

Einfluss von Probiotika auf den Wirtsfettstoffwechsel

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

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

vorgelegt von

Bartke geb. Zubke, Ruth

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Julia-Stefanie Frick

2. Berichterstatter: Professor Dr. Stephan C. Bischoff

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1.1. Adipositas und Übergewicht	10
1.1.1. Definition und Prävalenz von Adipositas.....	10
1.1.2. Ursachen, Risiken und Behandlung von Adipositas.....	10
1.2. Von der Nahrung zum Fettgewebe	12
1.2.1. Aufnahme der Fette aus der Nahrung.....	12
1.2.2. Transport der Lipide im Blut.....	12
1.2.3. Lipoproteinlipase (LPL) und Hypertriglyceridämie.....	14
1.2.4. Hormonelle Steuerung von Lipogenese und Lipolyse	16
1.2.5. Das Fettgewebe	17
1.3. Darmflora.....	18
1.3.1. Physiologische Darmflora	18
1.3.2. Das Mikrobiom	20
1.3.3. Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora von adipösen und schlanken Menschen	21
1.3.4. Darmflora und Typ-2-Diabetes.....	22
1.4. Definition Probiotika.....	24
1.5. <i>Fasting-induced adipose factor (Fiaf)</i>	25
1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit	28
2.1. Material	30
2.1.1. Mäuse	30
2.1.2. Zellen	30
2.1.2.1. 3T3-L1-Zellen	30
2.1.2.2. Mode K-Zellen	31

2.1.3. Bakterien	31
2.1.3.1. <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	31
2.1.3.2. <i>Bacteroides vulgatus</i> mpk, <i>Escherichia coli</i> mpk und <i>Escherichia coli</i> NISSLE	31
2.1.4. Mikroskop und Software	33
2.1.5. Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen.....	33
2.1.5.1. Zellkulturen.....	33
2.1.5.2. Bakterien	34
2.1.5.3. Oil Red O-Färbung	35
2.1.5.4. RNA-Isolation / qRT-PCR / TaqMan	35
2.2. Methoden	36
2.2.1. Mäuse	36
2.2.1.1. Versuchsablauf.....	36
2.2.1.2. Vorversuch	37
2.2.1.3. Serumanalyse	37
2.2.1.4. Laboranalyse des Lebergewebes	37
2.2.1.5. Quantitative Messung von <i>Fiaf</i> -Rezeptoren.....	38
2.2.2. Zellkulturen.....	41
2.2.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen.....	41
2.2.2.2. Auftauen, Kultivieren und Kryokonservierung der 3T3-L1- und Mode K- Zellen	42
2.2.2.3. 3T3-L1- und Mode K-Zellen aussäen.....	43
2.2.2.4. Differenzierung der 3T3-L1 Zellen	44
2.2.2.5. Herstellung der Mode K-Überstände.....	44
2.2.2.6. Stimulierung der 3T3-L1-Zellen mit Mode K-Überständen	45
2.2.2.7. Versuchsablauf.....	46

2.2.2.8. Oil Red O Färbung bei 3T3-L1 Zellen	48
2.2.2.9. Auswertung des Differenzierungsgrades	50
2.2.3. Bakterien	50
2.2.3.1. Bakterienkultur und Infektion der Zellkulturen und Mäuse.....	50
2.2.3.2. Kryokonservierung von Bakterien	51
2.2.4. Statistik.....	51
3. Ergebnisse	52
3.1. Mäuse	52
3.1.1. Vorversuch	52
3.1.1.1. Gewichtszunahme bei BL/6 Mäusen unter Gabe von <i>B. adolescentis</i> im Vergleich zur Gabe von <i>E. coli</i> mpk, <i>E. coli</i> NISSLE, <i>B. vulgatus</i> sowie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe	52
3.1.2. Hauptversuch	54
3.1.2.1. Gewichtszunahme bei BL/6 Mäusen unter Gabe von <i>B. adolescentis</i> im Vergleich zu einer Kontrollgruppe	54
3.1.2.2. Futtermittelverbrauch	56
3.1.2.3. Bauchfett	57
3.1.2.4. Blutzuckerwerte	59
3.1.2.5. Blutwerte Cholesterin, freie Fettsäuren, Triglyceride und Insulin.....	60
3.1.2.6. Cholesterin und Triglyceride im Lebergewebe	62
3.1.2.7. Expression des Proteins <i>Fiaf</i> im Dünndarmepithel	63
3.2. Zellkulturen.....	64
4. Diskussion	70
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4.2. Die Mechanismen der Wirkung von Kommensalen und Probiotika auf den Fettstoffwechsel <i>in vivo</i>	71

4.3.	Wirkung des Probiotikum <i>Bifidobacterium adolescentis</i> auf den Fettstoffwechsel <i>in vivo</i>	77
4.4.	Wirkung von Probiotika auf Präadipozyten <i>in vitro</i>	78
4.5.	Beeinflussung von <i>Fiaf</i> durch die Darmflora und Probiotika.....	79
4.6.	Methodik und Schlussfolgerung.....	81
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	88
7.	Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	104
8.	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AMPK	Adenosinmonophosphat-stimulierte Proteinkinase
Angptl4	Angiopietin-like protein 4
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB-48	Apolipoprotein B-48
ApoC	Apolipoprotein C
ApoC-2	Apolipoprotein C-2
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
BH	<i>Brain-heart</i>
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
ChREBP	carbohydrate response element binding protein
CV	konventionelle Flora
CV-D	konventionalisiert
CVD	Cardiovascular diseases, Kardiovaskuläre Erkrankungen
DEXA	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular Matrix, extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAO	Food and Agriculture Organization

Abkürzungsverzeichnis

<i>Fiaf</i>	<i>Fasting-induced adipose factor</i>
FS	Fettsäuren
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
HDL	High Density Lipoprotein
HFARP	hepatic/fibrinogen/angiopoietin-related protein
HF	High fat
HFD	High fat diet; fettreiche Diät
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HMP	Human Microbiome Project
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDL	Intermediate Density Proteins
IVC	isolated ventilated cages
KF	keimfrei
LB	Luria-Bertani
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LPL	Lipoproteinlipase
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
MOI	multiplicity of infection
mpk	Max von Pettenkofer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SFCA	short chain fatty acid; kurzkettige Fettsäuren
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	species pluralis
SREBP1	sterol regulatory element binding protein 1
TAG	Triacylglycerole
TG	Triglyceride
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VE	vollentsalzt
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Adipositas und Übergewicht

1.1.1. Definition und Prävalenz von Adipositas

Adipositas ist eine chronische Krankheit, welche die Lebensqualität einschränken und ein hohes Morbiditäts- und Letalitätsrisiko zur Folge haben kann. Die World-Health-Organisation (WHO) definiert sie als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts ¹.

Der Quotient aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat (kg/m^2) nennt sich Body-Mass-Index (BMI) und wird für die Definition von Übergewicht und Adipositas verwendet. Die Prävalenz der Adipositas ($\text{BMI} \geq 30$) nimmt in Deutschland kontinuierlich zu. Im Jahr 2010 waren etwa 60 % der erwachsenen Männer mit einem BMI über 25 übergewichtig und ca. 16 % mit einem BMI ≥ 30 adipös. Bei den erwachsenen Frauen waren etwa 45 % übergewichtig und 16 % adipös ².

Auch bei Kindern nimmt die Fettleibigkeit stark zu: Im Jahr 2011 waren weltweit mehr als 40 Millionen Kinder unter 5 Jahren übergewichtig ³.

1.1.2. Ursachen, Risiken und Behandlung von Adipositas

Die Hauptursache für Adipositas ist ein Ungleichgewicht zwischen Kalorienaufnahme (in Form von Fehlernährung) und Energieabgabe (durch Bewegungsmangel) ⁴. Weitere Ursachen können familiäre Disposition, Stress, Essstörungen, endokrine Erkrankungen, Medikamente, und andere Gründe wie Schwangerschaft, Immobilisierung etc. sein ⁵.

Die Adipositas ist mit dem Metabolischen Syndrom assoziiert, das als entscheidender Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Artherosklerose, Koronare Herzkrankheit) angesehen wird. Zu den Faktoren des Metabolischen Syndroms zählt Hypertonie, Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes, Hypertriglyceridämie und viscerale Adipositas. Aber auch zahlreiche andere Krankheiten wie Karzinome, nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (NASH), degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates und Schlafapnoe können mit Adipositas assoziiert sein ^{6, 7}. Darüber hinaus geht

Einleitung

Fettleibigkeit oft auch mit einer generalisierten, subklinischen Entzündung einher (*low grade inflammation*)⁸.

Die Deutsche Adipositasgesellschaft beschrieb in ihrer „Evidenzbasierten Leitlinie Therapie und Prävention der Adipositas 2007“ ausführlich, wie Adipositas behandelt werden sollte⁵. Präventivmaßnahmen stehen dabei an erster Stelle, denn dadurch können sowohl Kosten als auch Adipositas-assoziierte Schädigungen, die möglicherweise irreversibel sind, vermieden werden. Zudem ist die Prävalenz der Adipositas in den Industrienationen derzeit so hoch, dass für ihre Behandlung nicht genug Ressourcen zur Verfügung stehen.

Die Therapie der Adipositas hat zum Ziel, das Körpergewicht langfristig zu senken, Adipositas-assoziierte Risikofaktoren und Erkrankungen zu minimieren, sowie das Gesundheitsverhalten zu verbessern. Arbeitsunfähigkeit und vorzeitige Berentung sollen reduziert werden, Stressverarbeitung verbessert, und die Lebensqualität gesteigert werden.

Die Basistherapie besteht aus Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenstherapie, und sollte unter ärztlicher Überwachung stattfinden. Genügen die genannten Maßnahmen zur Erreichung des Therapieziels nicht, so kann unter bestimmten Voraussetzungen adjuvant medikamentös (z. B. mit Orlistat oder Rimonabant) oder chirurgisch (z. B. Magenband, Magenbypass, biliopankreatische Diversion und andere) behandelt werden⁵.

Auf der Suche nach weiteren Möglichkeiten, das Übergewicht zu beeinflussen, fand man unter anderem Zusammenhänge zwischen Darmflora und Übergewicht: Gordon et al. zeigten, dass adipöse Mäuse eine andere Zusammensetzung ihrer Darmflora hatten als normalgewichtige Mäuse. Veränderte man die Zusammensetzung ihrer Darmflora, so konnte das Gewicht der Mäuse beeinflusst werden (siehe auch 1.3.3.)⁹.

In dieser Arbeit geht es um die Frage, inwiefern Probiotika einen Einfluss auf Fett- und Energiestoffwechsel haben, und ob dies beeinflusst werden kann (siehe 1.6.).

1.2. Von der Nahrung zum Fettgewebe

1.2.1. Aufnahme der Fette aus der Nahrung

Die mit der Nahrung aufgenommenen Fette (Triacylglycerole, TAG) werden bereits im Magen durch eine säurestabile Lipase aus den Zungengrunddrüsen und den Hauptzellen der Magenmukosa gespalten. Im Duodenum werden die langkettigen Fettsäuren (FS) durch die Pankreaslipase von Triacylglycerolen in 2-Monoacylglycerole und freie Fettsäuren gespalten. Da Fette schlecht wasserlöslich sind, werden sie durch Mizellenbildung in eine hydrophile Form gebracht, und somit emulgiert. Das Grundgerüst von Mizellen wird durch Gallensäuren gebildet. Zentral befinden sich die hydrophoben Fettsäuren, und zur Peripherie orientieren sich die hydrophileren Bestandteile wie 2-Monoacylglycerole und Phospholipide.

