden mit *E. coli* Nissle 1917 in einer MOI von 50 bzw. 10 infiziert. In der Positivkontrolle ist eine deutliche Population apoptotischer Zellen im oberen linken Quadranten sichtbar, die in den übrigen Proben fehlt.

Die Testbakterien wurden in unterschiedlichen MOI-Stufen von 1 bis 50 untersucht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen MOI-Stufen; repräsentativ zeigt das nachstehende Diagramm (s. **Abb. 3.4**) daher eine MOI von 20. Die Zahlen geben den Prozentsatz detektierter apoptotischer Zellen innerhalb der Gesamtzellpopulationen wider.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass keines der getesteten Bakterien in der Lage war, ein relevantes Maß an Apoptose in HeLa-Zellen zu induzieren; die erreichten Werte an apoptotischen Zellen lagen jeweils signifikant unter der Positivkontrolle. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass keines der untersuchten Bakterien über apoptoseinduzierende Eigenschaften bei HeLa-Zellen verfügt.

Apoptose-Induktion

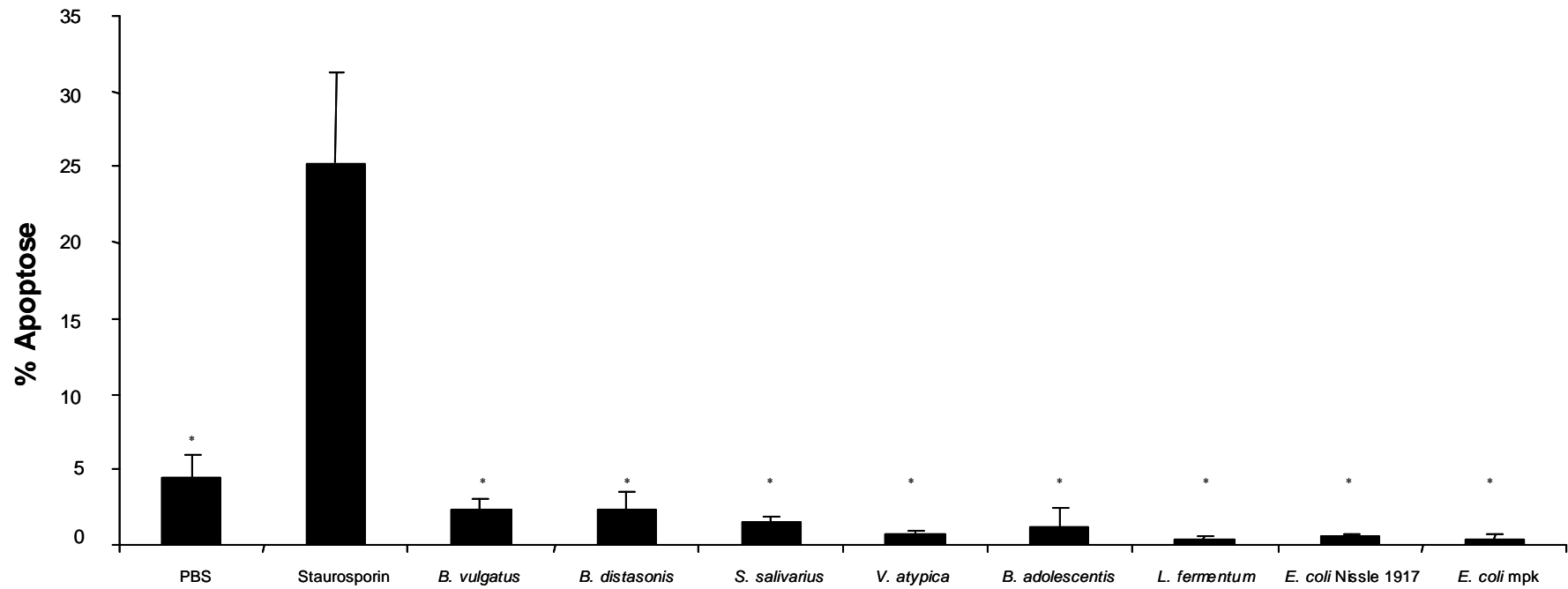


Abb. 3.4: Apoptose-Induktion nach Infektion von HeLa-Zellen mit den Testbakterien. Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie. Bei Infektion von HeLa-Zellen mit den Testbakterien (MOI jeweils 20) liegt der Prozentsatz apoptotischer Zellen signifikant unterhalb der Positivkontrolle (1 μ M Staurosporin). Negativkontrolle: PBS. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu Staurosporin.

3.2.2 Nachweis der Apoptose-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestätigung der durchflusszytometrischen Daten wurden die Zellen in einem zweiten Schritt mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Hierbei wurde die Anzahl fluoreszierender Zellen zwischen der Positivkontrolle einerseits sowie der Negativkontrolle und den Bakterienansätzen andererseits verglichen. Die nachstehenden **Abb. 3.5** und **3.6** zeigen die Ergebnisse in zweierlei Darstellung: DAPI sowie Fluoreszenz (Farbstoff *Texas red*). Der direkte Vergleich zwischen DAPI-Färbung (Darstellung aller Zellen im Gesichtsfeld durch Blaufärbung der Zellkerne) mit der Darstellung in *Texas red* (Darstellung nur der apoptotischen Zellen im selben Gesichtsfeld) vermittelt einen Eindruck über das Ausmaß an abgelaufener Apoptose. Auch hier wird repräsentativ die MOI 20 gezeigt, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten MOI-Stufen ergaben.

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass bei allen Versuchsansätzen, in denen die Zellen mit den zu untersuchenden Bakterienstämmen infiziert wurden, nur vereinzelt Apoptoseereignisse zu erkennen waren. Hiermit konnte bestätigt werden, dass keiner der Teststämme über signifikante apoptoseinduzierende Fähigkeiten verfügt.

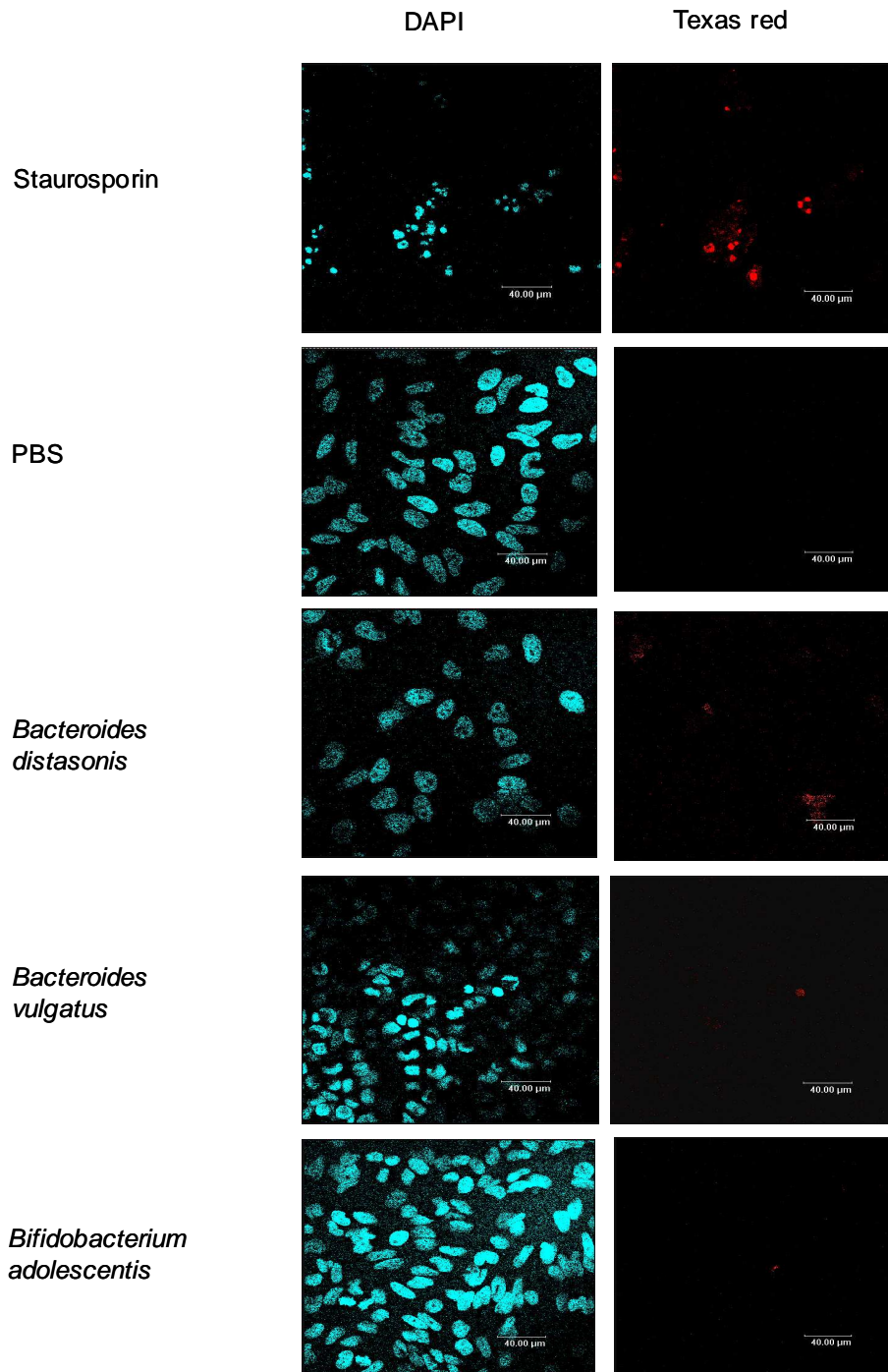


Abb. 3.5: Apoptose-Induktion nach Infektion von HeLa-Zellen mit *B. distasonis*, *B. vulgatus* sowie *B. adolescentis*. Bestimmung der Apoptose mittels Fluoreszenzmikroskopie (Skalierung: 40 µm). Ein beträchtlicher Teil der Zellen in der Positivkontrolle (1 µM Staurosporin) ist im Vergleich zwischen DAPI-gefärbten Zellkernen und fluoreszierenden apoptotischen Körperchen (Färbung mit *Texas red*) als apoptotisch erkennbar. In der Negativkontrolle (Zugabe von PBS) sowie bei den mit den Testbakterien (MOI jeweils 20) infizierten Zellen sind keine oder nur vereinzelt apoptotische Ereignisse zu erkennen.

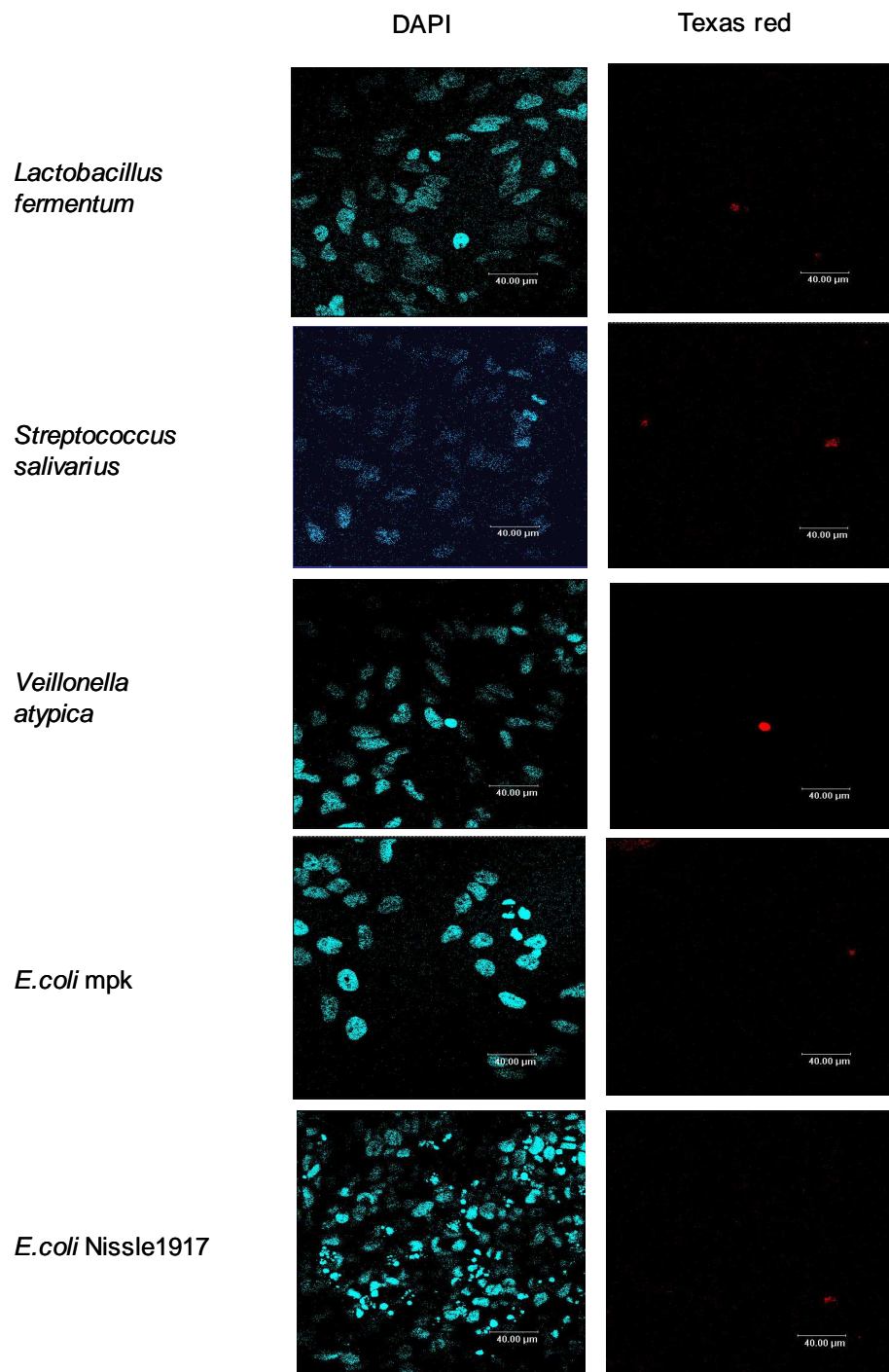


Abb. 3.6: Apoptose-Induktion nach Infektion von HeLa-Zellen mit *L. fermentum*, *S. salivarius*, *V. atypica*, *E. coli mpk* sowie *E. coli* Nissle 1917. Bestimmung der Apoptose mittels Fluoreszenzmikroskopie (Skalierung: 40 µm). MOI jeweils 20. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.5**.

3.3 Induktion von Interleukin-8: Nachweis mittels ELISA

Zur Untersuchung möglicher inflammatorischer Eigenschaften der Testbakterien wurde geprüft, in welchem Ausmaß sie die Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 induzieren. IL-8 fungiert hauptsächlich als Lockstoff, der über einen chemischen Gradienten phagozytierende Zellen des Immunsystems aus der Blutbahn an den Ort einer Infektion lockt und somit eine Entzündung zu initiieren vermag.

Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den zu untersuchenden Bakterien infiziert. Als Positivkontrollen wurden *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ (MOI 20) sowie das proinflammatorische Zytokin TNF- α (100 ng/ml) verwendet; als Negativkontrolle diente PBS. Die Testbakterien wurden in unterschiedlichen MOI-Stufen von 2 bis 200 untersucht. Da sich abgesehen von *E. coli* K12 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen MOIs zeigten, ist in der nachfolgenden **Abb. 3.7** beispielhaft die MOI 20 abgebildet.

Wie hieraus ersichtlich wird, war keines der untersuchten Bakterien in der Lage, ein signifikantes Maß an IL-8 zu induzieren: Die gemessenen Konzentrationen lagen jeweils deutlich unterhalb der Positivkontrolle sowie in einem der Negativkontrolle vergleichbaren Bereich. Bei *E. coli* K12 zeigte sich mit steigender Infektionsdichte in allen Versuchen ein signifikanter Anstieg der erreichten IL-8-Konzentrationen im Vergleich zwischen niedrigster und höchster MOI-Stufe (2 bzw. 200, nicht abgebildet); diese lagen jedoch auch bei MOI 200 noch signifikant unterhalb der Positivkontrollniveaus.

Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Infektion mit den untersuchten Teststämmen keinen über die IL-8-Sekretion messbaren, inflammatorischen Reiz für die HeLa-Zellen darstellt. Lediglich bei Infektion mit *E. coli* K12 ist ein geringfügiger, aber dosisabhängig signifikant zunehmender inflammatorischer Stimulus für die Zellen erkennbar.

IL-8-Induktion (Mono-Infektion)

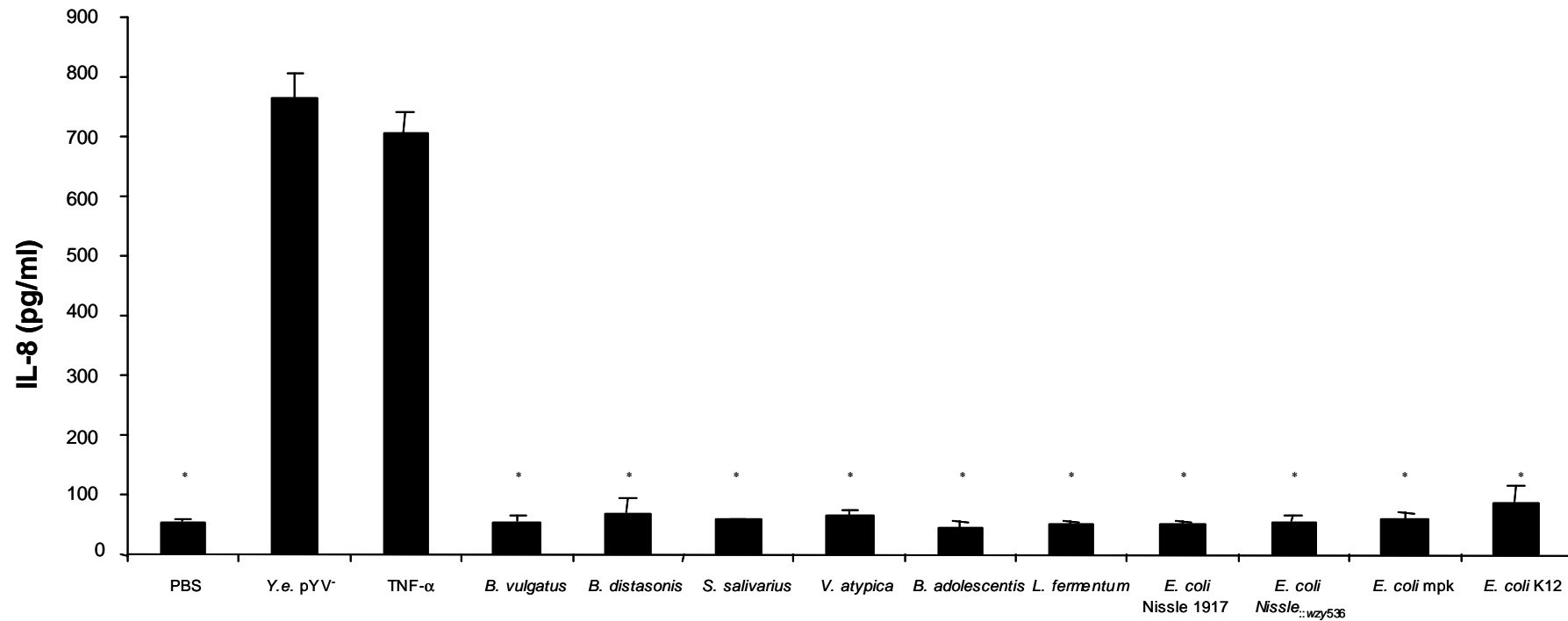


Abb. 3.7: IL-8-Sekretion nach Infektion von HeLa-Zellen mit den Teststämmen. Bestimmung der IL-8-Konzentrationen mittels ELISA. Bei Infektion von HeLa-Zellen mit den genannten Bakterien (MOI jeweils 20) ist die IL-8-Induktion signifikant niedriger als bei den Positivkontrollen (*Yersinia enterocolitica* pYV⁺, MOI 20 sowie 100 ng/ml TNF- α). Negativkontrolle: PBS. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu *Yersinia enterocolitica* pYV⁺.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den obigen Versuchsreihen kein Hinweis auf ein toxisches oder inflammatorisches Potential der Testbakterien gefunden werden konnte.

3.4 Modulation der durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8 Sekretion: Nachweis mittels ELISA

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit die Testbakterien die durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion modulieren würden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit den Testbakterien sowie gleichzeitig mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ infiziert. Wie schon bei den Mono-Infektionen (s. **Kap. 3.3**) wurde die IL-8-Sekretion durch die infizierten HeLa-Zellen mittels ELISA gemessen. Als Positivkontrolle diente erneut *Y. enterocolitica* pYV⁻ in einer MOI von 20, als Negativkontrolle PBS. In die einzelnen Versuchsansätze wurden die zu untersuchenden Bakterien in unterschiedlichen MOI-Stufen sowie zugleich *Y. enterocolitica* pYV⁻ in einer der Positivkontrolle entsprechenden MOI von 20 gegeben.

Bei den Versuchen zeigten die einzelnen Stämme ein deutlich unterschiedliches Verhalten, auf welches im folgenden detailliert eingegangen wird. Die nachfolgenden Diagramme beziehen sich jeweils auf repräsentative Versuche in Dreifachbestimmung, bei denen die MOIs der Testbakterien 2, 20 sowie 200 betragen. Die Nulllinie in den Diagrammen repräsentiert dabei die durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI 20) induzierte IL-8-Konzentration in der Positivkontrolle (arithmetisches Mittel aus drei Einzelwerten). Darüber bzw. darunter ist die jeweilige prozentuale Erhöhung bzw. Verminderung der IL-8-Konzentrationen aufgetragen, welche durch Co-Infektion mit den genannten Bakterien beobachtet wurde.

***L. fermentum*, *B. adolescentis*, *S. salivarius*, *B. distasonis*, *E. coli* mpk:**

Bei den Co-Infektionen mit diesen Teststämmen zeigten sich im Vergleich zu den mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ mono-infizierten Ansätzen der Positivkontrolle jeweils deutlich reduzierte IL-8-Konzentrationen, die signifikantes Maß ($p < 0,05$) erreichten (s. **Abb. 3.8 – 3.12**).

***B. vulgatus*, *V. atypica*, *E. coli* Nissle 1917, *E. coli* Nissle::wzy536, *E. coli* K12:**

Wurden die HeLa-Zellen zusätzlich zu *Y. enterocolitica* pYV mit diesen Teststämmen infiziert, war es nicht möglich, deutliche Modulationen der induzierten IL-8-Sekretion zu beobachten (s. **Abb. 3.13 – 3.17**).

***L. fermentum* + *Y. enterocolitica* pYV**

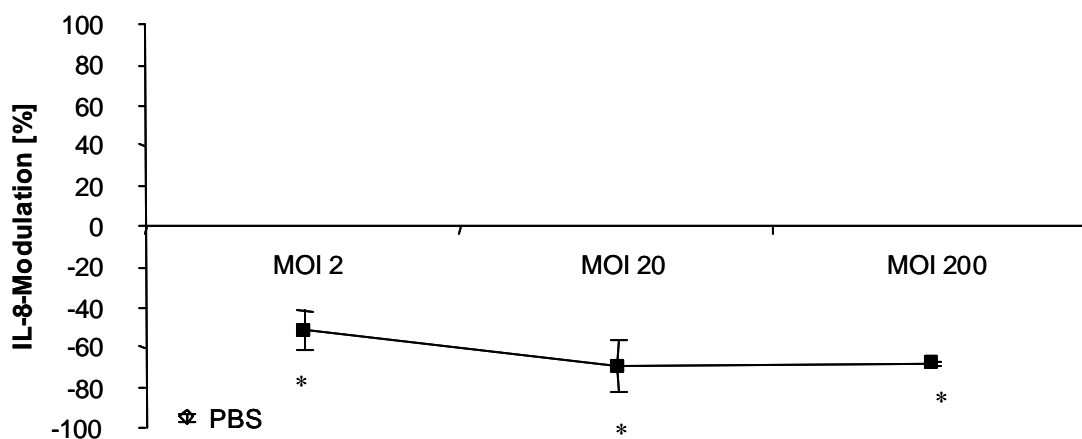


Abb. 3.8: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von HeLa-Zellen mit *L. fermentum* sowie *Y. enterocolitica* pYV. Bestimmung der IL-8-Konzentrationen mittels ELISA. Die Nulllinie repräsentiert das IL-8-Niveau in der Positivkontrolle (= Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV, MOI 20). Negativkontrolle: PBS.

Es wird ersichtlich, dass bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV sowie *L. fermentum* das Ausmaß an IL-8-Sekretion signifikant niedriger als in der Positivkontrolle liegt (bis zu 80%ige Reduktion). Dieser Effekt wird bereits bei der niedrigsten Infektionsdichte (MOI 2) beobachtet und erhöht sich bis MOI 200 nur unwesentlich. Weitere Erläuterungen siehe Text. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

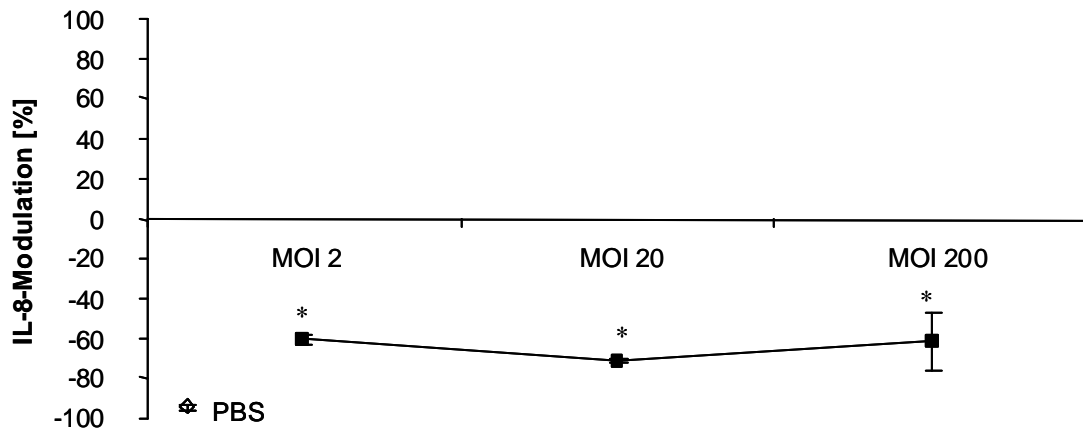
***B. adolescentis* + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.9: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *B. adolescentis* sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.8**. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

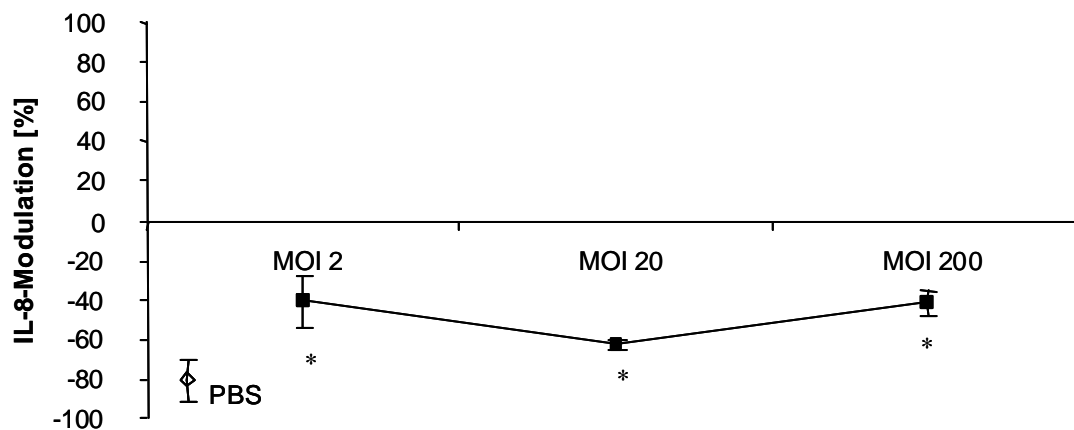
***S. salivarius* + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.10: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *S. salivarius* sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.8**. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

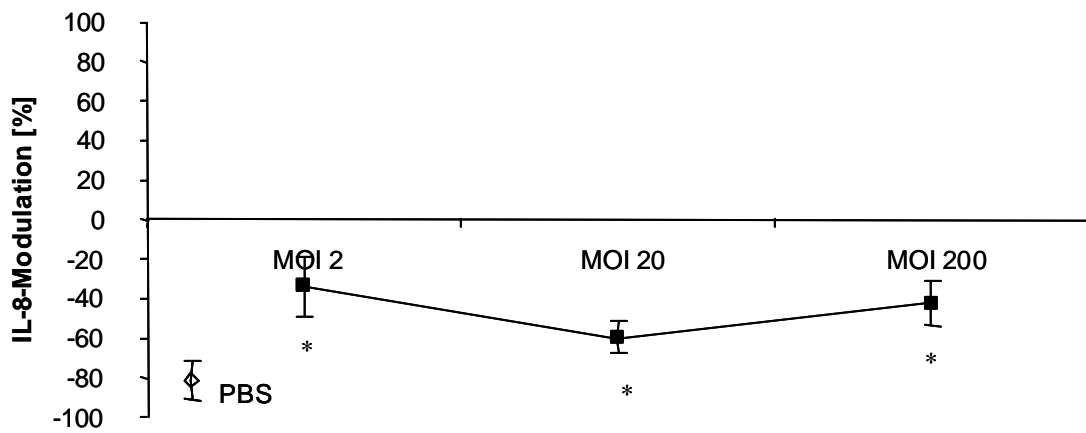
***B. distasonis* + *Y. enterocolitica* pYV⁻**

Abb. 3.11: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *B. distasonis* sowie *Y. enterocolitica* pYV⁻. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

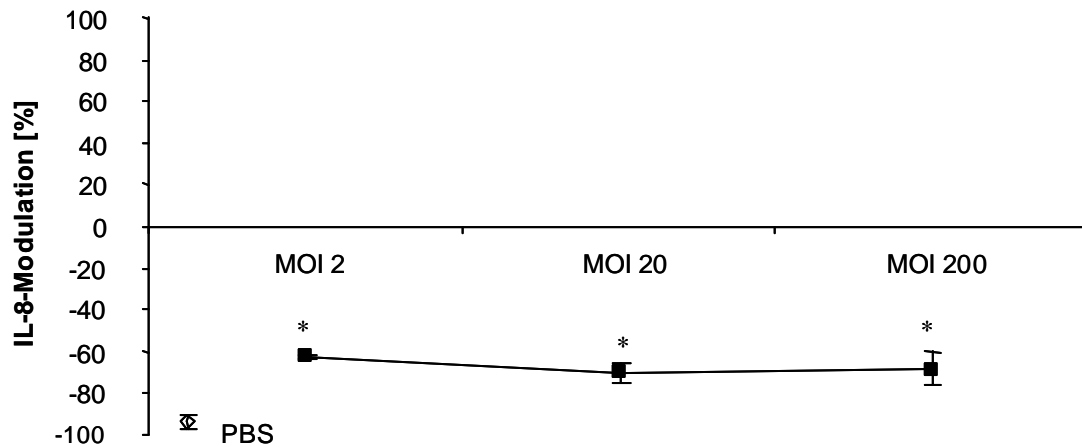
***E. coli* mpk + *Y. enterocolitica* pYV⁻**

Abb. 3.12: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *E. coli* mpk sowie *Y. enterocolitica* pYV⁻. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