Bei Kontakt mit dem Bürstensaum des Dünndarmepithels lösen sich die Lipide aus den Mizellen und können von der Darmwand aufgenommen werden. Kurz- und mittelkettige FS sowie Glycerol sind gerade so hydrophil, dass sie selbstständig in die Enterozyten diffundieren können. Freies Cholesterol und langkettige FS gelangen durch Carrier-vermittelten Transport in die Enterozyten. Die Gallensäuren werden dabei wieder frei und werden entweder zurück ins Darmlumen abgegeben, wo sie erneut Mizellen bilden können, oder sie treten in den enterohepatischen Kreislauf ein¹⁰⁻¹³.

1.2.2. Transport der Lipide im Blut

In den Enterozyten werden die Produkte des Fettabbaus wieder zu TAGs, Phospholipiden und anderen Fetten resynthetisiert. Um die Enterozyten verlassen zu können, werden die Lipide in sogenannte Chylomikronen eingebaut, welche dann in die Lymphbahn abgegeben werden, um unter Umgehung der Leber in die Blutbahn zu gelangen. Chylomikronen sind amphiphile Lipoproteine, die den Transport von Lipiden im Blut ermöglichen und bestehen aus TAGs (85 %), Phospholipiden (9 %), Cholesterol, Cholesterolestern, fettlöslichen Vitaminen (4 %), und aus Apolipoprotein (ApoB-

Einleitung

48, 2 %). Kurz- und mittelkettige FS sowie Glycerol sind wasserlöslich und gelangen direkt von den Enterozyten ins Pfortaderblut.

Im Blut werden weitere Apolipoproteine auf die Chylomikronen übertragen, z. B. ApoE, ApoC und ApoA. ApoC-2 dient als Cofaktor für die endotheliale Lipoproteinlipase (LPL), mit deren Hilfe die Lipide im peripheren Gewebe aus den Lipoproteinen hydrolysiert und in das Fettgewebe eingebaut, oder in den Muskelzellen in Energie umgewandelt werden. Dazu dient auch der LPL-Rezeptor, der auf jeder Zelle vorhanden ist ¹⁰⁻¹³.

Die Chylomikronenreste werden Remnants genannt und bestehen überwiegend aus Cholesterin und Apolipoproteinen. Sie gelangen in die Leber und werden dort abgebaut.

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan, auch für den Aufbau und Abbau der Blutfette. Sie ist unter anderem der wichtigste Syntheseort für Low Density Lipoproteine (LDL) und Very Low Density Lipoproteine (VLDL), wichtigster Abbauort für LDL und Chylomikronen, und sie sezerniert wichtige Enzyme, wie zum Beispiel die LPL und die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) ¹³.

Es gibt verschiedene Lipoproteine, die sich in Größe, Dichte, Lipidzusammensetzung, Bildungsort, sowie durch ihre Apolipoproteine unterscheiden. Letztere dienen als Strukturelemente, als Liganden für Lipoproteinrezeptoren in der Membran der Zielzellen, sowie als Enzymaktivatoren ¹⁴. Die Lipoproteine kursieren also zwischen Leber und Fettgewebe hin- und her und liefern Triglyceride bzw. Cholesterin ab. Dabei werden sie, je nach Funktion, Größe und Dichte, jeweils anders benannt (siehe Abbildung 1).

Ein weiteres Lipoprotein ist beispielsweise HDL (*High-Density-Lipoprotein*). HDL transportiert Cholesterin aus der Peripherie zur Leber und LDL transportiert es von der Leber in die Peripherie.

Einleitung

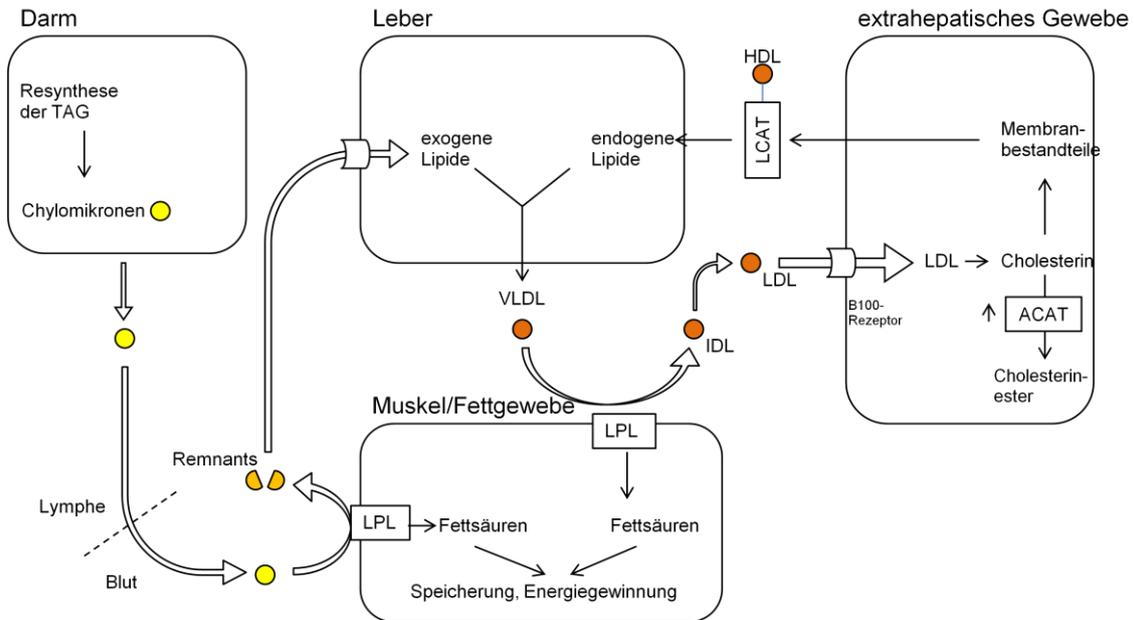


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lipoproteinkreislaufs. Im Darm aufgenommene Fette werden zunächst in den Darmzellen zu Chylomikronen, dann zu Remnants, und in der Leber zu Lipoproteinen umgebaut. Später können sie in den enterohepatischen Kreislauf eintreten. FS=Fettsäuren, TAG=Triacylglycerole, LPL=Lipoproteinlipase, VLDL=very low density lipoproteins, IDL=intermediate density proteins, LDL=low density proteins, HDL=high density lipoproteins, LCAT=Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, ACAT=Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (nach ¹⁵).

1.2.3. Lipoproteinlipase (LPL) und Hypertriglyceridämie

Die Lipoproteinlipase spielt eine zentrale Rolle im Lipidmetabolismus und in der Entstehung von Übergewicht-assoziierten Erkrankungen ¹⁶⁻¹⁸. Als Schrittmacherenzym der Hydrolyse von zirkulierenden TAGs wird es von Parenchymzellen gebildet und an die innere Oberfläche von Endothelzellen weitergeleitet, wo es dann gebunden wird. Man unterscheidet eine hepatische und eine periphere LPL. Die hepatische LPL ist vorwiegend im Säuglingsalter nachweisbar. Die periphere LPL befindet sich hauptsächlich im Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel, und in Makrophagen. Ihre gewebsspezifische Aktivität ermöglicht die lokale Regulierung bei der Aufnahme von freien Fettsäuren, Lipiden und Lipoproteinen, was eine effektive Verteilung von Nährstoffen unter den verschiedenen Gewebearten erlaubt, aber bei Unregelmäßigkeiten auch schwerwiegende Konsequenzen haben kann ¹⁹. Es wird vermutet, dass diese

Einleitung

Unregelmäßigkeiten der LPL-Aktivität Ursache für metabolische Störungen wie Adipositas, Artherosklerose und Insulinresistenz sind ²⁰⁻²².

Hohe LPL-Spiegel im Muskelgewebe sind einerseits mit niedrigen Plasmatriglyceridspiegeln, hohen HDL-Spiegeln, und damit niedrigem Artheroskleroserisiko assoziiert ²³⁻²⁵. Andererseits sind hohe LPL-Spiegel in Makrophagen mit erhöhtem Artheroskleroserisiko vergesellschaftet, da Makrophagen dann vermehrt Cholesterin einlagern und sich in Schaumzellen umwandeln, welche sich an die Arterienwände anlagern und damit Artherosklerose auslösen können ^{14,19}.

Greenwood et al. zeigten, dass das Verhältnis der LPL-Aktivität im Fettgewebe zur LPL-Aktivität im Muskelgewebe ebenfalls eine Rolle spielt ²⁶. Ist die Aktivität im Fettgewebe höher als im Muskelgewebe, so werden freie Fettsäuren vermehrt zum Fettgewebe geleitet, was zu massiver Fettaufnahme und Adipositas führt. Wenn das Verhältnis umgekehrt ist, werden die Fettsäuren zum Muskelgewebe gelenkt, was einer Fettspeicherung vorbeugt (*substrate steal hypothesis*) ²⁶. 30 % der zirkulierenden Triglyceride werden vom LPL des Herz- und Muskelgewebes verbraucht, deshalb spielt körperliches Training eine große Rolle, da es direkten Einfluss auf die Muskel-LPL hat ^{27,28}.

Auch das Ernährungsverhalten beeinflusst die Aktivität der LPL: Fasten erniedrigt die LPL-Aktivität, während sie bei Wiederaufnahme von Nahrung gesteigert ist ²⁹. Vermutlich ist Insulin ein Induktor der LPL, und der Fettgewebs-LPL-Spiegel korreliert deshalb mit dem Insulinspiegel ¹⁹. Dieser Zusammenhang wird beim Diabetes mellitus Typ II besonders deutlich: da ein relativer Insulinmangel vorliegt wird die LPL-Aktivität gehemmt, was den VLDL-Abbau in der Peripherie herabsetzt. Der gleichzeitig erhöhte Blutglukosespiegel und die vermehrt vorhandenen freien Fettsäuren induzieren zusätzlich in der Leber eine VLDL-Überproduktion. Diese, nun übermäßig vorhandenen, VLDL-Partikel resultieren in einer Hypertriglyceridämie ^{15,30}.

Hypertriglyceridämie kann auch vererbt sein. Gehrlich et. al fanden heraus, dass 20 % der Patienten mit Hypertriglyceridämie eine Mutation des LPL-Gens tragen ³¹.

1.2.4. Hormonelle Steuerung von Lipogenese und Lipolyse

Der Lipidstoffwechsel ist im Hinblick auf die Energieversorgung des Organismus mit dem Kohlenhydratstoffwechsel gekoppelt. Deshalb beeinflussen die gleichen Hormone, die den Lipidstoffwechsel regulieren, auch den Kohlenhydratstoffwechsel ³².

Da Fettzellen metabolisch sehr aktiv sind, laufen Lipogenese und Lipolyse dort ständig nebeneinander ab. Sie werden durch lipolytisch und antilipolytisch wirksame Hormone wie Glukagon und Katecholamine bzw. Insulin reguliert.