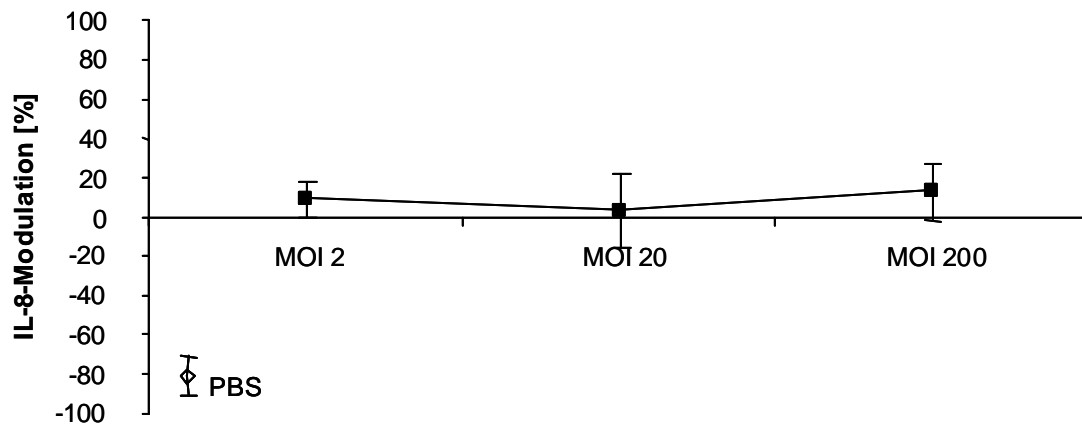
***B. vulgatus* + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.13: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von HeLa-Zellen mit *B. vulgatus* sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

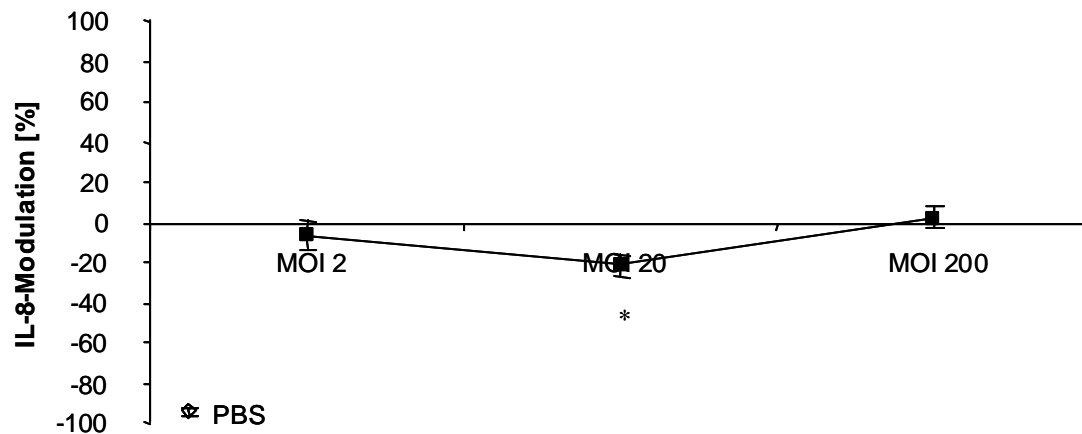
***V. atypica* + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.14: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von HeLa-Zellen mit *V. atypica* sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

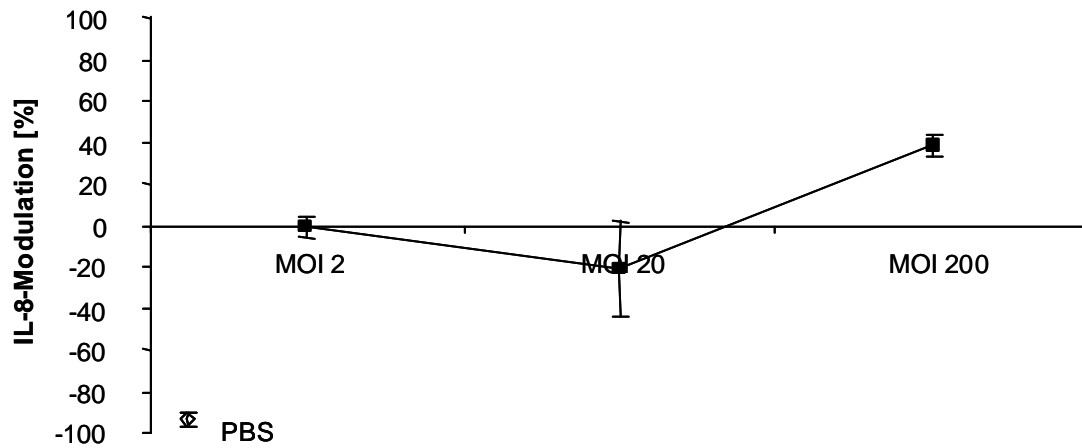
***E. coli* Nissle 1917 + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.15: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *E. coli* Nissle 1917 sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

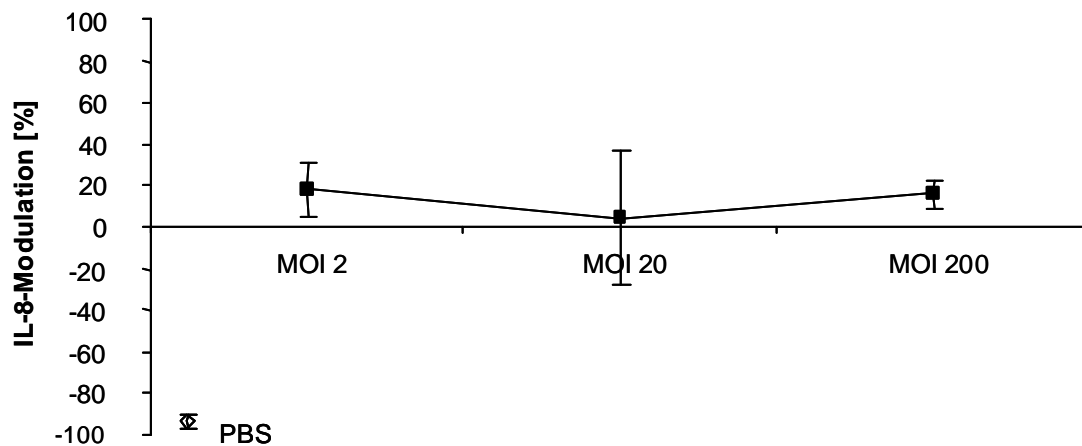
***E. coli* Nissle::wzy536 + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.16: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von Hela-Zellen mit *E. coli* Nissle::wzy536 sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

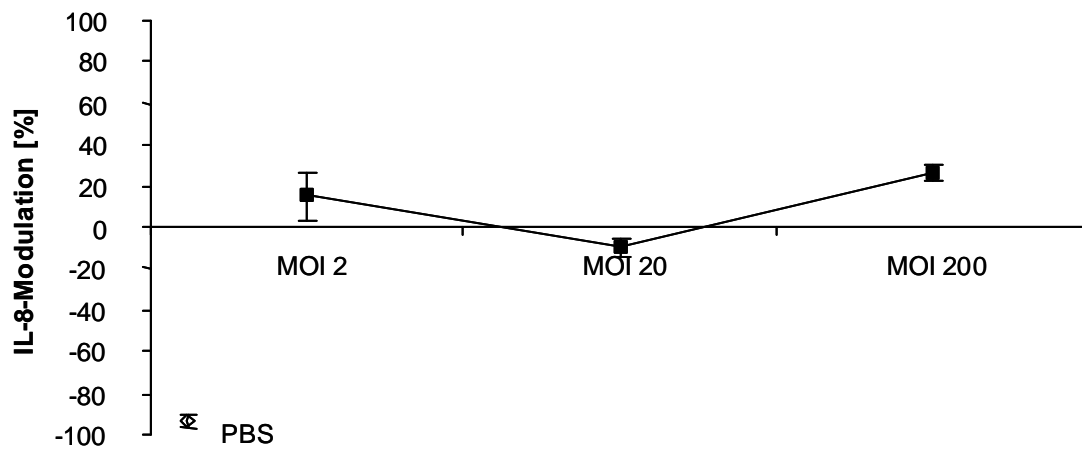
***E. coli* K12 + *Y. enterocolitica* pYV**

Abb. 3.17: Modulation der IL-8-Produktion nach Co-Infektion von HeLa-Zellen mit *E. coli* K12 sowie *Y. enterocolitica* pYV. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie Abb. 3.8.

3.5 Nachweis der Viabilität der HeLa-Zellen bei Infektion

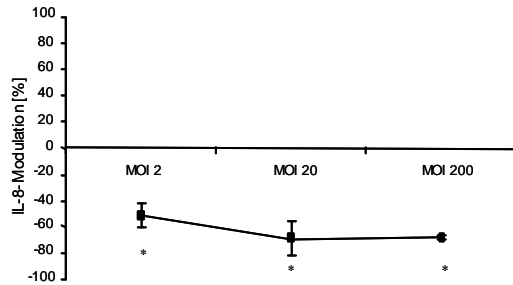
Um auszuschließen, dass die vielfach beobachteten Verringerungen der IL-8-Sekretion durch eine verminderte Viabilität der doppelt infizierten HeLa-Zellen verursacht wurde, wurden die Versuche wiederholt und die Zellen dabei zusätzlich mit TNF- α in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Viable Zellen müssten durch dieses proinflammatorische Zytokin wieder zur IL-8-Produktion angeregt werden, so dass die Konzentrationen im Vergleich zu den einfachen Co-Infektionen wieder deutlich ansteigen müssten. Bis auf die zusätzliche Gabe von TNF- α in die co-infizierten Proben waren die Versuchsansätze identisch zu den vorher durchgeführten einfachen Co-Infektionen. Geprüft wurden diejenigen Teststämme, welche signifikante IL-8-Reduktionen verursacht hatten (*L. fermentum*, *B. adolescentis*, *S. salivarius*, *B. distasonis*, *E. coli* mpk). Die MOI-Stufen, in denen die Testbakterien zusätzlich zu *Y. enterocolitica* pYV (MOI 20) eingesetzt wurden, betrug wieder 2, 20 sowie 200.

Die Ergebnisse sind aus den **Abb. 3.18** sowie **3.19** ersichtlich. Auch in diesen Diagrammen repräsentiert die Nulllinie wieder die durch Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ erreichte IL-8-Konzentration der Positivkontrolle. Darüber bzw. darunter sind die bei Co-Infektion beobachteten Zu- bzw. Abnahmen aufgetragen. In der linken Spalte (A) sind zur Erinnerung die Modulationen bei einfacher Co-Infektion zu sehen (s. **Kap. 3.4**). Aus der rechten Spalte (B) gehen die Modulationen bei zusätzlicher Gabe von 100 ng/ml TNF- α hervor.

Wie aus den Abbildungen ersichtlich wird, bewirkte die Zugabe von TNF- α in allen Fällen wieder hohe Konzentrationen an IL-8, die mindestens auf Positivkontroll-Niveau angesiedelt waren, in den meisten Fällen aber noch signifikant darüber.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die vielfach verringerte IL-8-Sekretion durch die doppelt infizierten HeLa-Zellen nicht auf eine verminderte Viabilität in Anwesenheit der großen Anzahl von Bakterien zurückzuführen ist.

A

L. fermentum + *Y. enterocolitica* pYV

B

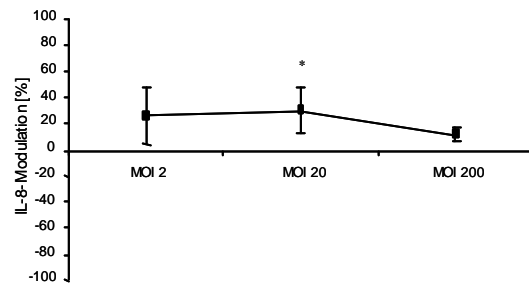
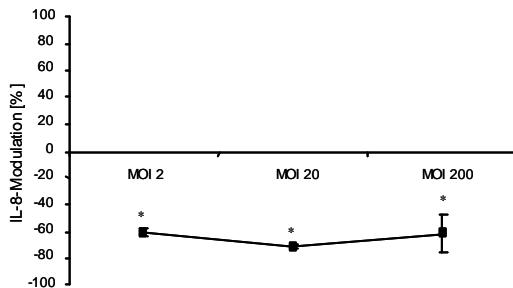
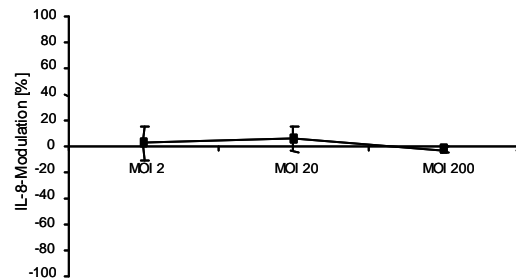
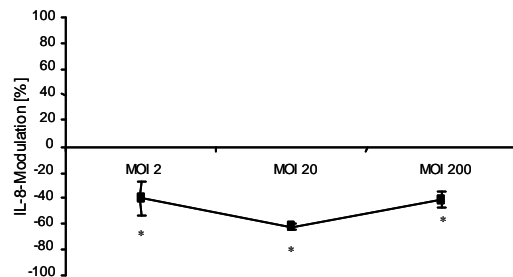
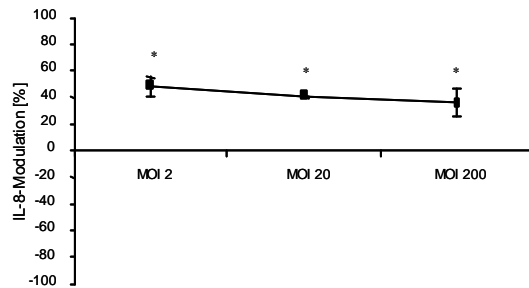
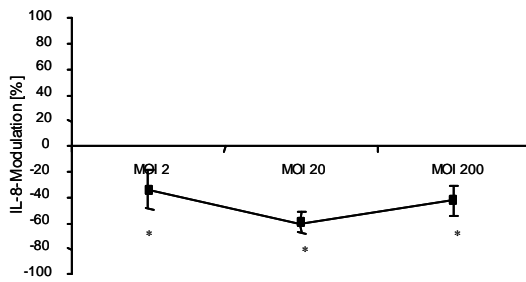
L. fermentum + *Y. enterocolitica* pYV + TNF- α *B. adolescentis* + *Y. enterocolitica* pYV*B. adolescentis* + *Y. enterocolitica* pYV + TNF- α *S. salivarius* + *Y. enterocolitica* pYV*S. salivarius* + *Y. enterocolitica* pYV + TNF- α 

Abb. 3.18: Modulation der IL-8-Produktion durch *L. fermentum*, *B. adolescentis* sowie *S. salivarius*. Bestimmung der IL-8-Konzentrationen mittels ELISA. Die Nulllinie repräsentiert das IL-8-Niveau in der Positivkontrolle (= Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV, MOI 20).

Die linke Spalte (A) zeigt nochmals die beobachtete Modulation der IL-8-Sekretion bei einfacher Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV (MOI 20). Die rechte Spalte (B) zeigt die Modulation bei zusätzlicher Gabe von 100 ng/ml TNF- α . Es wird ersichtlich, dass die HeLa-Zellen bei Co-Infektion viabel und zu hoher IL-8-Sekretion in der Lage sind. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Positivkontrolle.