Insulin wird von den β -Zellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildet und bei steigendem Blutglukosespiegel ins Blut freigesetzt. Es steigert den Glukosetransport aus dem Blut über den Glukosetransporter GLUT 4 in das Skelettmuskel- und Fettgewebe. Es aktiviert die Pyruvatdehydrogenase des Fettgewebes, um Acetyl-CoA für die Fettsäurebiosynthese bereitzustellen. Die LPL wird durch Insulin induziert, um Fettsäuren für die TAG-Synthese bereitzustellen. Gleichzeitig wird der Abbau von TAG gehemmt, indem Insulin die cAMP-Phosphodiesterase aktiviert. Auch die Glykogensynthese in der Leber wird stimuliert. Insulin ist demnach ein anabol wirksames Hormon ³²⁻³⁴.

Der Gegenspieler von Insulin ist das Glukagon. Es wird von den α -Zellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildet. Anreiz für die Ausschüttung von Glukagon ins Blut sind sowohl ein sinkender Blutzuckerspiegel als auch ein Anstieg der Aminosäurekonzentration im Blut. Die Ausschüttung führt zu einer Hemmung der Glykogenbiosynthese, einer Steigerung des Glykogenabbaus, und es fördert die Glukoneogenese ³⁴.

Ebenfalls blutzuckerspiegelsteigernd wirken die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Sie werden im Nebennierenmark und in adrenergen Nervenendigungen synthetisiert und ihre Ausschüttung wird durch das adrenerge System gesteuert. Sie stellen die Energie vor allem schnell bereit, um in Stresssituationen angepasst reagieren zu können ³⁴.

Nach einer Mahlzeit ist der Insulinplasmaspiegel hoch, somit werden die Energiespeicher unseres Körpers aufgefüllt und lipolytische Aktivitäten gehemmt. Die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate werden insulinabhängig (GLUT 4) oder insulinunabhängig (GLUT 1-3) in die

Körperzellen transportiert. Dort werden sie entweder sofort verbraucht oder in Form von Glykogen in Leber und Muskel gespeichert. Sie können auch via Glykolyse und Lipogenese in der Leber oder im Adipozyt in endogene Lipide umgewandelt und im Fettgewebe gespeichert werden.

Wie in 1.2.2 beschrieben gelangen mit der Nahrung aufgenommene oder in der Leber synthetisierte Triglyceride zu den Zielzellen, indem sie in VLDL eingebaut und dann vom Blutplasma zu den Adipozyten transportiert werden. Befinden sich jedoch im Blut schon zu viele freie Fettsäuren oder Kohlenhydrate, werden diese Fette nicht exportiert, sondern sie kumulieren sich in der Leber. Dadurch entsteht die sogenannte „Fettleber“^{15,30,32}.

In Fastenzeiten, z. B. nachts, wird die Lipogenese durch die Adenosinmonophosphat-stimulierte Proteinkinase (AMPK) inhibiert, da die intrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration sinkt. Die AMPK-Aktivität ist auch während körperlicher Aktivität und β -adrenerger Stimulation oder bei Anwesenheit der Hormone Adiponectin und Leptin hoch. AMPK inhibiert die energieverbrauchenden Prozesse (Lipolyse, Lipogenese) und stimuliert die Prozesse, die der zellulären Energiegewinnung dienen (Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation)³³. Auch der Glukagonspiegel ist während des Fastens hoch.

1.2.5. Das Fettgewebe

Das Fettgewebe fungiert nicht nur als speicherndes Organ, sondern auch als endokrines Organ, welches in der Lage ist verschiedene Hormone auf endokrinem, parakrinem und autogenem Weg zu sezernieren. So produziert es proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Chemokine, und die Adipokine Leptin, Adiponektin und Resistin, die die Monozyten- und Makrophagenfunktion beeinflussen. Ein weiterer, noch nicht allzu bekannter Vertreter der Adipozytokine ist der *Fasting-induced adipose factor (Fiaf)*, synonym auch *Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4)* oder *hepatic/fibrinogen/angiopoietin-related protein (HFARP)* genannt, der in Abschnitt 1.5. ausführlich vorgestellt wird³⁵. Präadipozyten und Adipozyten

exprimieren auch zahlreiche Toll-like-Rezeptoren, die dem Immunsystem zur Erkennung von Krankheitserregern dienen³⁶.

Insgesamt übernimmt das Fettgewebe viel mehr Aufgaben als nur die Fettspeicherung. Diese sind zum Beispiel die Beeinflussung von Stoffwechsel, vaskulären und endothelialen Funktionen, Appetit und Sättigung, Entzündungen, Tumorwachstum, des Immunsystems und der Fertilität³⁷. Die verschiedenen Aufgaben sind natürlich auch miteinander verbunden, so wurde beispielsweise eine Verbindung zwischen Entzündungen und Insulinresistenz gezeigt³⁷.

1.3. Darmflora

1.3.1. Physiologische Darmflora

Die Darmflora von Säugern ist ein komplexes und dynamisches Ökosystem, welches sich zusammen mit seinem Wirt entwickelt hat. Es hat metabolische Eigenschaften entwickelt, die den Wirtsstoffwechsel ergänzen und kann daher als eigenständiges, stoffwechselaktives Organ betrachtet werden, welches sich im Gastrointestinaltrakt von Säugern befindet³⁸.

Die mikrobielle Besiedlung des Darmes nimmt im Verlauf vom Dünndarm zum Dickdarm zu. Im Duodenalsaft finden sich ca. 10^4 Bakterien/ml, im Bereich des terminalen Ileums sind es bereits ca. 10^8 Bakterien/ml, und im Dickdarm sind es ca. 10^{11} Bakterien/ml³⁹. Darin sind 500 bis 1000 verschiedene Spezies beinhaltet, zumeist obligat anaerobe Bakterien. Man schätzt, dass das gemeinsame Genom dieser Bakterien (Mikrobiom) hundertmal mehr Gene beinhaltet als das menschliche Genom. Deshalb kann die Darmflora spezielle Aufgaben übernehmen, zu denen der menschliche Darm nicht fähig ist, wie zum Beispiel den Abbau unverdaulicher Nahrungsbestandteile (z. B. pflanzliche Polysaccharide). Auf diese Weise kann die Energiebilanz des Individuums durch die Mikroorganismen beeinflusst werden^{38,41,42}.

Im Laufe des Lebens findet im Darm eine Veränderung des Keimspektrums statt. Die Zusammensetzung der Darmflora hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab. Beispielsweise haben per Kaiserschnitt entbundene Säuglinge

Einleitung

eine andere Zusammensetzung der Mikroflora als vaginal entbundene, denn bei der vaginalen Geburt werden Mikroorganismen der mütterlichen Körperflora auf das Neugeborene übertragen^{43,44}. Gestillte Säuglinge weisen ein anderes Keimspektrum auf als nicht gestillte⁴⁴, da der Einfluss der Muttermilch die Besiedlung durch Lactobacillen und Bifidobakterien im Dickdarm begünstigt, die „säuglingstypische Bifidusflora“. Fakultativ aerobe Bakterien dienen den obligat anaeroben Bakterien dann als Milieubereiter, indem sie den Sauerstoff verbrauchen³⁹.

Im späteren Leben beeinflussen Ernährungsgewohnheiten und Nahrungszusammensetzung, Hygienestandards, Medikamente, Toxine, Hormone, Stress, Veränderungen der Darmwand (z. B. Divertikelbildung) und systemische Erkrankungen (z. B. Immundefekte oder Diabetes mellitus) das Keimspektrum der Darmflora.

Zur physiologischen Darmflora des erwachsenen Menschen gehören hauptsächlich *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia spp.*, und *Veillonella spp.*^{39,45}.

Die zwei dominantesten phylogenetischen Gruppen des menschlichen Dickdarmes sind *Bacteroidetes* und *Firmicutes*. Zu den *Bacteroidetes* zählen die Flavobakterien und die Shingobakterien. *Firmicutes* sind grampositive, anaerobe Sporenbildner, zu denen auch *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, Staphylokokken und Streptokokken gehören.

Für die Versuche in dieser Arbeit wurde mit *Bifidobacterium adolescentis* (*B. adolescentis*) gearbeitet. Bifidobakterien gehören zu den Actinobakterien, die einen Stamm der anaeroben Bakterien in der Darmflora präsentieren⁴⁶.

Die normale Darmflora übernimmt wichtige Funktionen, die den Darm und damit auch den Menschen unterstützen. Sie besitzt eine Barrierefunktion zur Abwehr gegen Fremdkeime, indem sie antimikrobielle Substanzen produziert und die Übertrittsfrequenz von Mikroorganismen aus dem Darmlumen ins Lymphsystem reduziert. Sie moduliert das Immunsystem, übernimmt Stoffwechselaktivitäten und Fermentationsleistungen, entgiftet von toxischen und karzinogenen Stoffen, bildet Vitamine und bereitet ein optimales Milieu^{39,47,48}.

Normalerweise befindet sich die natürliche Darmflora in einer ökologischen Homöostase mit dem Wirtsimmunsystem. Eine Veränderung innerhalb der Flora, z. B. durch Antibiotikaeinnahme, kann unter anderem zu bakterieller Fehlbesiedlung, antibiotikaassoziierter Diarrhöe und zur Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen führen^{49,50}. Weiter sind Darmbakterien sowohl für die Entwicklung des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems, insbesondere des Darmimmunsystems, essentiell⁵¹⁻⁵³. Nicht zuletzt stimulieren sie die Angiogenese und sind an der Fettspeicherung beteiligt^{38,41,52,54-58}.

1.3.2. Das Mikrobiom

Der Begriff „Mikrobiom“ setzt sich aus den Wörtern Mikroorganismus und Biom zusammen und wurde von dem 2008 verstorbenen US-Molekularbiologen Joshua Lederberg in Anlehnung an das Humangenomprojekt geprägt⁵⁹. Als Biom wird das Zusammenleben aller Pflanzen, Tiere, Pilze und Mikroorganismen einer Ökoregion bezeichnet. Aufgrund seiner Phonetik findet der Begriff Mikrobiom Verwendung analog zum Genom oder Proteom⁶⁰. Der menschliche Körper besteht zu mehr als 90 Prozent aus Bakterienzellen. Die Gesamtheit der Mikroorganismen, die in und auf dem menschlichen Körper leben, und ihre Gene, nennt man das Mikrobiom⁶¹. Dazu gehören primär die Bakterien des Darms, aber auch von Haut, Urogenitaltrakt, Mund, Rachen und Nase. *Bacteroides* spp. sowie *Firmicutes* spp. sind dabei die am häufigsten vertretenen Bakterienspezies⁵⁹. Das Mikrobiom wird mittlerweile als ein eigenständiges Organ betrachtet, weil es in der Lage ist, Aufgaben im Körper zu erfüllen, zu denen der Körper aufgrund seiner beschränkten genetischen Vielfalt alleine nicht fähig ist, wie zum Beispiel die Zersetzung von Polysacchariden im Darm.

Im Jahr 2007 wurde an den National Institutes of Health das „Human Microbiome Project“ mit dem Ziel der Identifizierung und Charakterisierung des menschlichen Mikrobioms initiiert⁶⁰, und um herauszufinden, welche Faktoren die Ausbreitung und Entwicklung der einzelnen Mikroorganismen beeinflussen⁶². Das „Human Microbiome Project“ wird als Erweiterung des

„Human Genome Project“ betrachtet. Ziel des in den 90-er Jahren gegründeten „Human Genome Project“ war es, das Genom des Menschen vollständig zu entschlüsseln. Am Ende wurden ungefähr 20.000 humane, proteinkodierende Gene im Menschen identifiziert. Zusammen mit seinem Mikrobiom hat der Mensch ca. 8 Millionen proteinkodierende Gene ⁶².

Die Gründer des „Human Microbiome Project“ wollten Referenzdaten für zukünftige Forschungsprojekte über das menschliche Mikrobiom schaffen. Sie konnten beobachten, dass es Unterschiede der mikrobiellen Besiedlung des Körpers, abhängig von Geschlecht und Körperregion gibt. Weiter fanden sie heraus, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms von der Umwelt und von genetischen sowie physiologischen Faktoren des Wirts abhängig ist. Eine Änderung der Zusammensetzung des Mikrobioms zieht auch Veränderungen in der Entwicklung und Physiologie des Menschen nach sich. Studien über das Mikrobiom sind deshalb auch für die metagenomische Medizin wichtig, die von gezielter Therapie mit einzelnen bakteriellen Stämmen bis zur Übertragung der Darmflora reicht ^{63,64}. Ziel des „Human Microbiome Project“ ist es, durch die Entschlüsselung des Mikrobioms und der Faktoren, die seine Entwicklung und Verteilung beeinflussen, die menschliche Genetik und physiologische Vielfalt zu verstehen. Durch gezielte Manipulation des Mikrobioms kann man womöglich in Zukunft in die Physiologie und Pathophysiologie des Menschen eingreifen ⁶².

1.3.3. Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora von adipösen und schlanken Menschen

Gordon, Bäckhed et. al konnten im Jahr 2004 zeigen, dass sich die Dickdarmflora von adipösen und schlanken Menschen unterscheidet ³⁸. Adipöse Menschen wiesen demnach eine höhere Besiedlung durch *Firmicutes* und eine geringere Anzahl *Bacteroidetes* auf, im Gegensatz zur schlanken Kontrollgruppe. Unter fett- und kalorienreduzierter Diät veränderte sich das Spektrum der Mikroorganismen zugunsten der *Bacteroidetes*. Dies ließ sich darauf zurückführen, dass die Bakterien die Nahrungsverwertung in unterschiedlicher Weise beeinflussten ⁹.

In Experimenten mit Mäusen stellte die Arbeitsgruppe fest, dass keimfreie (KF) Mäuse schlanker waren als Mäuse mit konventioneller Flora (CV). Gab man den KF Mäusen Mikroorganismen aus dem Darm der konventionell aufgezogenen Mäuse (CV), so zeigte sich bei den nun konventionalisierten (CV-D) Mäusen innerhalb von 14 Tagen eine enorme Zunahme an Körperfett, obwohl die Nahrungsaufnahme gleich blieb, oder sogar geringer war. Dies erklärte man dadurch, dass die Bakterien in der Lage sind, durch Fermentation aus eigentlich unverdaulichen Nahrungsbestandteilen Energie zu gewinnen. Sie bauen unverdauliche pflanzliche Polysaccharide (Zellulose) in kurzkettige Fettsäuren um, die vom Darm aufgenommen werden⁹. Der Darm schöpft ca. 70 % seiner Energie aus diesen von Bakterien synthetisierten Fetten¹⁰.

In Zwillingstudien war Adipositas mit einer Veränderung der vorherrschenden Bakterienstämme im Darm und mit einer verminderten bakteriellen Vielfalt assoziiert⁶⁵. Verminderte bakterielle Vielfalt war in anderen Studien auch mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert⁶⁶. Turnbaugh et al. zeigten, dass das menschliche Darmmetagenom innerhalb einer Familie sehr ähnlich ist, sich jedoch von Individuum zu Individuum unterscheidet. Bei monozygotischen und dizygotischen Zwillingen ist das Ausmaß der Kovariation ähnlich⁶⁵.

1.3.4. Darmflora und Typ-2-Diabetes

Adipositas ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert, Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes zu entwickeln. Da die Prävalenz von Adipositas und Typ-2-Diabetes immer mehr ansteigt, wird angenommen, dass die Ursache hierfür nicht allein in den Ernährungsgewohnheiten, den Genen oder der sportlichen Aktivität zu suchen ist, sondern dass auch Umweltfaktoren an der Genese dieser Erkrankungen eine große Rolle spielen⁶⁷. Einer dieser Umweltfaktoren ist unsere Darmflora. Die Bedeutung der Darmflora für die Entwicklung verschiedener Krankheiten nimmt immer mehr zu. So haben Cani et al. und andere Forschergruppen herausgefunden, dass die Darmflora eine große Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes durch die Auslösung einer *Low-grade inflammation* (geringgradige chronische Entzündung) spielt⁶⁸⁻⁷⁰. Obgleich die *Low-grade inflammation* per Definition

nicht zum Metabolischen Syndrom gezählt wird, stellt sie eine Gemeinsamkeit von Adipositas und anderen metabolischen Erkrankungen dar. Der genaue Zusammenhang zwischen Darmflora und *Low-grade inflammation* ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch vermutet man, dass der Mechanismus durch Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora über eine vermehrte Darmpermeabilität zu einem erhöhten LPS-Spiegel (Lipopolysaccharid-Spiegel) im Blut und damit zur *Low-grade inflammation* führt⁷¹. Dabei spielen die Veränderung von Tight Junction-Proteinen, die Überaktivität von Endocannabinoidrezeptoren und die verminderte Aktivität der intestinalen Alkalischen Phosphatase (AP) eine Rolle. Die verminderte Aktivität der intestinalen AP führt zu einer geringeren LPS-Entsorgung⁷¹.

Auch die Zusammensetzung der Darmflora kann Adipositas und Typ-2-Diabetes beeinflussen. Man fand heraus, dass bei Übergewichtigen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern das Vorkommen an Bifidobakterien^{72,73} und *Faecalibacterium prausnitzii*⁷⁴ erhöht war. Dieselben Bakterien wurden paradoxerweise mit antiinflammatorischen Effekten assoziiert^{74,75}. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Darmflora während der Kindheit ein prognostizierender Faktor für Übergewicht sein kann. Bei Kindern, die später übergewichtig waren, wurde eine größere Menge *Staphylococcus aureus* und eine geringere Menge Bifidobakterien in der Darmflora gefunden⁷⁶. Die Übertragung der Darmflora gesunder Menschen auf Menschen mit Metabolischem Syndrom konnte die Insulinsensitivität bei Letzteren vorübergehend verbessern⁷⁷.

Auch die Behandlung von Patienten mit Adipositas und/oder Typ-2-Diabetes mit Präbiotika gewinnt immer mehr an Bedeutung. Präbiotika sind Oligosaccharide, also kurzkettige Kohlenhydrate, die in Pflanzen oder in der Muttermilch vorkommen. Dünndarmenzyme können Präbiotika nicht hydrolysieren, deshalb gelangen Präbiotika wie Inulin, Fructo-Oligosaccharide (FOS) und Galacto-Oligosaccharide (GOS) unverändert in den Dickdarm, wo sie als Substrate für die bakterielle Fermentation dienen und die Vermehrung von apathogenen Darmbakterien stimulieren⁷⁸.

Die Einnahme von Präbiotika bewirkte in Studien über Adipositas und Typ-2-Diabetes, dass die Darmpermeabilität, die Endotoxämie und die Entzündung verringert wurden, und das Körpergewicht sowie die Fettspeicherung abnahmen. Darüber hinaus wurde die Glukosetoleranz, die Insulinresistenz, der Fettstoffwechsel und die Leptinsensitivität verbessert^{77,79-82}. Cani et al. stellten fest, dass diese positiven Effekte auch mit Veränderungen des Plasmaspiegels von enteroendokrinen Peptiden, die in den Glucosehaushalt und in die Regulation des Appetits und des Körpergewichts eingreifen, assoziiert werden können. Präbiotisch veränderte Darmflora kann das Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), Peptid YY (PYY), das Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP, Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid) und das Ghrelin beeinflussen^{77,81-85}.

Bäckhed et al. stellten in einer Studie fest, dass das Metagenom von Europäerinnen mit Typ-2-Diabetes anders zusammengesetzt war und anders funktionierte als das Metagenom von Europäerinnen ohne Typ-2-Diabetes. Darauf basierend entwickelten sie ein mathematisches Modell, mit dem man Typ-2-Diabetes mit großer Wahrscheinlichkeit nachweisen kann. Bei Frauen mit verminderter Glukosetoleranz konnte mit diesem Test ein diabetischer Stoffwechsel nachgewiesen werden⁸⁶. Bäckhed et al. konnten in derselben Studie auch zeigen, dass diese metagenomischen Marker sich zwischen Europäern und Chinesen unterscheiden, also regionale Unterschiede aufweisen⁸⁷. Daraus schlussfolgerten sie, dass zukünftige metagenomische Tests für Typ-2-Diabetes das Alter und die geographische Lokalisation berücksichtigen sollten⁸⁶.

1.4. Definition Probiotika

Es gibt eine Vielzahl an Definitionen für Probiotika. In der von der Food and Agriculture Organization (FAO) und der World Health Organization (WHO) im Jahr 2001 publizierte Definition wurden Probiotika als „lebende Mikroorganismen, die dem Wirt einen gesundheitlichen Vorteil bringen, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden“ beschrieben³⁹.

Einleitung

Um die Kriterien der gängigen Definitionen des Begriffes „probiotisch“ zu erfüllen, sollen Mikroorganismen folgende Voraussetzungen erfüllen:

Sie sollen

- in ausreichender Anzahl verabreicht werden,
- am Darmepithel haften,
- die Fähigkeit zur Kolonisation im Gastrointestinaltrakt besitzen,
- antimikrobielle Substanzen produzieren,
- die Immunantwort modulieren,
- den menschlichen Metabolismus beeinflussen (z. B. Cholesterinhaushalt, Vitaminproduktion),
- Kulturen lebender Mikroorganismen sein,
- menschlichen Ursprungs sein,
- widerstandsfähig gegen technische Prozesse und gegen Verdauungssäfte sein,
- und sie sollen die physiologische Mikroflora in einer Weise beeinflussen, die sich positiv auf die Gesundheit des Wirtes auswirkt ⁸⁸.

Im Lebensmittelbereich werden überwiegend Lactobazillen und Bifidobacterien eingesetzt, im Arzneimittelbereich auch apathogene Kolibakterien, Enterokokken und Hefen.

1.5. *Fasting-induced adipose factor (Fiaf)*

Fiaf ist ein Glykoprotein, das zur *fibrinogen/angiopoietin-like protein* -Familie gehört. Synonym wird *Fiaf* auch *angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4)* genannt. In Mäusen wird es vorwiegend in Weißem und Braunem Fettgewebe exprimiert, und etwas seltener in Herzmuskel, Leber, Plazenta, Keratinozyten und Darm ^{35,89}. Beim Menschen findet es sich vor allem in der Leber, im Fettgewebe, im Darm, Gehirn und im Schilddrüsengewebe ⁹⁰.