A

***B. distasonis* + *Y. enterocolitica* pYV⁻**

B

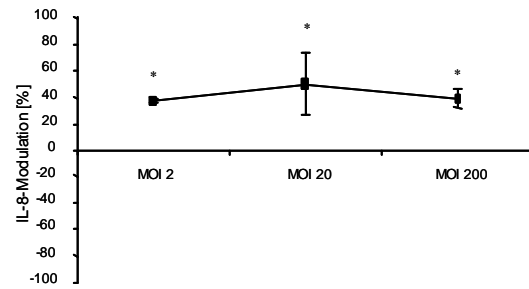
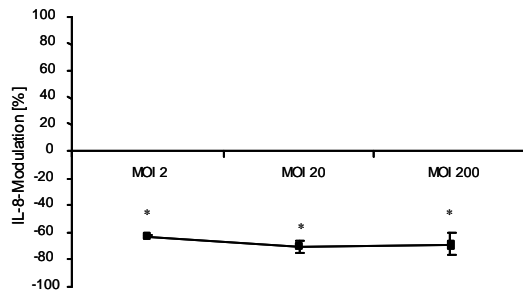
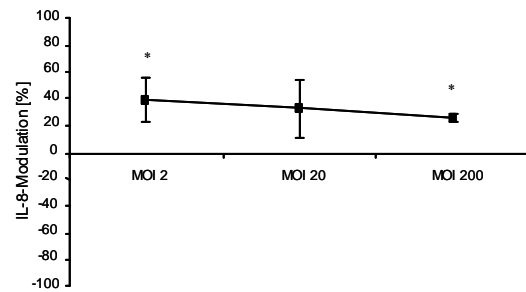
B. distasonis* + *Y. enterocolitica* pYV⁻ + TNF- α** E. coli* mpk + *Y. enterocolitica* pYV⁻*****E. coli* mpk + *Y. enterocolitica* pYV⁻ + TNF- α** 

Abb. 3.19: Modulation der IL-8-Produktion durch *B. distasonis* sowie *E. coli* mpk. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.19**. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Positivkontrolle.

3.6 Inhibition der Yersinien-Adhäsion bzw. -Invasion als möglicher Mechanismus der modulierten IL-8-Sekretion

Ein denkbarer Mechanismus für die bei Co-Infektion mit einigen der Teststämme beobachtete, signifikant reduzierte IL-8-Sekretion ist die Inhibition der Yersinien-Adhäsion an bzw. -Invasion in HeLa-Zellen, z. B. durch Konkurrenz um Bindungsstellen an der Oberflächenmembran. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde die Anzahl adhärenter bzw. invadierter Yersinien nach Co-Infektion mit einer Auswahl der Testbakterien durchgeführt (*L. fermentum*, *B. adolescentis*, *S. salivarius*, *E. coli* Nissle 1917 sowie Nissle::wzy⁵³⁶, *E. coli* mpk). Die eingesetzte MOI betrug dabei sowohl für die Yersinien als auch für die Testbakterien jeweils 100.

Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.20** sowie **3.21** dargestellt. Es handelt sich hierbei um die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Um die Einzelversuche besser vergleichen zu können, wurde jeweils die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) in der Positivkontrolle (*Y. enterocolitica* pYV, MOI 100) als 100 % definiert; die Anzahl koloniebildender Einheiten in den mit den Teststämmen co-infizierten Ansätzen wurde hierzu in Verhältnis gesetzt.

Wie man aus den Diagrammen ersehen kann, war durch die zusätzliche Anwesenheit der Testbakterien keine signifikante Modulation der Yersinien-Adhäsion bzw. -Invasion zu beobachten.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Interferenz mit der Yersinien-Adhäsion bzw. -Invasion nicht die Ursache für die reduzierte IL-8-Sekretion darstellt.

Yersinia-Adhäsion bei Co-Infektion

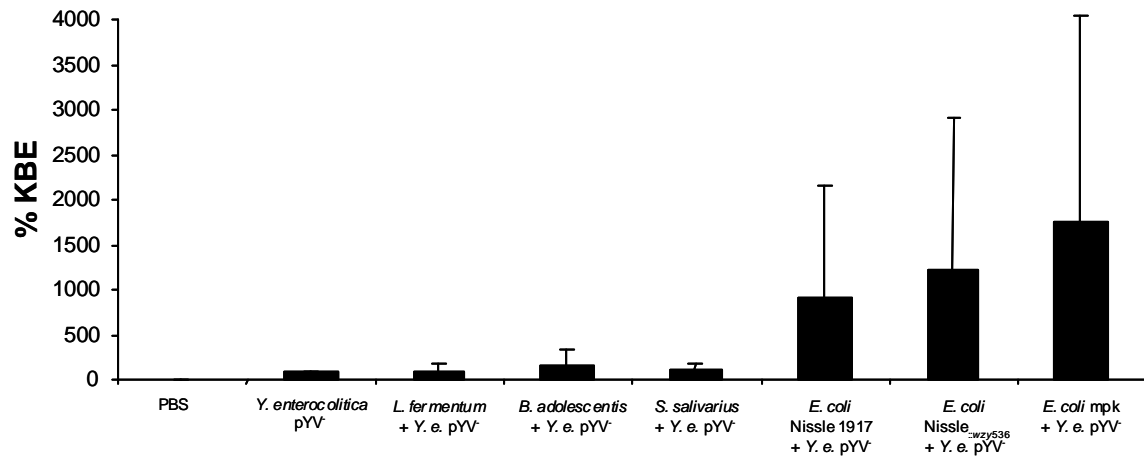


Abb. 3.20: Modulation der Yersinien-Adhäsion bei Co-Infektion mit den Testbakterien.

Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Co-Infektion. Die MOI beträgt jeweils 100. In die Negativkontrolle wurde PBS gegeben.

In dieser Darstellung wurde die Positivkontrolle (= Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV) als 100 % definiert, die Anzahl koloniebildender Einheiten bei Co-Infektion mit den Testbakterien wurde hierzu in Verhältnis gesetzt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Yersinia-Invasion bei Co-Infektion

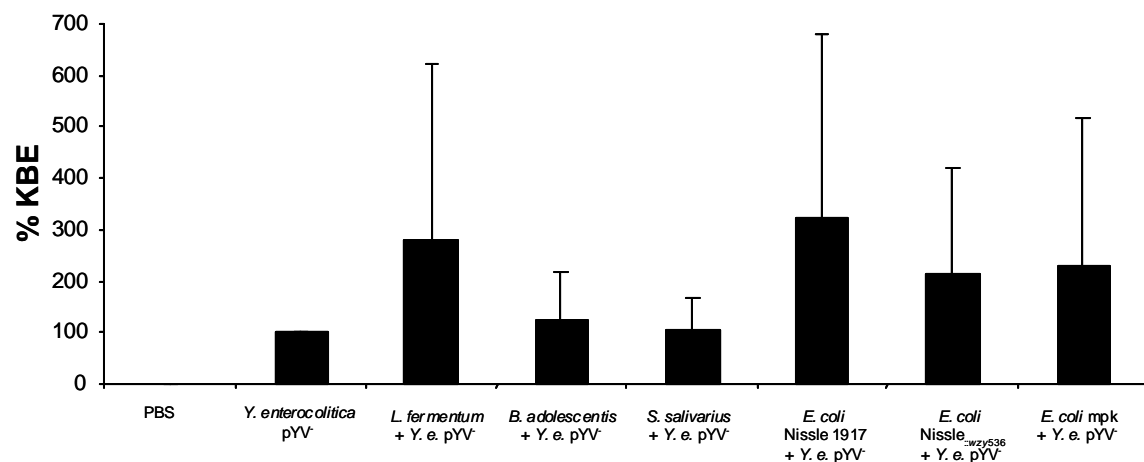


Abb. 3.21: Modulation der Yersinien-Invasion bei Co-Infektion mit den Testbakterien.

Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Co-Infektion. Weitere Erläuterungen siehe Text sowie **Abb. 3.21**.

4 Diskussion

Die Ernährungsgewohnheiten des Menschen in den modernen Industriegesellschaften der westlichen Welt haben sich im vergangenen Jahrhundert dramatisch geändert. Einem starken Anstieg beim Verzehr beispielsweise von fettreicher Nahrung und Cholesterin steht ein immer weiter sinkender Verzehr von gesunden und natürlichen Lebensmitteln mit ihren hohen Anteilen an gesunden Komponenten wie Ballaststoffen oder Vitaminen gegenüber. In der Prähistorie wurden Nahrungsmittel durch Trocknen oder Vergraben in Erdlöchern konserviert, wo es zur natürlichen Fermentierung durch Mikroorganismen kam⁵. Der moderne Mensch hingegen nimmt einen sehr viel geringeren Anteil an fermentierten Lebensmitteln zu sich, so dass das Immunsystem des Darmes mit einer viel kleineren Anzahl von Mikroorganismen konfrontiert wird. Es existieren allgemein anerkannte Hypothesen, wonach die modernen Ernährungsgewohnheiten sowie exzessiv hygienische Lebensbedingungen für die immer größere Prävalenz von Allergien in der westlichen Welt mitverantwortlich sind (sogenannte „Hygienetheorie“)^{5,7,78}. Diese, bereits in der Postnatalperiode einsetzende, übermäßige Hygiene hat Auswirkungen auf die Entwicklung der intestinalen Mikroflora im Kindesalter und könnte so eine mangelnde Toleranz gegenüber an sich harmlosen Nahrungsbestandteilen und anderen Antigenen hervorbringen. Dies begünstigt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber intestinalen Infektionen sowie Hypersensibilität gegenüber Antigenen^{78,126}.

Das Wissen um diese Sachverhalte hat dazu geführt, dass in den westlichen Industrienationen, v.a. in Europa und Japan, der Verzehr probiotischer Lebensmittel stetig ansteigt. Hiermit soll die Zusammensetzung und Aktivität der Darmflora durch die Nahrungsaufnahme gezielt beeinflusst werden. Mittlerweile existiert ein ganzer Forschungszweig, der sich mit den positiven Einflüssen probiotischer Mikroorganismen beschäftigt. Die hierbei untersuchten Einsatzgebiete gehen weit über die von den Herstellern probiotischer Joghurtsorten gepriesene Stärkung der Abwehrkräfte und Förderung der Verdauung hinaus, und reichen von der Behandlung von antibiotikainduzierter

Diarrhoe über chronisch entzündliche Darmerkrankungen bis hin zur Prävention von Darmkrebs.

Bereits im Jahre 1877 hatten Pasteur und Joubert beobachtet, dass zwischen manchen Bakterienspezies antagonistische Interaktionen bestehen können⁵. In den vergangenen Jahrzehnten konnten viele Studien teilweise beeindruckende Ergebnisse bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen mit probiotischen Bakterien vorweisen. Nichtsdestotrotz ist die Forschung auf diesem Gebiet seit vielen Jahren Gegenstand ständiger Kontroversen zwischen hartnäckigen Verfechtern einerseits sowie kritischen Gegenstimmen andererseits. Hierfür existieren mehrere Gründe:

- Zahllose Studien verwendeten unterschiedliche Bakterienstämme, teilweise Kombinationen aus mehreren Stämmen. Hierbei kamen eine Vielzahl unterschiedlicher Dosen und Versuchsmodelle zum Einsatz, so dass sich Vergleiche äußerst schwierig gestalten⁹⁶.
- Vielfach ist eine mangelnde Koordination der Forschung zwischen klinischen und mikrobiologischen Gruppen zu beklagen. Vielen Forschungsergebnissen fehlt die klinische Bestätigung gänzlich⁵.
- Die meisten klinischen Studien wiesen zu kleine Patientenkollektive ohne ausreichende Kontrollen auf, die Interpretation der Daten war oft subjektiv^{23,24}.

Aussagekräftige, statistisch objektivierbare Analysen sind daher äußerst schwierig. Unbestritten bleibt jedoch die Tatsache, dass das Konzept einer bakteriellen Interferenztherapie an sich volle Gültigkeit besitzt. In den letzten Jahren sind zudem zunehmende Tendenzen zu einer stärkeren Koordination zu verzeichnen. In **Kap. 1.2.1** wurde bereits die gemeinsam von WHO und FAO zum Thema probiotischer Nahrungsmittel abgehaltene Konferenz im Jahre 2001 erwähnt²⁸. Bereits zuvor, im Jahre 1994, empfahl die WHO im Rahmen einer Konferenz über die steigenden Antibiotikaresistenzen die bakterielle Interferenztherapie als eine Alternative¹²⁵. Die Europäische Union finanziert

eine Gruppe namens PROEUHEALTH, welche die Rolle probiotischer Bakterien untersucht und aus 64 Forschungspartnern in sechzehn europäischen Ländern besteht (<http://proeuhealth.vtt.fi>). Diese Gruppe umfaßt acht Einzelprojekte, die sich mit unterschiedlichen Themenkomplexen wie molekularen Identifikationstechniken für probiotische Stämme oder der Gewährleistung von deren Sicherheit beschäftigen.

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss physiologischer Darmbakterien auf proinflammatorische Mechanismen untersucht werden. Hierzu sollten die Teststämme zunächst im Hinblick auf ihre Fähigkeit zu Adhäsion, Invasion sowie Apoptose- und IL-8-Induktion im HeLa-Zellmodell untersucht werden. Im Anschluss daran wurde geprüft, ob sie die durch den Stamm *Yersinia enterocolitica* pYV induzierte IL-8-Sekretion als *in vitro*-Modell für einen proinflammatorischen Mechanismus modulieren würden. Bei den untersuchten Bakterien handelte es sich teils um bekanntermaßen probiotische (*E. coli* Nissle 1917), teils um nicht-probiotische Stämme (z. B. *E. coli* K12); zudem wurden Bakterien untersucht, die im Verdacht standen, über probiotische Eigenschaften zu verfügen (z. B. *L. fermentum*). Aus diesem Grunde sollte überdies geprüft werden, ob es anhand der aufgestellten *in vitro*-Parameter möglich sein würde, eine Art Screening-Profil zu erstellen, um probiotische von nicht-probiotischen Stämmen zu unterscheiden.

4.1 Adhäsion und Invasion

Bereits im Vorfeld zu dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der Teststämme zur Adhäsion an bzw. Invasion in HeLa-Zellen von Frau cand. med. Sandra Kovačević untersucht.

4.1.1 Adhäsion

Um sich in einem Kompartiment des Wirtsorganismus auf Dauer niederlassen zu können, muss ein Bakterium die Fähigkeit besitzen, Bindungsstellen an der Zellmembran zu finden und dort zu adhären. Auf diese Weise können z. B. Bakterien, die den Urogenitaltrakt besiedeln, verhindern, durch den Harnfluss weggespült zu werden. Auch wird die massive Besiedlung mit adhären Darmbakterien auf der Epitheloberfläche des Intestinaltraktes als Schutzmechanismus gegen pathogene Keime angesehen, indem apathogene Darmbakterien eine Art Schutzschicht auf dem Epithel bilden und somit mögliche Bindungsstellen für Pathogene besetzt halten.

Auch im Zusammenhang mit probiotischen Bakterien ist ein starkes Adhäsionsvermögen immer wieder als wichtiges Selektionskriterium genannt worden ²⁴. Als *in vitro*-Modell zur Adhäsionsprüfung dienten meist die intestinalen Epithelzelllinien Caco-2 sowie HT-29 ⁷⁷. Bei den verschiedenen Untersuchungen stellte sich allerdings heraus, dass das Adhäsionsvermögen unterschiedlicher probiotischer Stämme äußerst variabel, in vielen Fällen sogar sehr schwach ist ¹¹⁹. So konnte beispielsweise für *Lactobacillus bulgaricus* oder auch *Bifidobacterium* spp. noch kein ausreichendes Adhäsionsvermögen gezeigt werden ⁵. Gegenbeispiele mit starker Adhäsion sind *Lactobacillus rhamnosus* GG ⁵⁸, *Lactobacillus plantarum* ² oder *Lactobacillus acidophilus* LA1 ⁶. Die Übertragung der Erfahrungen aus einem *in vitro*-Modell auf die Situation *in vivo* ist allerdings problematisch, da das Adhäsionsvermögen nicht nur von spezie- sondern auch von wirts- bzw. modellspezifischen Faktoren abhängen kann ⁴⁷. Zudem wurde in der Vergangenheit von manchen Forschungsgruppen bereits angedeutet, dass auch Stämme, die *in vitro* kein starkes Adhäsionsvermögen zeigen, dennoch ein hohes Maß an Kompetitivität mit pathogenen Keimen aufweisen können ⁴⁷. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass einer der häufig gezeigten probiotischen Mechanismen die Sekretion antimikrobieller Substanzen ist, wofür eine Adhäsion an die Wirtszelle keine Voraussetzung darstellt.