Fiaf wird bei Nahrungskarenz, Sauerstoffmangel und Adipozytendifferenzierung heraufreguliert ^{91,92}. Darüber hinaus ist *Fiaf* in die Regulation der Glukosetoleranz ⁹³, Angiogenese ⁹⁴, des Lungen- und Gelenkstoffwechsels ⁹²,

Einleitung

⁹⁵, der Krebsentstehung ⁹⁶⁻⁹⁸, des Fettstoffwechsels ⁹⁹⁻¹⁰¹, der Wundheilung ¹⁰², Diabetes ¹⁰³ und der Nahrungsaufnahme ⁹³ involviert. Je nach Produktionsort kann *Fiaf* eine Vielzahl an physiologischen Effekten beeinflussen, wie Abbildung 2 zeigt.

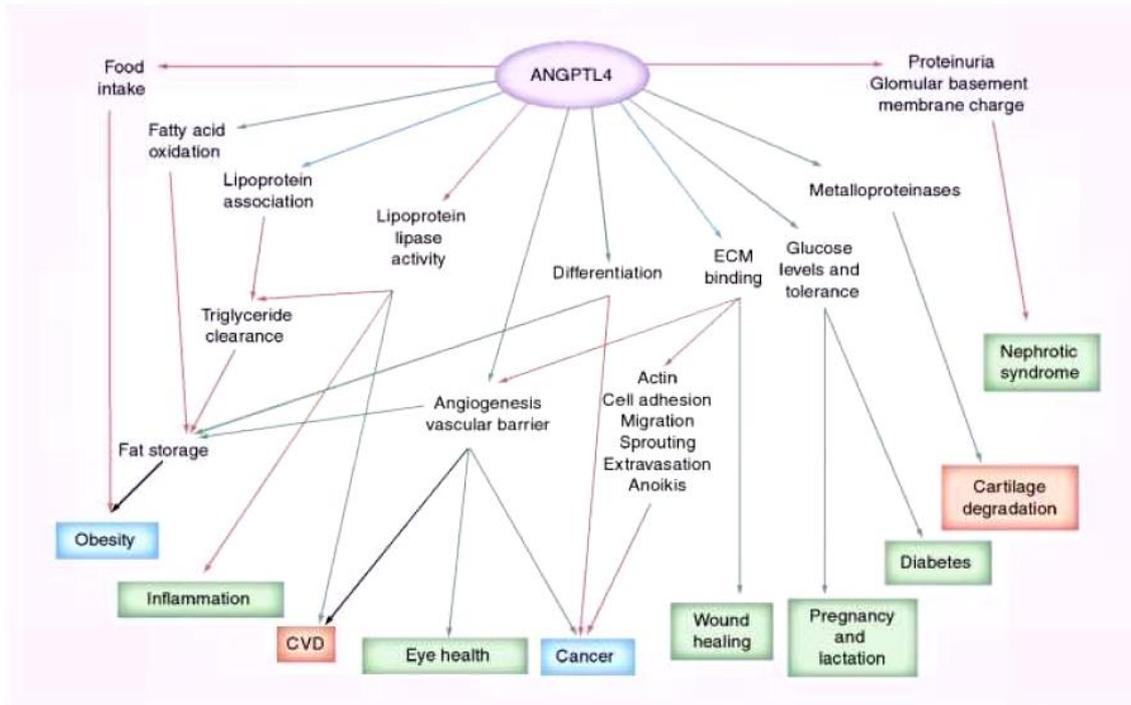


Abb. 2: Wichtigste Effekte von ANGPTL4/*Fiaf* auf den Körper. Grüne, rote und schwarze Pfeile zeigen eine Erhöhung bzw. Erniedrigung bzw. beides (Erhöhung und Erniedrigung) an. Blaue Pfeile zeigen an, dass ANGPTL4/*Fiaf* natürlicherweise mit diesen Lipoprotein-/Matrixbindungen assoziiert ist. Bezogen auf Erkrankungen oder Organesundheit zeigen grüne Pfeile einen positiven Effekt und rote Pfeile einen negativen Effekt an. CVD: Cardiovascular diseases, Kardiovaskuläre Erkrankungen; ECM: Extracellular Matrix, extrazelluläre Matrix. ¹⁰⁴

Zuerst wurde *Fiaf* als ein Zielgen der nukleären Rezeptoren *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* und *gamma* (PPAR α und PPAR γ), welche den Lipidmetabolismus in der Leber und dem Weißen Fettgewebe lenken, identifiziert ³⁵. Dann zeigte sich, dass *Fiaf* den TAG-Spiegel im Blut erhöht, was aus einer Hemmung der LPL durch *Fiaf* folgt (Abbildung 3) ¹⁰⁵.

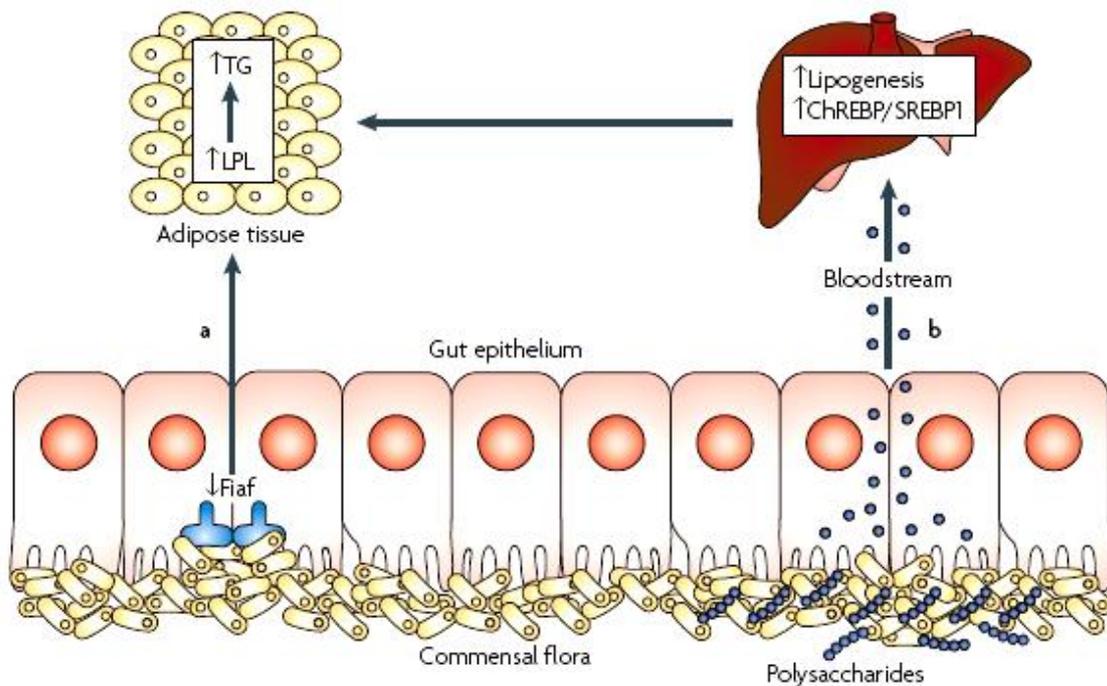


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zusammenwirkung von Mikroorganismen und *Fiaf* auf den Fettstoffwechsel. Einerseits unterdrücken die Mikroorganismen des Darms *Fiaf*, was zur Steigerung der LPL-Aktivität führt (a). Andererseits fermentieren sie die für den menschlichen Darm unverdaulichen Polysaccharide zu Monosacchariden. Diese werden absorbiert und induzieren in der Leber die *de-novo*-Lipogenese (b). ChREBP=carbohydrate response element binding protein, SREBP1=sterol regulatory element binding protein, TG=Triglyceride (aus ¹⁰⁵).

Eine besondere Eigenschaft des intestinalen *Fiaf*-Rezeptors ist seine Beeinflussung durch die Darmflora ^{38,106}. Die *Fiaf*-Expression ist bei Mäusen mit normaler Darmflora deutlich reduziert, verglichen mit KF-Mäusen. Konventionalisierung der KF-Mäuse führt ebenfalls zu einer Reduzierung des *Fiaf*-Rezeptors. Somit kann die erhöhte Anzahl intestinaler *Fiaf*-Rezeptoren KF-Mäuse vor diätinduzierter Adipositas schützen (abhängig von der Art der HF-Diät). Dies geschieht durch die Induktion des peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PPARGC1A), indem Gene des Stoffwechsels reguliert werden ^{68,106}. Die gastrointestinalen Mikroorganismen können die *Fiaf*-Expression direkt oder indirekt über die Darmepithelzellen beeinflussen. Man hat einige mikrobielle Stoffwechselprodukte wie kurzkettige Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) identifizieren können, die in der Lage sind, Signalwege in intestinalen Zellen zu beeinflussen ^{107,108}.

Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass *Fiaf* die Angiogenese beeinflussen kann: in hypoxischen Geweben wird die Expression von *Fiaf* erhöht, was vermutlich über den *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) geschieht^{94,109}. Auch in bestimmten Tumoren, genauer im hypoxischen Bereich um die nekrotischen Zellen herum, wird *Fiaf* exprimiert³⁵. Die Angiogenese-beeinflussende Rolle von *Fiaf* ist allerdings nicht ganz klar, da es auch Studien gibt, die eine anti-angiogene Funktion von *Fiaf* beschreiben¹¹⁰.

1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit

Bäckhed, Gordon et. al zeigten, dass ursprünglich keimfrei gehaltene Mäuse, die mit der Darmflora konventionell aufgezogener Mäuse kolonisiert wurden, signifikant an Gewicht zunahmten. Man fand heraus, dass dies mit einer verstärkten Unterdrückung des *Fiaf*-Rezeptors in der Darmwand der Mäuse zusammenhing³⁸.

B. adolescentis ist ein prominenter Vertreter der normalen Bifidusflora im Darm. In Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigte sich, dass Mäuse, denen das Probiotikum *B. adolescentis* mit dem Trinkwasser verabreicht wurde, mehr Gewicht zunahmten als die anderen Mäuse, denen die Probiotika *B. vulgatus* mpk, *E. coli* mpk, *E. coli* NISSLE verabreicht wurden, oder die Kontrollgruppe (keine Supplementierung).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Probiotikum *B. adolescentis* auf den Fettstoffwechsel *in vivo* bei BL/6-Mäusen zu überprüfen und ob *B. adolescentis* *in vitro* einen messbaren Einfluss auf die Proliferation der Präadipozyten 3T3-L1 hat.

Um dies herauszufinden bekamen die Mäuse über einen definierten Zeitraum *B. adolescentis* mit dem Trinkwasser verabreicht. Regelmäßig wurde gemessen, ob die Tiere im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe ein höheres Körpergewicht aufwiesen. Nach Tötung der Tiere wurde untersucht, ob die Gewichtszunahme auch mit einer Leberverfettung einherging. Zusätzlich wurde geprüft, ob die Anzahl der *Fiaf*-Rezeptoren in der Darmwand der Mäuse zugenommen hat, und das Blut wurde auf fettstoffwechselspezifische Werte hin untersucht.

Einleitung

Die Präadipozyten 3T3-L1 wurden über einen definierten Zeitraum mit Überständen inkubiert, die von Mode K-Zellkulturen stammten, welche zuvor mit *B. adolescentis* behandelt wurden. Die Überstände waren je nach Versuchsansatz unterschiedlich konzentriert. Nach einem definierten Zeitraum wurden die ausdifferenzierten Zellen gezählt, um Rückschlüsse auf die Proliferation zu ziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

Für die *in vivo*-Versuche wurden C57 BL/6-Mäuse von Harlan Winkelmann (Erstzüchter: Little 1921) verwendet. Sie waren unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in separat ventilierten Käfigen (isolated ventilated cages; IVC) in der Tierhaltung der Universität Tübingen untergebracht. Sie erhielten Standardfutter.

Die Versuche erfolgten nach dem Tierschutzgesetz und unterlagen lediglich der Anzeigepflicht.

Für die Vorversuche mit *Bacteroides vulgatus* mpk, *Escherichia coli* mpk, *Escherichia coli* NISSLE und *B. adolescentis* wurden fünfmal vier Mäuse verwendet.

Für den Hauptversuch mit *B. adolescentis* wurden zweimal fünf weibliche Mäuse verwendet, die zu Beginn der Versuche sechs Wochen alt waren.

2.1.2. Zellen

2.1.2.1. 3T3-L1-Zellen

Die Zelllinie 3T3-L1 (American Type Culture Collection, Katalognummer CL-173) ist eine murine Fibroblastenzelllinie, die ursprünglich aus Mäuseembryonen gewonnen wurde. Die Verdopplungszeit beträgt 14 Stunden. L1 ist eine fortlaufende Unterrasse der 3T3 (Swiss albino), die durch klonale Isolierung entwickelt wurde. Bei dieser murinen Fibroblastenzelllinie kommt es zu einer schnellen Zellteilung bis zur Konfluenz, bei welcher der Zellkontakt eine weitere Zellteilung verhindert. Die Zellen durchlaufen nach der Konfluenz eine Umwandlung von Präadipozyten zu einem adipozytenvergleichbaren Stadium. Diese Ausdifferenzierung kann durch Zugabe von Insulin, Dexamethason (DEXA) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) wesentlich beschleunigt und gesteigert werden. Für die Darstellung der Fettvakuolen hat sich die fettspezifische Einfärbung mit Oil Red O bewährt, da Oil Red O

spezifisch Triglyceride und Cholesterinester färbt, jedoch keine anderen Fette ¹¹¹.

Es ist für die Ausdifferenzierung der 3T3-L1-Zellen nötig, verschiedene fötale oder neonatale Kälberseren zu testen, da der Differenzierungserfolg bei Verwendung unterschiedlicher Chargen quantitativ sehr variieren kann. Nach gründlicher Austestung verschiedener Seren von unterschiedlichen Firmen hat das in unserem Hause vorhandene fötale Kälberserum (Sigma-Aldrich, F7524, Lot 085K3397) die gewünschten Erfolge gezeigt.

2.1.2.2. Mode K-Zellen

Mode K-Zellen sind immortalisierte Darmepithelzellen, die aus dem Dünndarm von Mäusen gewonnen wurden. Dass diese Zellen die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Dünndarmzellen aufweisen, konnte in einer Studie von Vidal et al. im Jahr 1993 zum ersten Mal gezeigt werden ¹¹².

In dieser Arbeit wurden Mode K-Zellen verwendet, um Überstände für die Experimente mit 3T3-L1-Zellen zu gewinnen (siehe Abbildung 5).

2.1.3. Bakterien

2.1.3.1. *Bifidobacterium adolescentis*

Bifidobacterium adolescentis (DSMZ 20086) ist ein Bakterium, das zu den probiotischen Bakterien gezählt wird und zur Familie der Bifidobacteriaceae gehört (Actinobakterien). Es ist ein grampositives, Milchsäure produzierendes Stäbchenbakterium, welches ursprünglich aus dem adulten, humanen Intestinum isoliert wurde ¹¹³.

2.1.3.2. *Bacteroides vulgatus* mpk, *Escherichia coli* mpk und *Escherichia coli* NISSLE

Bacteroides sind gramnegative, anaerobe, stäbchenförmige Bakterien, die zur Klasse der *Bacteroidetes* gehören. Sie sind an zahlreichen Stoffwechselaktivitäten im Darm beteiligt und produzieren unter anderem

kurzkettige Fettsäuren. Es wird auch ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten und einem Anstieg von Vertretern der Klasse *Bacteroidetes* diskutiert ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Vertreter der Gattung *Escherichia* sind gramnegative Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und Teil der normalen Darmflora. Sie sind fakultativ anaerob und gewinnen Energie sowohl aerob durch Atmung als auch anaerob durch gemischte Säuregärung. *Escherichia coli* (*E. coli*) ist fakultativ pathogen und kann unter anderem Harnwegsinfekte, Peritonitis und andere Infektionen hervorrufen ¹¹⁴.

E. coli NISSLE ist ein weiterer Vertreter der Gattung *Escherichia*. Es handelt sich hierbei um einen apathogenen Kommensalen mit dem Serotyp O6:K5:H1, der während des Ersten Weltkriegs vom Militärarzt Alfred Nissle aus dem Stuhl eines Soldaten isoliert wurde, welcher im Gegensatz zu seinen Kameraden keine Enterocolitis entwickelte. *E. coli* NISSLE 1917 ist unter dem Namen Mutaflor® zur Rezidivprophylaxe der Colitis ulcerosa oder zur Behandlung der Diarrhö bei Säuglingen, Kleinkindern und Kindern zugelassen ¹¹⁵⁻¹²¹.

Die kommensalen Bakterienstämme *E. coli* mpk und *Bacteroides vulgatus* (*B. vulgatus*) mpk wurden ursprünglich aus dem Fäces einer spezifisch pathogenfreien (SPF) II-2 -/- Maus isoliert ¹²².

Die verwendeten Bakterienstämme werden in Tabelle I aufgelistet, ebenso ihre Herkunft.

Tabelle I: verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft.

Bakterienstämme	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> mpk (<i>E. coli</i> mpk)	(152)
<i>Bacteroides vulgatus</i> mpk (<i>B. vulgatus</i> mpk)	(152)
<i>Escherichia coli</i> NISSLE 1917 (EcN)	Ardeypharm, Herdecke; Deutsche Stammsammlung (DSM) 6601
<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i>	DSMZ 20086

2.1.4. Mikroskop und Software

- HAL 100, Zeiss (Mikroskop Zellkulturfotografien)
- Palm[®] Robo V3,0 (Software Zellkulturfotografien)
- GeneAmp[®]5700 (qRT-PCR, TaqMan)
- GraphPad Prism 5 (Software für Statistik und Grafiken)

2.1.5. Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1. Zellkulturen

Kultivierungsmedium K1:

DMEM (= Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l D-Glukose, Gibco mit den Supplementen:

- 10 % Fötale Kälberserum, Sigma-Aldrich (30 min bei 56°C inaktiviert)
- Glutamin 1:100, Gibco
- Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 1:100, Gibco

Differenzierungsmedium D1:

DMEM (= Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l D-Glukose, Gibco

Material und Methoden

mit den Supplementen:

- 10 % Fötale Kälberserum, Sigma-Aldrich (30 min bei 56°C inaktiviert)
- Glutamin 1:100, Gibco
- Pen/Strep 1:100, Gibco
- 400 nM Insulin, Sigma I0516
- 1 mM IBMX, Sigma I7018
- 1 µM DEXA, Sigma D4902

Differenzierungsmedium D2:

DMEM (= Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l D-Glukose

mit den Supplementen:

- 10 % Fötale Kälberserum, Sigma-Aldrich (30 min bei 56°C inaktiviert)
- Glutamin 1:100, Gibco
- Pen/Strep 1:100, Gibco
- 100 nM Insulin, Sigma I0516

Einfriermedium:

- 90 % Fötale Kälberserum, Sigma-Aldrich (30 min bei 56°C inaktiviert)
- 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth

Sonstiges:

- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Trypsin, Gibco
- Phosphat-buffered saline (PBS), Gibco
- Trypanblau 0,4 %, Gibco, wird für die Zellzählung/den Vitaltest 1:5 mit Aqua destillata (Aqua dest.) verdünnt

2.1.5.2. Bakterien

- Medium 58 (DSMZ)
- *Luria-Bertani* (LB)-Medium (Becton Dickinson, Heidelberg)
- *Brain-heart* (BH)-Medium mit Leberstückchen (Merck, Darmstadt)
- autoklaviertes Trinkwasser
- Einfriermedium: LB-Medium + 20 % Glycerin

Sonstiges:

- Anaerobierbeutel (Anaerob®, Oxoid)

2.1.5.3. Oil Red O-Färbung

- Oil Red O, Sigma O0625
- 99 % Isopropylalkohol (2-Propanol)
- 60 % Isopropylalkohol (2-Propanol), mit vollentsalztem (VE-) Wasser verdünnt
- PBS, Gibco
- 10 % Formaldehydlösung, aus 37 %-iger Formaldehydlösung mit PBS verdünnt
- Aqua dest.
- Mowiol®, Merck Biosciences

2.1.5.4. RNA-Isolation / qRT-PCR / TaqMan

RNA-Isolation

- RNAeasy Kit, Qiagen
- 1 % β -Mercaptoethanol, Sigma
- 70 % Ethanol
- RNeasy MinElute Spin Column, Qiagen

cDNA-Synthese

- Wipeout Puffer, Qiagen
- Quantiscript Kit, Qiagen
- RNaseout, Invitrogen

TaqMan

- Thermo Fast 96 PCR-Plates, PeqLab
- Optical Adhesive Cover Starter Kit
- RoxReferenceDye, Invitrogen

Material und Methoden

- Platinum qPCR Super Mix UDG, Invitrogen
- Primer (Assay-on-demand), Applied Biosystems, siehe Tabelle II
- Millipore-H₂O, autoklaviert

Tabelle II: verwendete Primer für die qRT-PCR

Gen	Assaynummer
Angptl 4	Mm 00480428_g1
Gapdh	Mm 99999915_g1

2.2. Methoden

2.2.1. Mäuse

2.2.1.1. Versuchsablauf

Zu Beginn des Experiments wurden die Mäuse erstmalig gewogen. Danach wurden die Tiere der Versuchsgruppe drei Tage lang mit 1 g Streptomycin/200 ml autoklaviertem Trinkwasser behandelt, um die spätere Besiedlung des Darms mit dem Probiotikum zu erleichtern. An Tag 4 wurde das Trinkwasser mit *B.adolescentis* anstelle von Streptomycin supplementiert. Alle drei bis vier Tage wurden sowohl die Mäuse als auch ihr Futter gewogen, und sie bekamen frisches, mit den Bakterien supplementiertes, Trinkwasser.

Die Kontrollmäuse bekamen ausschließlich normales Trinkwasser. Der Versuch lief 98 Tage lang.

An Tag 97 wurden die Mäuse abends in einen frischen Käfig gesetzt, und das Futter wurde entnommen. Sie mussten dann 16 Stunden nüchtern sein.