In den Vorversuchen zu dieser Arbeit hatte sich gezeigt, dass bei den Testbakterien die Fähigkeit zur Adhäsion vorhanden, wenn auch im Vergleich zur Positivkontrolle (*Y. enterocolitica* pYV) gering ausgeprägt ist. Von Interesse ist hierbei die Tatsache, dass für einen der untersuchten Stämme (*E. coli* Nissle 1917) Arbeiten anderer Gruppen vorliegen, welche die Adhäsion an Zellen der Linie Intestine-407 (humane embryonale Jejunal- und Ilealzellen) sowie *in vivo* bei Neugeborenen untersucht hatten^{8,59}. In beiden Fällen hatte sich das Adhäsionsvermögen dieses Stammes im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit als hoch erwiesen. Dies bestätigt erneut die bereits erwähnte Abhängigkeit von modell- sowie wirtsspezifischen Faktoren bei derartigen Versuchsreihen. Hierbei können z. B. unterschiedliche Differenzierungsgrade der verwendeten Zelllinien eine Rolle spielen oder die Palette an exprimierten Oberflächenmolekülen. Bei Untersuchungen *in vivo* sind die Bedingungen ohnehin um ein Vielfaches komplexer, da verschiedene Zelltypen und eine breite Darmflora unterschiedlicher Ausprägung im System vorhanden sind.

4.1.2 Invasion

Die Invasion, also das Eindringen in die Wirtszelle, ist vorwiegend ein Mechanismus pathogener Keime. So haben beispielsweise Bakterien der gramnegativen Gattungen *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* oder auch der grampositive Stamm *Listeria monocytogenes* die Fähigkeit, ihre Aufnahme in nicht phagozytierende Wirtszellen aktiv zu induzieren¹⁶. Die Bakterien verursachen dabei Veränderungen im Zytoskelett der Zelle, die zur Bildung pseudopodienartiger Strukturen und anschließender Aufnahme in die Zelle führen⁹⁵. Im Anschluß an die so erzwungene Phagozytose können diese Bakterien entweder in Vakuolen überleben oder diese lysieren und sich im Zytoplasma bewegen¹⁶. Wie erwähnt, treten diese Vorgänge hauptsächlich im Rahmen von Infektionen mit pathogenen Keimen auf; Invasivität ist daher für probiotische Stämme eine unerwünschte Eigenschaft.

Übereinstimmend hiermit zeigte sich im Rahmen der Vorversuche zu dieser Arbeit, dass keines der getesteten Bakterien über die Fähigkeit zur Invasion in HeLa-Zellen verfügt.

4.2 Induktion von Apoptose

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst potentiell toxische Einflüsse der Teststämme auf HeLa-Zellen durch Bestimmung der Apoptoserate nach Infektion untersucht. Die Induktion von Apoptose ist ein Kennzeichen vieler bakterieller Infektionen, wobei sie je nach Fall sowohl einen Vorteil für den Wirt als auch für das Bakterium darstellen kann. So sind beispielsweise Yersinien in der Lage, Apoptose in Makrophagen zu induzieren und sich somit vor Phagozytose zu schützen und ihr Überleben sicherzustellen³⁶. *Shigella flexneri* tötet Makrophagen ebenfalls über Apoptose-Induktion und verschafft sich so Zugang zu den Peyer-Plaques, um sich dann von basolateral weiter von einem Enterozyten zum nächsten auszubreiten³⁶. Zudem zieht der programmierte Zelltod im Gegensatz zur Nekrose keine inflammatorische Reaktion nach sich und schützt das Bakterium vor zusätzlicher Aufmerksamkeit seitens des Immunsystems. Diese Tatsache kann jedoch auch für den Wirt von Nutzen sein, um im Falle einer Infektion eine überschießende lokale Immunantwort mit Schädigung des eigenen Organismus zu verhindern und gleichzeitig durch den Tod der infizierten Zelle die pathogenen Keime auszuschalten³⁶. Weitere Beispiele für Apoptose-Induktion durch pathogene Bakterien im Darmtrakt sind *Shigella dysenteriae* sowie Shiga-Toxin-produzierende *E. coli*¹⁰ oder *Clostridium difficile*³⁰.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass keines der getesteten Bakterien in der Lage war, Apoptose in einem über die Negativkontrollen hinausgehenden Maße zu induzieren. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917, den fraglich probiotischen Stämmen (z. B. *L. fermentum*) sowie den nicht-probiotischen *E. coli*-Stämmen.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Arbeit einer anderen Forschungsgruppe, die zeigen konnte, dass der probiotische Stamm *Lactobacillus rhamnosus* GG die zytokininduzierte Apoptose in humanen und murinen Darmepithelzellen inhibiert¹²⁹. Dieses Bakterium konnte sowohl antiapoptotische Kinasen aktivieren als auch proapoptotische Kinasen inhibieren. Dies scheint jedoch keine universelle Eigenschaft aller probiotischen Bakterien zu sein: So konnten in derselben Studie *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus casei* lediglich die antiapoptotischen Kinasen aktivieren, nicht aber die apoptotischen inhibieren, und zeigten eine wesentlich schwächere antiapoptotische Wirkung als *Lactobacillus rhamnosus*.

Ein solcher Ansatz könnte als alternatives Selektionskriterium in Frage kommen, um ein unterschiedliches Verhalten zwischen probiotischen und nicht-probiotischen Darmbakterien zu untersuchen.

4.3 Induktion von Interleukin-8

Nach Infektion mit enteropathogenen Keimen sezernieren Epithelzellen eine Reihe proinflammatorischer Zytokine, darunter auch Interleukin-8^{26,49}. IL-8 ist ein zur Familie der CXC-Chemokine gehörendes Interleukin; seine wichtigste Funktion ist das chemotaktische Anlocken von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten⁷¹. Zudem konnten weitere Funktionen nachgewiesen werden, so z. B. die chemotaktische Wirkung auf basophile Granulozyten sowie eine Rolle bei der Angiogenese^{4,113}. Induziert wird es durch verschiedene inflammatorische Stimuli wie IL-1 oder TNF in Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten oder Gewebszellen⁴.

Überdies konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei der Induktion der IL-8-Expression eine zentrale Rolle spielt^{27,51,72,109}. NF- κ B wird durch eine Vielzahl proinflammatorischer Stimuli aktiviert und resultiert in der Synthese von Zytokinen, Adhäsionsproteinen und anderen inflammatorischen Molekülen⁷³. Dieses Molekül besteht aus den beiden Untereinheiten p50 und p65 und ist im Ruhezustand an Inhibitorproteine, sogenannte I κ Bs (*inhibitor of NF- κ B*)

gebunden. Bei Einwirken proinflammatorischer Reize werden diese abgebaut; die NF- κ B-Untereinheiten werden freigegeben und können in den Zellkern transloziert werden⁵⁰. Elewaut *et al.* untersuchten die Signaltransduktionswege intestinaler Epithelzellen, die zur Aktivierung einer inflammatorischen Immunantwort auf unterschiedliche enteroinvasive Bakterien führen²⁷. Sie stellten dabei die zentrale Rolle von NF- κ B fest und postulierten, dass bakterielle Infektionen unterschiedliche Transduktionswege aktivieren, die auch durch TNF in Gang gesetzt werden und zur Freigabe von NF- κ B führen.

In der vorliegenden Arbeit diente als bakterielle Positivkontrolle für die IL-8-Induktion in HeLa-Zellen das gramnegative und zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörende Bakterium *Yersinia enterocolitica*. Dieser Keim kann eine Reihe von Erkrankungen auslösen, i.d.R. jedoch beschränkt sich die klinische Manifestation auf eine inapparente Infektion oder eine selbstlimitierende Enterocolitis und mesenteriale Lymphadenitis¹⁷. Die Virulenzfaktoren dieses Stammes sind sowohl chromosomal^{20,44,68,81} als auch über das sogenannte *Yersinia virulence plasmid* (pYV) kodiert^{14,15}, welches u.a. die Gene für die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops) enthält. Der Wildtypstamm WA-P enthält das pYV und induziert nicht die Sekretion von IL-8, da die pYV-kodierten Yops die Zytokinexpression inhibieren^{101,103}. Dem Stamm WA-C (= pYV⁻) hingegen fehlt dieses Plasmid; er induziert bei Infektion von HeLa-Zellen Interleukin-8. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Kontaktaufnahme zwischen Invasinprotein der Yersinien und β 1-Integrin der HeLa-Zellen (s. **Kap. 4.4.2**).

In **Kap. 3.3** wurde gezeigt, dass keiner der untersuchten Bakterienstämme in signifikanter Weise die Sekretion von IL-8 induziert und somit kein inflammatorisches Potential gegenüber HeLa-Zellen besitzt. Lediglich *E. coli* K12 konnte bei der höchsten Infektionsdichte (MOI 200) etwas höhere IL-8-Konzentrationen induzieren, die jedoch noch signifikant unterhalb der Niveaus der Positivkontrollen (= *Y. enterocolitica* pYV⁻ und TNF- α) lagen.

In der Vergangenheit wurden die meisten Versuche zur Induktion von IL-8 mit pathogenen Keimen wie beispielsweise *H. pylori*¹⁸, *Y. enterocolitica*¹⁰³ oder enteropathogenen *E. coli*⁹⁹ durchgeführt. Das Induktionsverhalten apathogener Darmkommensaler oder probiotischer Stämme wurde hingegen nur selten untersucht; ein Beispiel ist die Arbeit von Lammers *et al.*⁵⁴. Sie untersuchten, ob Zelltrümmer sowie Zellextrakte der probiotischen Stämme *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus* GG sowie der probiotischen Zubereitung VSL#3 (enthält verschiedene Spezies der Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Streptococcus*) bei Infektion humaner Kolonkarzinomzellen Interleukin-8 induzieren. Dabei zeigte sich, dass lediglich *E. coli* Nissle 1917 in signifikanter Weise dosisabhängig IL-8 induzierte. Dies war im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit Infektionen im HeLa-Zellmodell nicht der Fall. Die anderen von Lammers *et al.* untersuchten probiotischen Bakterien hingegen waren nicht in der Lage, IL-8 zu induzieren. Hieraus schlossen die Autoren, dass grampositive, probiotische Bakterien wie *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Streptococcus* spp. und gramnegative wie *E. coli* Nissle 1917 ihre vorteilhaften Wirkungen auf den Wirt über unterschiedliche Mechanismen ausüben könnten.

4.4 Modulation proinflammatorischer Mechanismen am Beispiel der durch *Y. enterocolitica* pYV induzierten IL-8-Sekretion

Der Darm ist nicht einfach nur ein Organ für die Absorption von Nährstoffen, sondern bildet ein komplexes System, das eine herausragende Rolle im immunologischen Geschehen innehat. Dies ergibt sich allein aus der Tatsache, dass dieses Organ in einem ungleich größeren Ausmaß als andere Teile des Körpers in Kontakt mit Antigenen kommt. So enthält der Darm ca. 60 % aller Immunglobuline des Körpers und mehr als 10^6 Lymphozyten pro Gramm Gewebe⁹. Die Komplexität dieses Systems zeigt sich auch daran, dass der gesunde Darm einerseits eine riesige Masse von Antigenen aus Nahrung sowie normaler Darmflora toleriert (sogenannte „orale Toleranz“), andererseits enteropathogenen Keimen mit einer adäquaten Immunantwort entgegentritt.

Der Magen-Darm-Trakt bildet dabei eine Barriere gegen antigene Substanzen, die durch verschiedene Faktoren wie z. B. die Magensäure, die Mukusschicht auf dem Darmepithel, die apikalen Membranen der Enterozyten und die *tight junctions* zwischen ihnen gebildet wird ⁹⁷. Diese Barriere spielt auch eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der bereits oben genannten oralen Toleranz, einem Begriff, mit dem die mangelnde Reaktionsfähigkeit reifer Lymphozyten infolge einer vorhergehenden oralen Verabreichung des betreffenden Antigens bezeichnet wird ¹¹⁴. Orale Toleranz entsteht nicht nur gegenüber Bestandteilen der Nahrung, sondern auch gegenüber Keimen der residenten Darmflora ²², die in diesem komplexen System von großer Bedeutung sind.

Die Etablierung der physiologischen Bakterienflora des Darmes beginnt unmittelbar nach der Geburt und setzt sich bis ans Lebensende fort; über 500 verschiedene Spezies besiedeln dieses Organ und spielen durch ihre metabolische Aktivität und ihre Interaktion mit dem Wirt eine wichtige physiologische Rolle. Wie bedeutend diese Rolle tatsächlich ist, konnte durch zahlreiche Versuchsmodelle mit keimfreien Tieren gezeigt werden, deren intestinales Immunsystem unterentwickelt war. So zeigten sich bei keimfreien Tieren unterentwickelte Peyersche Plaques und mesenteriale Lymphknoten, verringerte Chemotaxis der Makrophagen und deren reduzierte Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung pathogener Keime, eine stark reduzierte Anzahl an Darmlymphozyten oder eine unterentwickelte Milz ^{46,60}. In weiteren Studien führte Keimfreiheit bei Versuchstieren zu zahlreichen anderen Störungen wie einer verringerten Darmoberfläche, veränderten Enzymmustern der Mukosa, einem fehlerhaften IgA-System oder einer gestörten oralen Toleranz ⁴⁷.

Eine zentrale Rolle im Gleichgewicht zwischen oraler Toleranz und Immunabwehr kommt den Zytokinen zu; unterschiedliche Zytokinmuster können ein Entzündungsgeschehen unterdrücken oder in Gang setzen. Die Erkenntnis, dass der gesunde Darm auch ohne Vorliegen eines entzündlichen Prozesses eine hohe Anzahl von Lymphozyten enthält, die darauf ausgerichtet sind,

inflammatorische Zytokine wie IFN- γ zu sezernieren, oder Oberflächenmoleküle wie den Aktivierungsmarker CD69 zu exprimieren, hat zu der Hypothese des Zustandes der „kontrollierten Entzündung“ geführt⁷⁶. Eine Schlüsselrolle bei der Antagonisierung wichtiger inflammatorischer Moleküle wie IFN- γ wird dabei Interleukin-10 sowie dem *transforming growth factor* (TGF)- β zugesprochen¹¹⁵. So konnte gezeigt werden, dass bei IL-10- oder TGF- β -defizienten Versuchstieren dieses System zusammenbricht und eine Entzündung gegen die residente Darmflora entsteht³⁷. Dieses Gleichgewicht konnte durch den Einsatz probiotischer Bakterien vielfach moduliert und eine Verschiebung weg von inflammatorischen und hin zu antiinflammatorischen Immunprofilen erreicht werden. Beispiele für Studien, in denen Probiotika in diesem Zusammenhang erfolgreich getestet wurden sind in **Kap. 1.2.3** aufgeführt.

4.4.1 Modulation der Yersinien-induzierten IL-8-Sekretion

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit galt der Fragestellung, inwieweit physiologische Darmbakterien eine modulatorische Wirkung auf proinflammatorische Mechanismen ausüben. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, wurde die durch den Stamm *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ induzierte Sekretion von Interleukin-8 in HeLa-Zellen als Modell einer proinflammatorischen Reaktion ausgewählt, da die hieran beteiligten Mechanismen auf molekularer Ebene bereits gut untersucht wurden^{35,45,102,104}. Bei den Versuchen stellte sich heraus, dass sich die Teststämme bezüglich ihres Verhaltens in zwei Gruppen einteilen lassen:

1. Stämme, die bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ in signifikanter Weise eine Reduktionen der IL-8-Sekretion bewirken.
2. Stämme, die sich bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ neutral verhalten und die induzierten IL-8-Konzentrationen nicht signifikant modulieren.

In der ersten Gruppe war durch eine weitere Versuchsreihe mit zusätzlicher Gabe von 100 ng/ml TNF- α gezeigt worden, dass die reduzierten IL-8-Konzentrationen bei Co-Infektion nicht auf eine verminderte Viabilität der HeLa-Zellen in Anwesenheit der hohen Anzahl von Bakterien zurückzuführen war: Die infizierten Zellen sezernierten in diesem Fall wieder deutlich höhere IL-8-Konzentrationen, so dass von einem immunomodulatorischen Effekt der Testbakterien ausgegangen werden kann. **Tab. 4.1** gibt nochmals einen zusammenfassenden Überblick über das IL-8-Modulationspotential der einzelnen Teststämme bei Co-Infektion.