An Tag 98 wurden sie ein letztes Mal gewogen und der Blutzucker mittels Blutzuckerstix (Accu-Check® Sensor) ermittelt. Nach der Blutzuckermessung wurden die Mäuse mittels CO₂-Inhalation getötet. Anschließend wurden Fotos vom Bauchfett gemacht, vor und nach der Präparation. Dann wurde es gewogen. Danach entnahm man Herzblut, Leber und Dünndarm für weitere Untersuchungen:

Material und Methoden

- Herzblut: Messung von Insulin, freien Fettsäuren, Triglyceriden und Cholesterin im Serum
- Leber: laboranalytische Ermittlung des Verfettungsgrades anhand der Parameter Triglyceride, Cholesterin und Gesamteiweiß (Gesamteiweiß als Vergleichswert) im Lebergewebe
- Dünndarm: Ermittlung der quantitativen Ausprägung von *Fiaf* durch qRT PCR

2.2.1.2. Vorversuch

Für den Vorversuch zu dieser Arbeit wurden insgesamt 20 Mäuse verwendet. Wie in 2.2.1.1. beschrieben, wurden auch diese Mäuse zu Beginn drei Tage lang mit 1 g Streptomycin/200 ml autoklaviertem Trinkwasser behandelt. Am vierten Tag bekamen jeweils vier Mäuse *B.adolescentis*, *B. vulgatus* mpk, *E. coli* mpk, bzw. *E. coli* NISSLE ins Trinkwasser. Die vier Mäuse der Kontrollgruppe bekamen nur autoklaviertes Trinkwasser. Alle Tiere wurden regelmäßig gewogen. Der Vorversuch wurde am 68. Tag beendet.

2.2.1.3. Serumanalyse

Direkt aus dem Herz der Tiere wurde 1,5 ml Blut entnommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde es bei Raumtemperatur und 14.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde dann bei – 80 °C gelagert.

Später wurden die Parameter Insulin, freie Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterin und Gesamteiweiß im Serum im Labor PD Dr. med. Andreas Peter der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen ermittelt.

2.2.1.4. Laboranalyse des Lebergewebes

Die Analyse des Lebergewebes bezüglich der Parameter Triglyceride, Cholesterin und Gesamteiweiß wurde im Labor PD Dr. med. Andreas Peter der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

2.2.1.5. Quantitative Messung von *Fiaf*-Rezeptoren

2.2.1.5.1. RNA Isolation

Die RNA-Isolation beruht auf der Bindung der RNA an eine Silikamembran, auf der die RNA in mehreren Waschschrritten gereinigt und anschließend eluiert wird. Die RNA aus Dünndarmmukosa wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits (Qiagen) isoliert.

Die Mucosa wurde aus dem präparierten und gesäuberten Dünndarm vorsichtig abgeschabt, in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) + 1 % β-Mercaptoethanol (Sigma) aufgenommen und sofort auf Eis gestellt, um sie später bei -80 °C zu lagern. Nach dem Auftauen wurde noch mal 350 µl RLT-Puffer + 1 % β-Mercaptoethanol dazugegeben.

Um die Zellen gut zu lysieren musste das Gewebe durch Kanülen der Größe 20 G, 24 G und 27 G gezogen werden. Nach Zugabe von 70 % Ethanol (Verhältnis RLT:Ethanol = 1:1) wurde die Probe resuspendiert, auf zwei Proben verteilt, und jeweils auf eine RNeasy MinElute Spin Column (Qiagen) gebracht. Die Säule wurde für 20 Sekunden bei 8000 g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule wurde diese für 20 Sekunden bei 8000 g gewaschen. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zweimal nacheinander jeweils mit 500 µl RPE-Puffer beladen und für 20 Sekunden bei 8000 g gewaschen. Anschließend konnte die Silikamembran für 1 Minute bei 14000 g getrocknet werden.

Die Elution der RNA mit 100 µl RNase-freiem Wasser erfolgte für 1 Minute bei 8000 g. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 8000 g abzentrifugiert¹²³.

2.2.1.5.2. RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch mit dem UV-Spektrometer. Hierzu wurden die RNA-Proben 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnt und die Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) und 280 nm (A₂₈₀) bestimmt. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA. Hochreine RNA besitzt einen Quotienten von 1,8 - 2,1¹²³.

2.2.1.5.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die einzel- oder doppelsträngige Kopie eines RNA-Moleküls bezeichnet man als komplementäre DNA (complementary DNA; cDNA). Für die Synthese der cDNA benötigt man eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase, die die RNA als Matrix für die Synthese eines DNA-Strangs verwendet. Zunächst entsteht hierbei ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Die reverse Transkriptase benötigt für die Strangsynthese kurze, doppelsträngige Nukleinsäurebereiche, die sich in Form von Hexanukleotiden an die RNA anlagern und an deren 3'-Ende die reverse Transkriptase binden kann. Da genomische DNA in der PCR genauso amplifiziert werden würde, muss diese vor der reversen Transkription durch Zugabe von DNase eliminiert werden.

Dies erfolgte mit 2 µl gDNA wipeout Puffer (Qiagen) + 12 µl RNA für 2 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde mit dem Quantiscript Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben durchgeführt (Tabelle III) und erfolgte für 30 Minuten bei 42 °C, dann wurde die Reaktion für 3 Minuten bei 95 °C gestoppt. Die nicht umgeschriebene, restliche RNA wurde mit 1 µl RNaseout (Invitrogen) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Die cDNA konnte für die qRT-PCR-Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert werden¹²³.

Tabelle III: PCR-Ansatz für die reverse Transkription

Reagenz	Volumen pro Ansatz
5x Quantiscript RT Puffer	4,0 µl
RT Primer Mix	1,0 µl
Template RNA + gDNA wipeout	14,0 µl
Quantiscript Reverse Transkriptase	1,0 µl
Endvolumen pro PCR Ansatz	20,0 µl

2.2.1.5.4. Quantifizierung spezifischer mRNA mittels quantitativer RT PCR

Die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) erlaubt die gleichzeitige Amplifizierung und Quantifizierung der zu untersuchenden Sequenz. Die Quantifizierung erfolgt hierbei mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während bzw. am Ende eines PCR-Zyklus. Die Analyse erfolgt mit spezifischen TaqMan®-Sonden, die am 3'-Ende einen Quencher (TAMRA; 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM; 6-Carboxy-Fluorescein) markiert sind. Während des PCR-Zyklus baut die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3' Exonukleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde ab, woraufhin die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr durch den Quencher unterdrückt wird und gemessen werden kann. Die relative Quantifizierung erfolgte durch ein konstitutiv exprimiertes Gen (hier: GAPDH; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Der Quotient Targetgen / Referenzgen diente der Normalisierung der Proben. Mit den Proben wurden 1:10 Verdünnungen für die Standardkurve hergestellt (1; 0,1; 0,01; 0,001). 5 µl Probe bzw. Standardverdünnungen wurden in eine Thermo Fast 96PCP Platte (PeqLab) pipettiert. Von jeder Probe wurden Duplikate gemessen. Zu den Proben und Standardverdünnungen wurden dann 15 µl Mastermix (Tabelle IV) mit den entsprechenden Primern pipettiert (Tabelle II), die Platte mit Folie (Applied Biosystems) verschlossen und bei 1000 g für 1 Minute zentrifugiert. Die Analyse erfolgte am GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) mit dem in Tabelle V aufgeführten Cyclerprogramm ¹²³.

Tabelle IV: qRT-PCR-Ansatz

Reagenz (Invitrogen)	Volumen pro Ansatz
Millipore-H ₂ O	3,6 µl
TaqMan Super Mix	10,0 µl
Rox Reference Dye	0,4 µl
Assay on demand (Primer; Applied Biosystems)	1,0 µl
cDNA	5,0 µl
Endvolumen pro PCR Ansatz	20,0 µl

Tabelle V: Thermocyclerprogramm für qRT PCR.

Thermocyclereinstellungen	
50 °C	120 sek
95 °C	600 sek
II: 95 °C	15 sek
60 °C	60 sek II: 48 Zyklen
4 °C	∞

2.2.2. Zellkulturen

2.2.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen beider Zellarten wurden in 175 cm²- Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen

Arbeitsbank durchgeführt^{124,125}.

2.2.2.2. Auftauen, Kultivieren und Kryokonservierung der 3T3-L1- und Mode K-Zellen

Nach dem zügigen Auftauen der Zellen beider Arten (Wasserbad, 37 °C) wurden diese in 10 ml Kultivierungsmedium K1 aufgenommen, gewaschen und bei 400 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurden die Zellen in 25 ml K1 aufgenommen und resuspendiert, um sie danach in eine frische Zellkultur-Flasche zu geben.

Zum Splitten wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, und danach mit 5 ml Trypsin/EDTA für ca. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Behandlung lösten sie sich vom Boden der Zellkultur-Flasche. Zum Neutralisieren der Zellen wurden sie in 2 Vol (entspricht 10 ml) Medium K1 aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden sie bei 400 g 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen, um sie in neue Zellkulturflaschen zu verteilen. 3T3-L1-Zellen wurden nach 2-3 Tagen eins zu vier gesplittet, Mode K-Zellen eins zu acht.

Nachdem beide Zellarten die dritte Generation erreicht hatten wurden sie für die Versuche verwendet.

Möchte man 3T3-L1-Zellen noch nicht verwenden, dürfen sie nur eine Konfluenz von 70-80 % erreichen. Dies ist normalerweise nach ca. 2 Tagen erreicht, wenn die Zellen zuvor eins zu vier gesplittet wurden.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Zellkulturboden abgelöst und danach zweimal mit Zellkulturmedium K1 gewaschen und zentrifugiert (400 g, 5 min, RT). Anschließend wurden sie in das Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml-Aliquots auf 2 ml-Kryoröhrchen verteilt und zum gleichmäßigen Einfrieren (-1 °C/min) einen Tag lang in eine vorgekühlte, mit Isopropanol gefüllte Kryobox bei -80 °C

inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung in einen Stickstofftank bei -160 °C überführt wurden.

2.2.2.3. 3T3-L1- und Mode K-Zellen aussäen

Die Zellen wurden, wie in 2.2.2.2. beschrieben, vom Zellkulturboden abgelöst, neutralisiert und zentrifugiert (400 g, 5 Minuten, RT). Dann wurden sie in 10 ml Kultivierungsmedium K1 aufgenommen und resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl verdünntem Trypanblau in einer 96-Well-Platte gemischt um eine 10-fache Verdünnung herzustellen. 10 µl dieser Verdünnung wurden wieder mit 90 µl verdünntem Trypanblau vermischt, für eine 100-fache Verdünnung. Die Zellen der beiden gefärbten Zellsuspensionen wurden anschließend mit einem Hämozytometer gezählt. Dies ist gleichzeitig ein Vitaltest, denn tote Zellen färben sich mit Trypanblau tiefblau an. Man kann also zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden und beide zählen.