Tab. 4.1: IL-8-Modulation durch die Testbakterien (Übersicht)

	IL-8-Modulation bei Co-Infektion mit <i>Yersinia enterocolitica</i> pYV
<i>B. adolescentis</i>	↓
<i>S. salivarius</i>	↓
<i>L. fermentum</i>	↓
<i>B. distasonis</i>	↓
<i>B. vulgatus</i>	→
<i>V. atypica</i>	→
<i>E. coli</i> Nissle 1917	→
<i>E. coli</i> Nissle::wzy536	→
<i>E. coli</i> mpk	↓
<i>E. coli</i> K12	→

Interessant war die Feststellung, dass der bekanntermaßen probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 kein Potential zur Reduktion der IL-8-Sekretion zeigte. Dies passt zu der bereits weiter oben erwähnten Vermutung von Lammers *et al.*, dass dieser gramnegative Stamm seinen probiotischen Einfluss über besondere Mechanismen ausüben könnte, die sich von denen der meisten anderen probiotischen Bakterien offensichtlich unterscheiden. Überraschend

war es auch festzustellen, dass der Stamm *E. coli* mpk hingegen die IL-8-Induktion durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ deutlich zu reduzieren vermochte. Diese Beobachtung scheint abermals die Modellabhängigkeit solcher Versuchsreihen zu unterstreichen: In der bereits erwähnten Arbeit von Waidmann *et al.* hatte sich *E. coli* mpk im Mausmodell als colitogen herausgestellt¹²³, was mit einer antiinflammatorischen Immunomodulation durch reduzierte IL-8-Sekretion schwierig zu vereinbaren ist. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass die Bedingungen im murinen Modell um ein vielfaches komplexer als diejenigen im HeLa-Zellmodell sind. So exprimieren HeLa-Zellen beispielsweise weder TLR1 noch TLR2¹²⁸. Diese sogenannten „*Toll-like receptors*“ sind Homologe der Toll-Rezeptoren der Drosophila-Fliege in Säugetieren und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung mikrobieller Strukturen und der damit im Zusammenhang stehenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems⁶⁶. Zudem verfügen HeLa-Zellen zwar über den für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) notwendigen TLR4-Rezeptor, exprimieren aber nicht MD-2, einem mit der extrazellulären Domäne von TLR4 assoziierten Molekül, welches die LPS-Erkennung durch TLR4 stark verbessert³.

4.4.2 Mechanismen der Yersinien-induzierten IL-8-Sekretion und mögliche Modulationsstellen für Bakterien der physiologischen Darmflora

Nachdem sich gezeigt hatte, dass einige der Teststämme die Yersinien-induzierte IL-8-Produktion signifikant verringern, stellte sich die Frage nach möglichen Mechanismen, die hierfür verantwortlich sein könnten. Hierzu ist es zunächst einmal notwendig zu verstehen, über welche Wege *Y. enterocolitica* pYV⁻ Interleukin-8 in HeLa-Zellen induziert (s. **Abb. 4.1**).

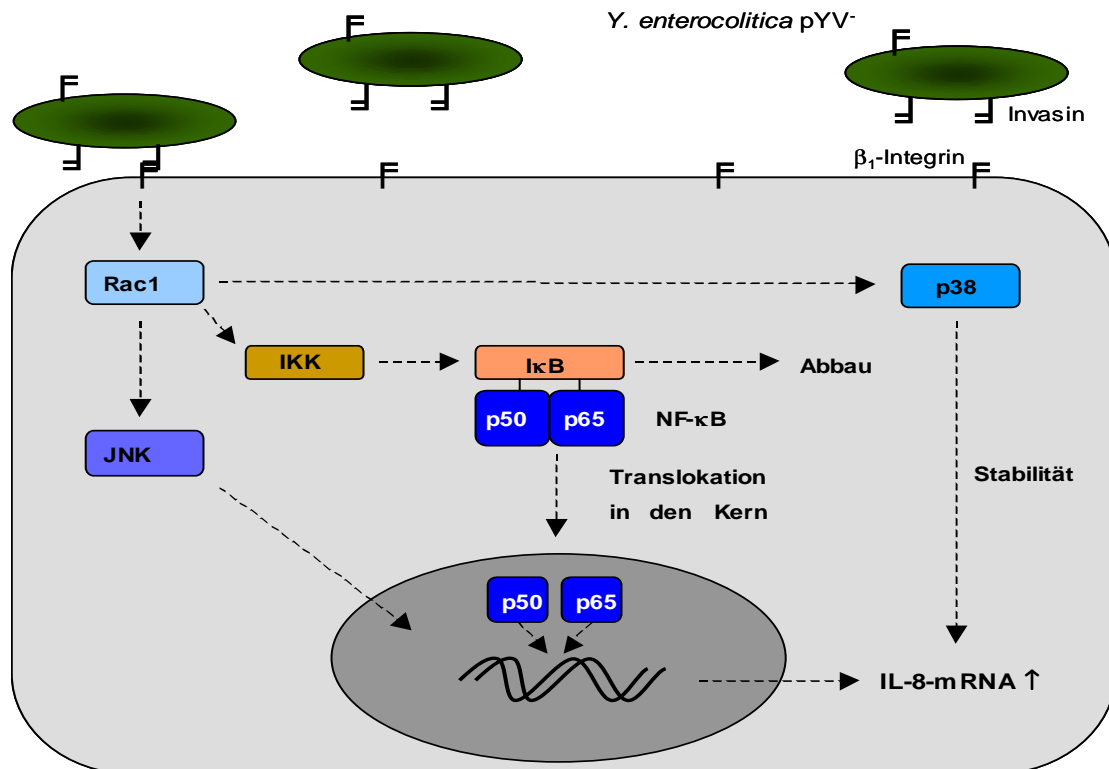


Abb. 4.1: Mechanismus der IL-8-Induktion durch *Yersinia enterocolitica* pYV (schematische Darstellung). Die Bindung des Yersinien-Invasins an das β_1 -Integrin der Zelle stößt einen Signaltransduktionsweg an, zu dessen Beginn die Bedeutung des kleinen G-Proteins Rac1 gezeigt werden konnte. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wobei NF- κ B die wichtigste Rolle zukommt. Nach Aktivierung des Inhibitor-Kinase-Komplexes IKK wird das NF- κ B-Inhibitorprotein I κ B phosphoryliert und ubiquitiniert, wodurch die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 freigegeben und in den Zellkern transloziert werden. Dort binden sie an die Promoterregion des IL-8-Gens und induzieren somit die Synthese der Interleukin-8-mRNA, deren Stabilität zudem durch die MAP-Kinase p38 erhöht wird.

NF- κ B: *nuclear factor- κ B*, I κ B: *inhibitor of NF- κ B*, IKK: *inhibitor of NF- κ B kinase*, JNK: *c-Jun N-terminal protein kinase*, IL-8: *Interleukin-8*, mRNA: *messenger ribonucleic acid*.

Schulte *et al.* konnten zeigen, dass die IL-8-Induktion durch *Y. enterocolitica* pYV über das äußere Membranprotein Invasin erfolgt¹⁰². Invasin vermittelt die bakterielle Invasion, indem es an die β_1 -Integrine auf der Wirtszellmembran bindet⁴⁵. Wurden bei den Versuchen Invasin-defiziente Mutanten für die Infektion benutzt, blieb die IL-8-Expression aus. In einer früheren Arbeit hatte

sich jedoch gezeigt, dass eine Invasion der Zellen durch *Yersinia* keine notwendige Voraussetzung hierfür darstellt: Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) hemmte die Zellinvasion durch *Yersinia*, zeigte aber keinen Effekt auf die IL-8-Induktion. Wurden HeLa-Zellen mit einem das Invasin exprimierenden *E. coli*-Stamm infiziert, induzierte auch dieser sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Wortmannin IL-8¹⁰⁴. Hierzu passen auch die Ergebnisse anderer Arbeiten, die bei Infektion mit weiteren pathogenen Bakterien (z. B. *Salmonella typhimurium*) feststellten, dass die Invasion in die Wirtszelle keine unbedingte Voraussetzung für die Induktion von IL-8 darstellt^{25,32}.

Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass die 195 C-terminalen Aminosäuren des Invasinproteins von *Y. enterocolitica* pYV⁻ den entscheidenden Faktor darstellen, da hiermit assoziierte Latex-Beads bereits zur IL-8-Induktion in der Lage sind¹⁰².

In den Signaltransduktionswegen, die schließlich zur Biosynthese von Interleukin-8 führen, sind verschiedene Transkriptionsfaktoren von Bedeutung, wobei aber NF- κ B eine zentrale Rolle zukommt^{64,70,71,130}. Auch bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ kommt es nach Abbau der Inhibitor-Untereinheit I κ B- α zur Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 in den Kern und schließlich zur Synthese von IL-8¹⁰².

Durch weitere Analysen konnte überdies gezeigt werden, dass die kleine GTPase Rac1 sowie die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) p38 und JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*) eine entscheidende Rolle spielen³⁵. p38 und JNK vermitteln schließlich mit MEK1 (MAP-Kinase-Kinase 1) die Aktivierung des IL-8-Genes auf Transkriptionsebene; zudem trägt p38 zur Stabilisierung der IL-8-mRNA bei³⁵.

Vor dem Hintergrund dieser Mechanismen wären somit grundsätzlich zwei Wege denkbar, über welche die Testbakterien die IL-8-Induktion durch *Yersinia* verringern könnten: Zum einen könnte die Adhäsion an die HeLa-Zellen und damit die für den weiteren Verlauf entscheidende Kontaktaufnahme zwischen Invasin der Yersinien und β_1 -Integrin der HeLa-Zellen verhindert werden. Zum

anderen wäre es vorstellbar, dass die Testbakterien (bzw. von ihnen sezernierte Faktoren) in die nachgeschaltete Signaltransduktionskette eingreifen, die letztendlich über die Aktivierung von NF- κ B zur Biosynthese von IL-8 führt. In der Tat konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass unterschiedliche probiotische Stämme zu derartigen Modulationsmechanismen in der Lage sind.

Inhibition der Adhäsion und Invasion pathogener Keime

Verschiedene Forschungsgruppen konnten durch den Einsatz probiotischer Bakterien teils massive Reduktionen der Fähigkeit pathogener Keime zur Adhäsion an bzw. Invasion in Wirtszellen erzielen^{8,41}. Hierzu existieren zwei Erklärungsmodelle: Entweder die probiotischen Bakterien reduzieren die Viabilität der Pathogene in einem solchen Maße, dass diese nicht mehr zur Adhäsion bzw. Invasion in der Lage sind und/oder es kommt zur tatsächlichen Interferenz an den Bindungsstellen der Wirtszelle⁴¹. Der erstgenannte Effekt wurde dabei z.T. auf eine Ansäuerung des Milieus mittels Sekretion von Milchsäure durch *Lactobacillus* spp. zurückgeführt⁷⁹, z.T. waren nicht-azide, antimikrobiell wirksame Substanzen verantwortlich¹². Eine weitere Hypothese wurde von Hirano *et al.* vorgeschlagen⁴¹. Sie stellten fest, dass *Lactobacillus rhamnosus* die Invasion durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in humanen Kolonepithelzellen signifikant reduzierte, nicht aber die Adhäsion. Auch zeigte sich kein nachteiliger Effekt auf die Viabilität der *E. coli*-Bakterien. Die Hemmung der EHEC-Invasion ließ sich durch den Einsatz hitzegetöteter *L. rhamnosus* nicht wiederholen. Hieraus schlossen die Autoren, dass die reduzierte EHEC-Invasion ein Resultat der Interaktion zwischen Probiotikum und Wirtszelle mit anschließender Modulation der Wirtszellantwort auf die Anwesenheit der EHEC sein könnte.

Eingriff in die Signaltransduktionskette zur Aktivierung von NF- κ B

Die Interferenz in die normalen Aktivierungsabläufe von NF- κ B ist ein vielfach untersuchtes Phänomen, über welches Mikroorganismen Vorteile für ihre Ausbreitung im Wirtsorganismus erzielen können. Von Bedeutung ist hierbei

auch die Tatsache, dass NF- κ B nicht nur eine inflammatorische Reaktion zu initiieren vermag, sondern auch zur Expression antiapoptotischer Proteine führt; somit hat eine Interferenz mit den NF- κ B-Signaltransduktionswegen auch eine Modulation des Apoptoseverhaltens der Wirtszellen zur Folge:

- Das *Yersinia outer protein P* (YopP) des pYV-positiven Wildtyps von *Yersinia enterocolitica* kann an die β -Untereinheit des NF- κ B-Inhibitor-Kinase-Komplexes IKK binden; die hiermit verbundene Unterbrechung der NF- κ B-Aktivierung führt zur Apoptose-Induktion in Makrophagen^{90,91}.
- Uropathogene *E. coli* können I κ B- α stabilisieren⁵³.
- Auch *Mycobacterium ulcerans* verhindert die Aktivierung von NF- κ B; als Mechanismus wird die Verhinderung der Translokation der NF- κ B-Untereinheiten in den Kern vermutet⁸⁰.
- *Shigella flexneri* aktiviert in hohem Maße NF- κ B⁸⁵. Es wurde spekuliert, dass der Keim hiermit seine Ausbreitung auch fördern kann, indem durch die Entzündungsreaktion die Epithelbarriere gelockert sowie durch die induzierte Diarrhoe ein Austritt in die Umwelt gefördert wird¹¹⁶.
- Die apathogenen Stämme *Salmonella typhimurium* PhoP^c sowie *Salmonella pullorum* verhindern die Ubiquitinierung von I κ B- α und dämpfen somit die durch pathogene Wildtyp-Salmonellen (*S. typhimurium*), TNF- α oder Carbachol induzierte IL-8-Sekretion⁷³.

Ob eine Aktivierung bzw. Hemmung von NF- κ B dem Mikroorganismus oder dem Wirt nützt, ist somit nicht immer eindeutig und hängt von der jeweiligen Situation ab. Einerseits kann der Wirt durch die Aktivierung eine Entzündungsreaktion initiieren und somit eine Infektion durch pathogene Erreger bekämpfen; folglich ist primär eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung für den Mikroorganismus von Vorteil. Andererseits führt NF- κ B wie bereits erwähnt zur Expression antiapoptotischer Proteine, weshalb sich intrazelluläre Keime durch NF- κ B-Aktivierung ihr Habitat erhalten können¹¹⁶. Ein Bakterium, das auf

einen solchen Mechanismus zurückgreift ist beispielsweise *Bartonella henselae*⁵².

Im Falle apathogener Mikroorganismen kann die Unterbrechung der NF- κ B-Signaltransduktionskette auch für den Wirt von Vorteil sein: Es unterbleibt die Ausbildung einer überschießenden Entzündungsreaktion gegen harmlose Mikroorganismen, die nur dem Wirtsorganismus selbst schaden würde. Im Falle von an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leidenden Patienten wäre somit denkbar, dass antiinflammatorische Bakterien zur Normalisierung der Immunsituation im Darm beitragen, indem sie durch Modulation von Signaltransduktionswegen zur Aktivierung von NF- κ B ein Gegengewicht zu unzweckmäßigen inflammatorischen Reaktionen darstellen.

Zur Eingrenzung der in dieser Arbeit verantwortlichen Mechanismen wurde in einer weiteren Versuchsreihe geprüft, inwieweit diejenigen Testbakterien, die eine deutlich reduzierte IL-8-Induktion bewirkt hatten, einen Einfluss auf die Yersinien-Adhäsion bzw. -Invasion ausüben. Hierbei konnten allerdings keine signifikanten Modulationen festgestellt werden (s. **Kap 3.6**). Die Klärung der genauen Mechanismen, die letztendlich für den beobachteten Effekt verantwortlich zeichnen, sind momentan Gegenstand intensiver Forschung in der Arbeitsgruppe. Aus ersten Daten geht dabei hervor, dass häufig bereits mit von den Testbakterien konditionierten Überständen eine signifikante Reduktion der IL-8-Konzentrationen zu erzielen ist; in anderen Fällen gelingt dies auch mit hitzegetöteten Bakterien (unveröffentlichte Daten).

Diese Datenlage sowie die Kenntnis der zentralen Rolle von NF- κ B im IL-8-Induktionsmodell durch *Y. enterocolitica* pYV in HeLa-Zellen legt die Hypothese nahe, dass die Bakterien (bzw. von ihnen sezernierte Faktoren) nach erfolgter Yersinien-Adhäsion in die Signaltransduktionskette zur NF- κ B-Aktivierung eingreifen: Sie könnten z. B. die Inhibitorproteinkinasen (IKKs) inhibieren, die NF- κ B-Inhibitorproteine (I κ Bs) stabilisieren, oder nach erfolgter I κ B-Phosphorylierung deren Ubiquitinierung und somit bereits die Aktivierung von NF- κ B verhindern. Vorstellbar wäre auch die Verhinderung der Translokation der NF- κ B-Untereinheiten in den Kern. Dies muss im Rahmen weiterer

Experimente untersucht werden, die die Expression von NF- κ B in mit den Testbakterien präinkubierten HeLa-Zellen analysieren.

Neish *et al.* warfen in einem ähnlichen Zusammenhang die sehr interessante Frage auf, ob die antiinflammatorisch wirksamen Bakterien direkt für derartige Effekte verantwortlich sind, oder ob die Interaktion zwischen Bakterium bzw. bakteriellem Faktor und eukaryonter Wirtszelle vielmehr einen wirtszelleigenen, antiinflammatorischen Faktor hervorbringt⁷³.

Ein Beispiel für bakterielle Metaboliten, die einen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivierung entfalten können, sind kurzkettige Fettsäuren, so z. B. Butyrat. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Butyrat die Translokation der NF- κ B-Untereinheiten in den Kern verhindern kann, wobei die Stabilität von I κ B jeweils erhalten bleibt^{43,108}.

4.5 Wertung der Daten im Hinblick auf ein Screening-Profil für probiotische Darmbakterien

Die Aufstellung eines Screening-Profiles zur Klassifizierung von Darmbakterien in probiotisch wirksam bzw. inert, aber nicht-probiotisch erscheint schwierig, da es bei den meisten Versuchsreihen (Apoptose-Induktion, IL-8-Induktion bei Mono-Infektion) nicht möglich war, klare Unterschiede zwischen offensichtlich probiotischen bzw. lediglich apathogenen Stämmen zu eruieren. Nichtsdestotrotz war es möglich, vier Stämme zu identifizieren, die aufgrund der beobachteten antiinflammatorischen Modulation der IL-8-Sekretion in Verbindung mit ihrer Apathogenität als probiotisch in Frage kommen: *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus salivarius* sowie *Bacteroides distasonis*. Diese Stämme wurden aus den Fäzes gesunder Erwachsener isoliert; die drei erstgenannten gehören überdies zu den Gattungen, denen die meisten bekannten probiotischen Bakterien zuzurechnen sind. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich tatsächlich um probiotisch wirksame Mikroorganismen handeln könnte.

Um diese Bakterienstämme tatsächlich als probiotisch einstufen zu können, müssen sie jedoch im Rahmen weiterführender Studien eingehender untersucht werden, z. B. im Hinblick auf ein anticolitogenes Potential *in vivo*. Als Modell kommen beispielsweise chemisch induzierte Colitiden in Frage, die durch Applikation von DSS (*dextran sulfate sodium*)⁶² oder TNBS (*2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*)⁷⁵ ausgelöst werden können. Erst dann wird eine abschließende Beurteilung möglich sein.

4.6 Ausblick

Wie bereits erwähnt, leidet die Forschung zur bakteriellen Interferenztherapie mit antiinflammatorischen bzw. probiotischen Bakterien darunter, dass zu wenige statistisch belegte und klinisch bestätigte Ergebnisse vorliegen. Zwar wurden in vielen Studien beeindruckende Resultate erzielt, aber vereinfachte *in vitro*-Modelle oder Modelle mit keimfreien Mäusen sind nicht ohne weiteres auf die komplexen *in vivo*-Verhältnisse im menschlichen Darm übertragbar. Nichtsdestotrotz ist die Datenmenge, die auf die Nutzbarkeit probiotischer Bakterien bei unterschiedlichen Erkrankungen hinweist, zu groß, um das Konzept der probiotischen Therapie zu ignorieren. Einen entscheidenden Fortschritt wird die Klärung der Mechanismen bringen, über welche probiotische Bakterien ihre Wirkungen auf molekularer Ebene erzielen.

Darüber hinaus wird es von großer Bedeutung sein, probiotische Stämme nach Feststellung ihrer vorteilhaften Effekte systematisch im Rahmen pharmakologischer Studien zu prüfen, die sich an den Standards messen lassen müssen, welche auch für alle anderen Medikamente gelten. Nach Ausschluss potentiell pathogener Eigenschaften und Klärung einer geeigneten Darreichungsform, die die Verfügbarkeit einer adäquaten Anzahl lebensfähiger Bakterien im Zielorgan Darm sicherstellt, müssen ausreichend große, möglichst randomisierte, Placebo-kontrollierte und doppelblinde Studien folgen, die in nachvollziehbarer Weise die Wirksamkeit der probiotischen Zubereitungen unter Beweis stellen. Sollte es gelingen, im Rahmen solcher Studien die Wirksamkeit klar definierter probiotischer Stämme (oder Kombinationen aus

verschiedenen Stämmen) unter Beweis zu stellen, würde das Konzept der probiotischen Therapie tatsächlich eine Reihe neuer und höchst interessanter Möglichkeiten mit sich bringen.

Ein Gebiet, auf dem der Einsatz protektiver Bakterien besonders nahe liegt und auch intensiv erforscht wird, sind die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (s. **Kap. 1.1.2**). Derzeitige Therapiekonzepte bei diesen Erkrankungen greifen auf den Einsatz immunsuppressiver Medikamente zurück, die zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen nach sich ziehen und die Lebensqualität der Patienten deutlich beeinträchtigen können. Der Einsatz antiinflammatorischer Mikroorganismen der physiologischen Darmflora zur Regulation der gastrointestinalen Immunsituation dieser Patienten könnte als ergänzende Therapiestrategie eine Verbesserung der Lebensqualität erzielen. Erste Hinweise hierfür konnten auch schon in klinischen Studien gefunden werden⁸⁸.

Als weiteres Beispiel sei die Problematik der steigenden Antibiotikaresistenzen genannt. Eine bakterielle Interferenztherapie mit Einsatz probiotischer Stämme, die über unterschiedliche Mechanismen ihre Wirkungen entfalten, würde die Entstehung von Resistenzen bei pathogenen Keimen, wie sie im Zusammenhang mit Antibiotikatherapien beobachtet wird, erschweren und könnte auch auf diesem Gebiet einen Fortschritt darstellen und neue, höchst interessante Impulse geben^{5,125}.

5 Zusammenfassung

Die Bakterien der physiologischen Darmflora spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase des Intestinaltraktes, u.a durch Stimulation und Modulation des Immunsystems. Von besonderem Interesse sind hierbei sogenannte probiotische Bakterien, also Mikroorganismen, die per Definition für den Wirt vorteilhafte Wirkungen entfalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Modulation proinflammatorischer Mechanismen durch Bakterien der physiologischen Darmflora. Als Modell einer proinflammatorischen Reaktion wurde die Yersinien-induzierte IL-8-Sekretion in HeLa-Zellen gewählt. Bei den Testbakterien handelte es sich um den probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917, mehrere kommensale *E. coli*-Stämme, sowie eine Reihe weiterer Bakterien, die aus den Fäzes gesunder Erwachsener isoliert wurden und zu den Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides* sowie *Veillonella* gehören.

Im ersten Schritt sollte die Fähigkeit der Testbakterien zur Adhäsion an HeLa-Zellen geprüft werden.

Im zweiten Schritt sollte bestätigt werden, dass die Teststämme selbst kein inflammatorisches oder toxisches Potential gegenüber HeLa-Zellen entfalten. Hierzu wurden die Bakterien im Hinblick auf Invasion sowie Apoptose- und IL-8-Induktion untersucht.

Anschließend wurde geprüft, inwieweit die Teststämme in der Lage sein würden, das ausgeprägte IL-8-induzierende Potential des enteropathogenen Stammes *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ zu modulieren.

Dabei lieferte diese Arbeit folgende Ergebnisse:

1. Die Teststämme zeigten im Vergleich zur Positivkontrolle (*Yersinia enterocolitica* pYV⁻) nur ein sehr geringes Adhäsionsvermögen an HeLa-Zellen.

2. Keiner der Teststämme invadierte HeLa-Zellen.
3. Keiner der Teststämme induzierte Apoptose in HeLa-Zellen.
4. Keiner der Teststämme induzierte bei Mono-Infektion von HeLa-Zellen eine signifikante Sekretion von Interleukin-8.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Teststämme selbst keine inflammatorischen oder toxischen Eigenschaften besitzen.

5. Bei Co-Infektion von HeLa-Zellen mit den Teststämmen sowie *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ konnten diese aufgrund ihres Verhaltens in zwei Gruppen eingeteilt werden:
 - i) Teststämme, die bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ eine signifikante Reduktion der IL-8-Sekretion durch HeLa-Zellen bewirken.
 - ii) Stämme, die sich bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ neutral verhalten und die induzierten IL-8-Konzentrationen kaum modulieren.
6. Eine Inhibition der Yersinien-Adhäsion an oder -Invasion in HeLa-Zellen durch die Teststämme fand nicht statt.

Da die Mechanismen, die in HeLa-Zellen zur IL-8-Induktion durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ führen, gut charakterisiert sind und sich im untersuchten Versuchsmodell signifikante Modulationen durch einige der Teststämme zeigten, konnte diese Arbeit einen Einblick in die Wirkungsweise geben, über die Darmbakterien eine antiinflammatorische Immunomodulation bewirken und somit einen Beitrag zur Charakterisierung probiotischer Mechanismen leisten.

Von Interesse war hierbei die Beobachtung, dass der bekanntermaßen probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 keine Modulation der IL-8-Sekretion bewirkte, während beispielsweise der in anderen Arbeiten colitogene Stamm *E. coli* mpk hierzu in der Lage war. Diese Tatsache deutet auf die Komplexität und Vielfalt der Mechanismen hin, über die unterschiedliche Darmbakterien in verschiedenen *in vitro*-Modellsystemen bzw. *in vivo* mit den Wirtszellen interagieren.

Gerade in dieser Komplexität liegt einerseits die Schwierigkeit, klare Therapiekonzepte mit probiotischen Bakterienstämmen aufzustellen, andererseits zeigt sie das Potential dieser Mikroorganismen auf, das nicht ungenutzt bleiben und im Rahmen weitergehender Studien auf molekularer Ebene detailliert charakterisiert werden sollte.

Bezüglich der Fragestellung, ob die hier verwendeten *in vitro*-Parameter als Screening-Profil für probiotische Darmbakterien in Frage kommen, lässt sich feststellen, dass zwar keine genaue Klassifizierung, jedoch eine Identifizierung potentiell probiotischer Stämme möglich ist. In diesem Fall handelt es sich hierbei um *L. fermentum*, *B. adolescentis*, *S. salivarius* sowie *B. distasonis*, die sowohl apathogen sind als auch signifikante antiinflammatorische Modulationen im IL-8-Induktions-Modell mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ erzielten.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aderem, A. and R. J. Ulevitch.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:782-787.
2. **Adlerberth, I., S. Ahrne, M. L. Johansson, G. Molin, L. A. Hanson, and A. E. Wold.** 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2244-2251.
3. **Akashi, S., R. Shimazu, H. Ogata, Y. Nagai, K. Takeda, M. Kimoto, and K. Miyake.** 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **164**:3471-3475.
4. **Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser.** 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**:97-179.
5. **Bengmark, S.** 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42**:2-7.
6. **Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin.** 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35**:483-489.
7. **Bjorksten, B.** 1994. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* **49**:400-407.
8. **Boudeau, J., A. L. Glasser, S. Julien, J. F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud.** 2003. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**:45-56.
9. **Bourlioux, P., B. Koletzko, F. Guarner, and V. Braesco.** 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**:675-683.
10. **Cherla, R. P., S. Y. Lee, and V. L. Tesh.** 2003. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**:159-166.
11. **Christensen, H. R., H. Frokiaer, and J. J. Pestka.** 2002. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**:171-178.

12. **Coconnier, M. H., M. F. Bernet, S. Kerneis, G. Chauviere, J. Fourniat, and A. L. Servin.** 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**:299-305.
13. **Collins, M. T., G. Lisby, C. Moser, D. Chicks, S. Christensen, M. Reichelderfer, N. Hoiby, B. A. Harms, O. O. Thomsen, U. Skibsted, and V. Binder.** 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4373-4381.
14. **Cornelis, G. R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**:243-263.
15. **Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1315-1352.
16. **Cossart, P.** 1997. Host/pathogen interactions. Subversion of the mammalian cell cytoskeleton by invasive bacteria. *J. Clin. Invest.* **99**:2307-2311.
17. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16-24.
18. **Crowe, S. E., L. Alvarez, M. Dytoc, R. H. Hunt, M. Muller, P. Sherman, J. Patel, Y. Jin, and P. B. Ernst.** 1995. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology* **108**:65-74.
19. **de Vrese, M., A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Laue, and J. Schrezenmeir.** 2001. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:421S-429S.
20. **Delor, I., A. Kaeckenbeeck, G. Wauters, and G. R. Cornelis.** 1990. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersiniae*. *Infect. Immun.* **58**:2983-2988.
21. **Didierlaurent, A., J. C. Sirard, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 2002. How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.* **4**:61-72.
22. **Duchmann, R., I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe, and K. H. Meyer zum Buschenfelde.** 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* **102**:448-455.

23. **Dunne, C.** 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflamm. Bowel. Dis.* **7**:136-145.
24. **Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins.** 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:386S-392S.
25. **Eaves-Pyles, T., C. Szabo, and A. L. Salzman.** 1999. Bacterial invasion is not required for activation of NF-kappaB in enterocytes. *Infect. Immun.* **67**:800-804.
26. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer.** 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* **61**:4569-4574.
27. **Elewaut, D., J. A. DiDonato, J. M. Kim, F. Truong, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff.** 1999. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.* **163**:1457-1466.
28. **FAO and WHO.** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001.
29. **Fellermann, K. and E. F. Stange.** 2001. Defensins - innate immunity at the epithelial frontier. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**:771-776.
30. **Fiorentini, C., A. Fabbri, L. Falzano, A. Fattorossi, P. Matarrese, R. Rivabene, and G. Donelli.** 1998. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* **66**:2660-2665.
31. **Fuller R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**:365-378.
32. **Gewirtz, A. T., A. M. Siber, J. L. Madara, and B. A. McCormick.** 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun.* **67**:608-617.
33. **Gibson, G. R. and R. Fuller.** 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* **130**:391S-395S.
34. **Gilat, T., D. Hacoheh, P. Lilos, and M. J. Langman.** 1987. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**:1009-1024.

35. **Grassl, G. A., M. Kracht, A. Wiedemann, E. Hoffmann, M. Aepfelbacher, C. v. Eichel-Streiber, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. Activation of NF- κ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell. Microbiol.* **5**:957-971.
36. **Grassme, H., V. Jendrossek, and E. Gulbins.** 2001. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis* **6**:441-445.
37. **Groux, H. and F. Powrie.** 1999. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol. Today* **20**:442-445.
38. **Grozdanov, L., U. Zahringer, G. Blum-Oehler, L. Brade, A. Henne, Y. A. Knirel, U. Schombel, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, E. T. Rietschel, and U. Dobrindt.** 2002. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **184**:5912-5925.
39. **Havenaar, R. and M. J. H. Huis In't Veld.** 1992. Probiotics: a general view. Lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam.
40. **Heesemann, J.** 1987. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:229-233.
41. **Hirano, J., T. Yoshida, T. Sugiyama, N. Koide, I. Mori, and T. Yokochi.** 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol. Immunol.* **47**:405-409.
42. **Hollander, D.** 1999. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **1**:410-416.
43. **Inan, M. S., R. J. Rasoulpour, L. Yin, A. K. Hubbard, D. W. Rosenberg, and C. Giardina.** 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**:724-734.
44. **Isberg, R. R.** 1989. Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species. *Mol. Microbiol.* **3**:1449-1453.
45. **Isberg, R. R. and J. M. Leong.** 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Immunity.* **60**:861-871.

-
46. **Isolauri, E.** 2001. Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:1142S-1146S.
 47. **Isolauri, E., P. V. Kirjavainen, and S. Salminen.** 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* **50 Suppl 3**:III54-III59.
 48. **Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:171-200.
 49. **Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* **95**:55-65.
 50. **Karin, M. and Y. Ben Neriah.** 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappa B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:621-663.
 51. **Keates, S., Y. S. Hitti, M. Upton, and C. P. Kelly.** 1997. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **113**:1099-1109.
 52. **Kempf, A. J. V., A. Schairer, D. Neumann, G. A. Grassl, M. Lebidziejewski, M. Schaller, P. Kyme, S. Wesselborg, and I. B. Autenrieth.** 2004. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell. Microbiol.* (in press).
 53. **Kitamura, M.** 1999. NF-kappaB-mediated self defense of macrophages faced with bacteria. *Eur. J. Immunol.* **29**:1647-1655.
 54. **Lammers, K. M., U. Helwig, E. Swennen, F. Rizzello, A. Venturi, E. Caramelli, M. A. Kamm, P. Brigidi, P. Gionchetti, and M. Campieri.** 2002. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.* **97**:1182-1186.
 55. **Ligny, G.** 1975. Le traitement par l'Ultralevure des troubles intestinaux secondaires à l'antibiothérapie. Etude en double aveugle et étude clinique simple. (*Saccharomyces boulardii* as a treatment for antibiotic associated disorders. A double blind study.). *Revue Française de Gastroentérologie* **114**:45-50.
 56. **Lilly, D.M. and R.H. Stillwell.** 1965. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* **147**:747-748.
 57. **Lin, M. Y., C. L. Yen, and S. H. Chen.** 1998. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing *lactobacilli*. *Dig. Dis. Sci.* **43**:133-137.

-
58. **Ling, W. H., R. Korpela, H. Mykkanen, S. Salminen, and O. Hanninen.** 1994. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.* **124**:18-23.
 59. **Lodinova-Zadnikova, R. and U. Sonnenborn.** 1997. Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol. Neonate* **71**:224-232.
 60. **Lu, L. and W. A. Walker.** 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:1124S-1130S.
 61. **Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell, and C. De Simone.** 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* **121**:580-591.
 62. **Mahler, M., I. J. Bristol, E. H. Leiter, A. E. Workman, E. H. Birkenmeier, C. O. Elson, and J. P. Sundberg.** 1998. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol.* **274**:G544-G551.
 63. **Marteau, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J. F. Desjeux, and J. C. Rambaud.** 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.* **64**:71-79.
 64. **Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira.** 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10193-10197.
 65. **Matsuzaki, T., R. Yamazaki, S. Hashimoto, and T. Yokokura.** 1998. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.* **81**:48-53.
 66. **Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:135-145.
 67. **Menge, H.** 2001. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. *In* W. Siegenthaler (Hrsg.). *Klinische Pathophysiologie*. Thieme. S. 837-838.
 68. **Miller, V. L. and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**:1242-1248.

-
69. **Moss, M. T., J. D. Sanderson, M. L. Tizard, J. Hermon-Taylor, F. A. el Zaatari, D. C. Markesich, and D. Y. Graham.** 1992. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* **33**:1209-1213.
 70. **Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima.** 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **265**:21128-21133.
 71. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima.** 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **56**:554-558.
 72. **Munzenmaier, A., C. Lange, E. Glocker, A. Covacci, A. Moran, S. Bereswill, P. A. Baeuerle, M. Kist, and H. L. Pahl.** 1997. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J. Immunol.* **159**:6140-6147.
 73. **Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao, and J. L. Madara.** 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* **289**:1560-1563.
 74. **Neumann, E., M. A. Oliveira, C. M. Cabral, L. N. Moura, J. R. Nicoli, E. C. Vieira, D. C. Cara, G. I. Podoprigora, and L. Q. Vieira.** 1998. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:1565-1573.
 75. **Neurath, M., I. Fuss, and W. Strober.** 2000. TNBS-colitis. *Int. Rev. Immunol.* **19**:51-62.
 76. **O'Farrelly, C.** 1998. Just how inflamed is the normal gut? *Gut* **42**:603-604.
 77. **O'Sullivan, D. J.** 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **49**:1751-1760.
 78. **O'Sullivan, G. C.** 2001. Probiotics. *Br. J. Surg.* **88**:161-162.
 79. **Ogawa, M., K. Shimizu, K. Nomoto, R. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki, T. Takeda, and Y. Takeda.** 2001. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **68**:135-140.
 80. **Pahlevan, A. A., D. J. Wright, C. Andrews, K. M. George, P. L. Small, and B. M. Foxwell.** 1999. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans*

- soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J. Immunol.* **163**:3928-3935.
81. **Pai, C. H. and V. Mors.** 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **19**:908-911.
 82. **Parker R.B.** 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* **29**:4-8.
 83. **Pelto, L., E. Isolauri, E. M. Lilius, J. Nuutila, and S. Salminen.** 1998. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* **28**:1474-1479.
 84. **Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, and N. Gobbato.** 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* **78**:1597-1606.
 85. **Philpott, D. J., S. Yamaoka, A. Israel, and P. J. Sansonetti.** 2000. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.* **165**:903-914.
 86. **Plein, K. and J. Hotz.** 1993. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea - a pilot study. *Z. Gastroenterol.* **31**:129-134.
 87. **Pugsley, A. P.** 1984. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**:168-175.
 88. **Rembacken, B. J., A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers, and A. T. Axon.** 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**:635-639.
 89. **Rowbotham, D. S., N. P. Mapstone, L. K. Trejdosiewicz, P. D. Howdle, and P. Quirke.** 1995. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* **37**:660-667.
 90. **Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot, and J. Heesemann.** 2001. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* **166**:1823-1831.
 91. **Ruckdeschel, K., K. Richter, O. Mannel, and J. Heesemann.** 2001. Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect. Immun.* **69**:7652-7662.

92. **Rutgeerts, P., M. Hiele, K. Geboes, M. Peeters, F. Penninckx, R. Aerts, and R. Kerremans.** 1995. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* **108**:1617-1621.
93. **Salminen, S.** 1996. Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr. News Lett.* **5**:16-18.
94. **Salminen, E., I. Elomaa, J. Minkkinen, H. Vapaatalo, and S. Salminen.** 1988. Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Clin. Radiol.* **39**:435-437.
95. **Salyers, A. A. and D. D. Whitt.** 2002. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D.C.
96. **Sanders, M. E.** 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* **130**:384S-390S.
97. **Sanderson, I. R. and W. A. Walker.** 1993. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* **104**:622-639.
98. **Sartor, R. B.** 1995. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **24**:475-507.
99. **Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht.** 1997. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am. J. Physiol.* **273**:C1160-C1167.
100. **Schrezenmeir, J. and M. de Vrese.** 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:361S-364S.
101. **Schulte, R. and I. B. Autenrieth.** 1998. *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect. Immun.* **66**:1216-1224.
102. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 2000. **14**:1471-1484.
103. **Schulte, R., P. Wattiau, E. L. Hartland, R. M. Robins Browne, and G. R. Cornelis.** 1996. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **64**:2106-2113.
104. **Schulte, R., R. Zumbihl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I. B. Autenrieth.** 1998. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered

- internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **187**:53-60.
105. **Schultsz, C., M. Moussa, K. R. van, G. N. Tytgat, and J. Dankert.** 1997. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Clin. Pathol.* **50**:573-579.
 106. **Schultsz, C., F. M. Van Den Berg, F. W. Ten Kate, G. N. Tytgat, and J. Dankert.** 1999. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* **117**:1089-1097.
 107. **Schultz, M., S. L. Tonkonogy, R. K. Sellon, C. Veltkamp, V. L. Godfrey, J. Kwon, W. B. Grenther, E. Balish, I. Horak, and R. B. Sartor.** 1999. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J. Physiol.* **276**:G1461-G1472.
 108. **Segain, J. P.** 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**:397-403.
 109. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and L. D. Kerr.** 1998. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.* **160**:2401-2407.
 110. **Stallmach, A. and M. Zeitz.** 1999. Immunologie des Intestinaltrakts. *In* W. F. Caspary and J. Stein (Hrsg.). *Darmkrankheiten. Klinik, Diagnostik und Therapie.* Springer. S. 55-61.
 111. **Stein, J., F. Makowiec, R. M. Starlinger, and W. F. Caspary.** 1999. Colitis ulcerosa. *In* W. F. Caspary and J. Stein (Hrsg.). *Darmkrankheiten. Klinik, Diagnostik und Therapie.* Springer. S. 465-489.
 112. **Stein, J., F. Makowiec, R. M. Starlinger, and W. F. Caspary.** 1999. Morbus Crohn. *In* W. F. Caspary and J. Stein (Hrsg.), *Darmkrankheiten. Klinik, Diagnostik und Therapie.* Springer. S. 439-464.
 113. **Strieter, R. M., S. L. Kunkel, V. M. Elnor, C. L. Martonyi, A. E. Koch, P. J. Polverini, and S. G. Elnor.** 1992. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am. J. Pathol.* **141**:1279-1284.
 114. **Strobel, S.** 2002. Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **958**:47-58.
 115. **Strober, W., B. Kelsall, I. Fuss, T. Marth, B. Ludviksson, R. Ehrhardt, and M. Neurath.** 1997. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol. Today* **18**:61-64.

116. **Tato, C. M. and C. A. Hunter.** 2002. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect. Immun.* **70**:3311-3317.
117. **Thomas, M. R., S. C. Litin, D. R. Osmon, A. P. Corr, A. L. Weaver, and C. M. Lohse.** 2001. Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin. Proc.* **76**:883-889.
118. **Tissier, H.** 1984. Taxonomy and ecology of *Bifidobacteria*. *Bifidobacteria Microflora* **3**:11-28.
119. **Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, and S. Salminen.** 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:393S-398S.
120. **Turunen, U. M., M. A. Farkkila, K. Hakala, K. Seppala, A. Sivonen, M. Ogren, M. Vuoristo, V. V. Valtonen, and T. A. Miettinen.** 1998. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* **115**:1072-1078.
121. **Van Niel, C. W., C. Feudtner, M. M. Garrison, and D. A. Christakis.** 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* **109**:678-684.
122. **Venturi, A., P. Gionchetti, F. Rizzello, R. Johansson, E. Zucconi, P. Brigidi, D. Matteuzzi, and M. Campieri.** 1999. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**:1103-1108.
123. **Waidmann, M., O. Bechtold, J. S. Frick, H. A. Lehr, S. Schubert, U. Dobrindt, J. Loeffler, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* **125**:162-177.
124. **Welsch, U.** 2003. Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
125. **WHO.** WHO Scientific Working Group on Monitoring and Management of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. 1994.
126. **Wold, A. E.** 1998. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* **53**:20-25.
127. **Wurzelmann, J. I., C. M. Lyles, and R. S. Sandler.** 1994. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **39**:555-560.

-
128. **Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, A. Visintin, S. C. Smith, S. Boussof, D. M. Segal, G. W. Duff, and S. K. Dower.** 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J. Immunol.* **165**:7125-7132.
 129. **Yan, F. and D. B. Polk.** 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**:50959-50965.
 130. **Yasumoto, K., S. Okamoto, N. Mukaida, S. Murakami, M. Mai, and K. Matsushima.** 1992. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.* **267**:22506-22511.
 131. **Zöfel, P.** 1985. *Statistik in der Praxis.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

7 Abkürzungen

In der folgenden Aufzählung nicht enthalten sind Elemente des Periodensystems.

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B.	<i>Bacteroides</i>
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIN	Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMC	<i>chopped meat carbohydrate</i>
CU	Colitis ulcerosa
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
dest. (H ₂ O)	einfach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (lat.: und so weiter)
evtl.	eventuell
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
FKS	Fetales Kälberserum

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GG	Gorbach <i>and</i> Goldin (Entdecker von <i>Lactobacillus</i> GG)
Gln	Glutamin
h	Stunde
H.	<i>Helicobacter</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>inhibitor of NF-κB kinase</i>
IL	Interleukin
IκB	<i>inhibitor of NF-κB</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal protein kinase</i>
Kap.	Kapitel
KBE	koloniebildende Einheiten
L	Liter
L.	<i>Lactobacillus</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	mol/l
M(-Zelle)	<i>microfolded (cell)</i>
m ²	Quadratmeter
MALT	<i>mucosa associated lymphatic tissue</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Morbus Crohn
MEK	MAP/ERK Kinase
MEK1	MAP-Kinase-Kinase 1
min	Minute

MI	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/l
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mpk	Max von Pettenkofer
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol/l
NBS-LRR	<i>nucleotide binding site plus leucine-rich repeats</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
Ng	Nanogramm
NK(-Zelle)	<i>natural killer (cell)</i>
Nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pg	Picogramm
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
pYV	<i>Yersinia virulence plasmid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s.	siehe
S.	<i>Streptococcus</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
S.	<i>Salmonella</i>
sec	Sekunde
slgA	sekretorisches IgA
SPF	<i>specific pathogen-free</i>
spp.	Spezies

subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	<i>trademark</i>
TNBS	<i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	<i>TdT-dUTP terminal nick-end labeling</i>
u.a.	unter anderem
V.	<i>Veillonella</i>
v.a.	vor allem
WHO	<i>World Health Organization</i>
Y.	<i>Yersinia</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
z. B.	zum Beispiel

8 Danksagungen

Mein Dank gilt Professor Dr. Ingo B. Autenrieth für die Überlassung der Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie Dr. med. Julia-Stefanie Frick für die ideenreiche Betreuung und Anleitung bei der Durchführung.

Ferner möchte ich mich bei Sandra Kovačević bedanken, die die Vorversuche zur Adhäsion und Invasion durchgeführt hat sowie bei Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke für die Bereitstellung eines Großteils der Testbakterien.

Des weiteren bedanke ich mich bei Juliane Krejci, Birgit Manncke sowie Frauke Kahl, die durch stets professionelle und geduldige Einarbeitung in zellbiologische und bakteriologische Arbeitstechniken die praktische Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Joo-Hee Wälzlein, Urs Eehalt sowie Christian Eberhardt für deren freundschaftliche Unterstützung in der Entstehungsphase dieser Arbeit.

Allen anderen Institutsmitarbeitern sei für das sehr angenehme und produktive Arbeitsklima gedankt.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Matteo Quitadamo
Geburtstag, Geburtsort: 01.08.1974, Ludwigsburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: italienisch

Schulbildung

09/1981 – 07/1985: Gustav-Sieber-Grundschule, Tamm
09/1985 – 07/1991: Realschule, Tamm
10/1992 – 07/1994: Dr.-Bénédict-Fremdspracheninstitut, Stuttgart
02/1997 – 07/2000: Abendgymnasium, Stuttgart

Berufliche Tätigkeiten

01/1995 – 12/1998: kaufmännischer Angestellter bei Firma Otto Specht GmbH, Stuttgart
04/1999 – 09/2000: kaufmännischer Angestellter bei Firma Hewlett Packard GmbH, Böblingen

Studium

10/2000 – 11/2006: Medizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
08/2002: Physikum
08/2003: 1. Staatsexamen
08/2005: 2. Staatsexamen
17/11/2006: 3. Staatsexamen

Promotion

11/2002 – 07/2004: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard Karls Universität Tübingen, Professor Dr. I. B. Autenrieth