Die Zellzahl wird mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$Z * F * 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen/ml}$$

Z = Mittelwert der gezählten Zellen aus vier großen Quadraten

F = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor

Die Formel für den Vitaltest lautet:

$$\% \text{ lebende (ungefärbte) Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{(\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})} * 100$$

Für die Zelldifferenzierungsversuche mit 3T3-L1-Zellen wurden 24-Well-Platten benutzt. In jedes Well wurden $4 * 10^5$ Zellen auf Coverslips ausgesät. In die Wells wurden jeweils 1 ml des Kultivierungsmediums K1 vorgelegt, und danach wurde die entsprechende Menge Zellsuspension hinzugefügt.

Mode K-Überstände wurden wie in 2.2.2.5. beschrieben hergestellt. Dazu wurden $5,5 * 10^6$ Zellen in einer großen Zellkultur-Flasche (175 cm²) ausgesät.

2.2.2.4. Differenzierung der 3T3-L1 Zellen

Bei einer Anfangszellzahl von $4 \cdot 10^5$ Zellen/Well erreichten die 3T3-L1-Zellen nach drei Tagen 100-prozentige Konfluenz. Nach zwei Tagen Postkonfluenz wurde mit der Differenzierung begonnen:

Anstelle von Kultivierungsmediums K1 bekamen die Zellen dann

→ ab Tag 2 Differenzierungsmedium D1 (mit 400 nm Insulin, 1 μ M DEXA und 1 mM IBMX)

→ ab Tag 4 Differenzierungsmedium D2 (mit 100 nM Insulin)

Die Reifung der Zellen erfolgte unter regelmäßigem Mediumwechsel (jeden zweiten Tag).

Je nach Untersuchungslauf wurde an Tag 8, 12, 16 oder 20 ausgewertet (Abbildung 4).

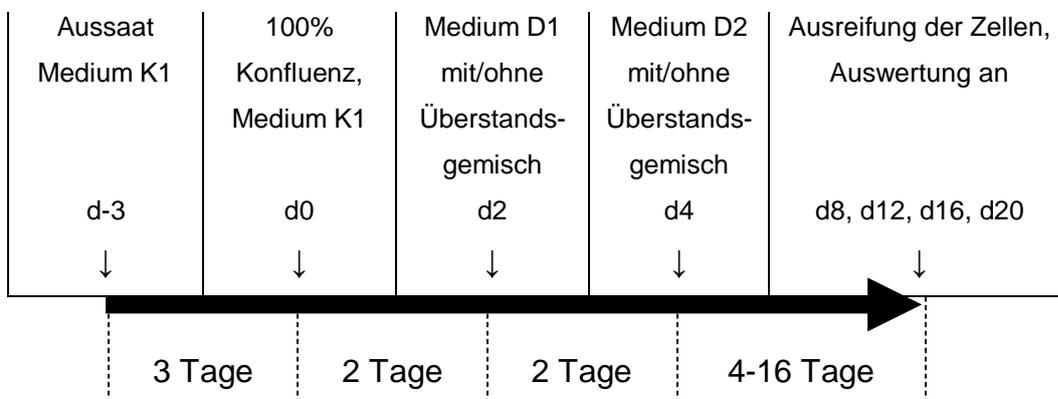


Abb. 4: Zeitachse des Versuchsablaufs. Bei Stimulierung der 3T3-L1-Zellen mit oder ohne Supplementierung durch Insulin, DEXA und IBMX, und in unterschiedlichen Konzentrationen der Überstände von Mode K-Zellen werden die Zellversuche an Tag 8, 12, 16 und 20 ausgewertet.

2.2.2.5. Herstellung der Mode K-Überstände

Mode K-Zellen wurden so ausgesät, dass sich $5,5 \cdot 10^6$ Zellen in einer großen Zellkultur-Flasche (175 cm^2) befanden. Sie wurden für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, damit die Zellen anwachsen konnten. Dann wurde das alte Medium abgesaugt, durch 30 ml neues K1-Medium ohne Antibiotika ersetzt, und *B. adolescentis* in den Konzentrationen MOI 10 bzw. MOI 50 hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, bei 4000 rpm

zentrifugiert, danach mit einem $< 22 \mu\text{m}$ -Filter sterilfiltriert, und das Antibiotikum wurde in der gewohnten Konzentration hinzugefügt. Danach wurden die Überstände in 50 ml-Spitzboden-Röhrchen (Falcon) aliquotiert, um sie bei $- 80 \text{ }^\circ\text{C}$ einzufrieren. Die eingefrorenen Überstände wurden innerhalb von einer bis eineinhalb Wochen für die Versuche verwendet.

2.2.2.6. Stimulierung der 3T3-L1-Zellen mit Mode K-Überständen

Die zuvor mit *B. adolescentis* inkubierten Überstände der Mode K-Zellen wurden den 3T3-L1-Zellen für die Stimulierung in den Konzentrationen 10 %, 50 % und 75 % als Mediumzusatz gegeben und werden im Folgenden als Überstandsgemisch bezeichnet (Abbildung 5).

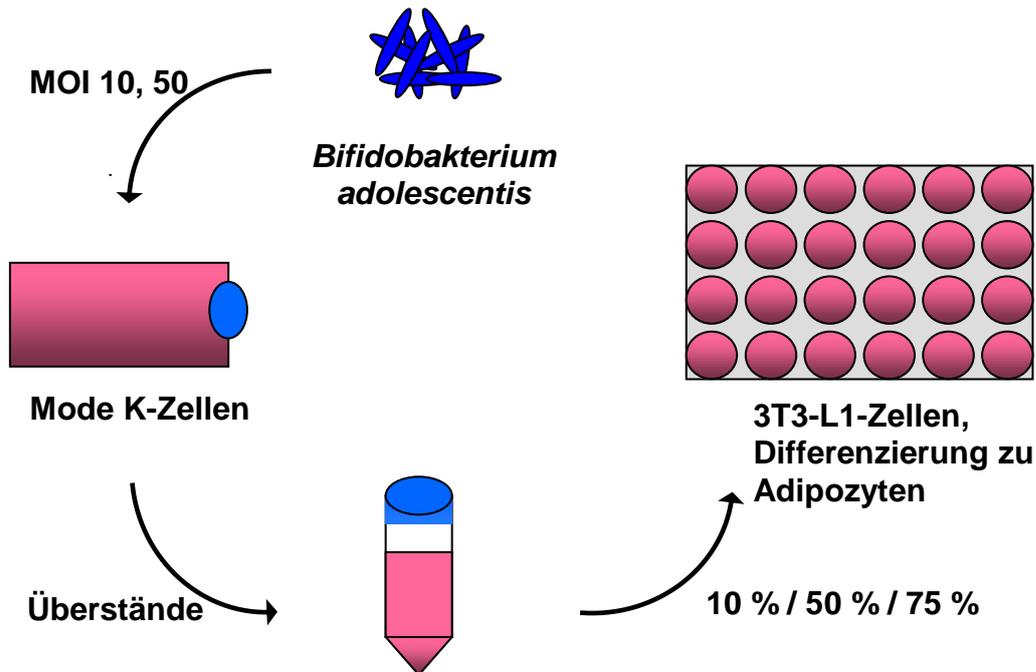


Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung von Mode K-Überständen und Stimulation von 3T3-L1-Zellen. Mode K-Zellen werden mit *B. adolescentis* inkubiert, die Überstände werden gesammelt und in definierten Konzentrationen zu den 3T3-L1-Zellen gegeben.

2.2.2.7. Versuchsablauf

Um die 3T3-L1-Zellen zu stimulieren gab es vier verschiedene Versuchsansätze:

- Versuchsreihe mit Supplementierung durch Insulin, DEXA und IBMX:
 - ab Aussaat mit Medium K1
 - ab Tag 2 mit Medium D1-/Überstandgemisch*,
 - ab Tag 4 mit Medium D2-/Überstandgemisch*
- Versuchsreihe ohne Supplementierung
 - ab Aussaat mit Medium K1
 - ab Tag 2 mit Medium K1-/Überstandgemisch*,
- Positivkontrolle, d.h. mit Supplementierung durch Insulin, DEXA und IBMX, jedoch ohne Überstände:
 - ab Aussaat mit Medium K1
 - ab Tag 2 mit Medium D1
 - ab Tag 4 mit Medium D2,

Material und Methoden

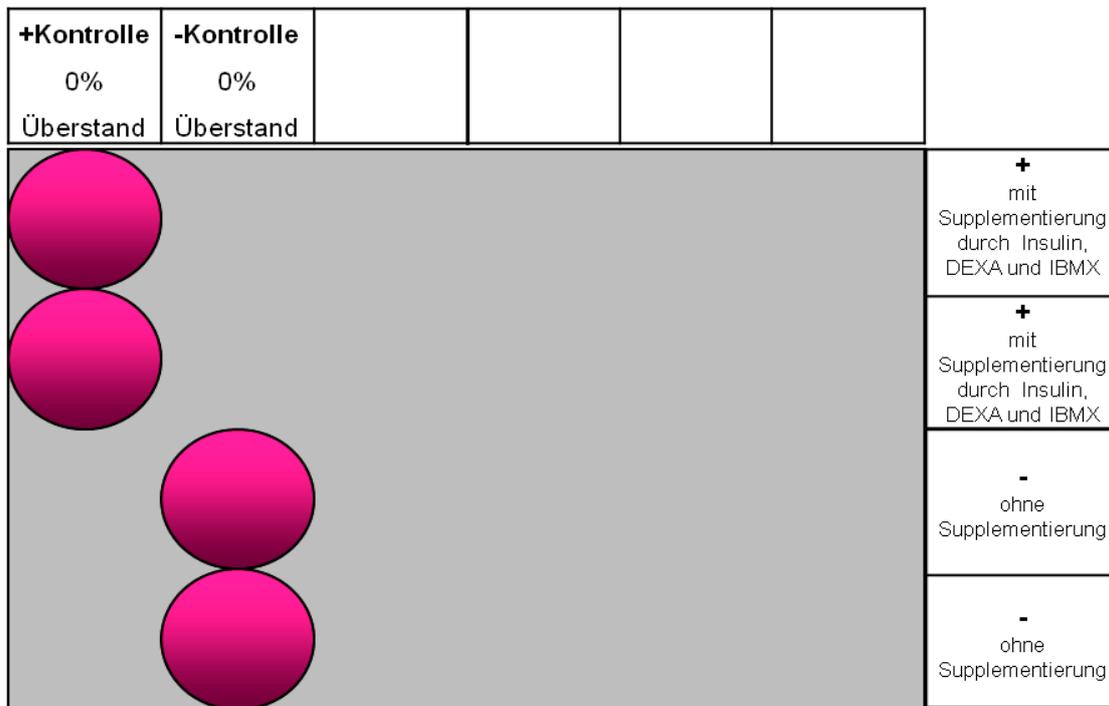
- Negativkontrolle, d.h. ohne Supplementierung und ohne Überstände;
 - ab Aussaat reines Kultivierungsmedium K1

* Medium-/Überstandgemisch von MOI 10 bzw. MOI 50 in den Konzentrationen 10%, 50% und 75%.

Die Auswertung durch Färbung mit Oil Red O, Fotografieren und Auszählen der Vakuolen erfolgte an Tag 8, 12, 16 und 20 (Abbildung 4). Die schematische Anordnung der verschiedenen Versuchsanordnungen in den Wells wird in Abbildung 6 (a) und (b) gezeigt.

MOI 10 10% Überstand	MOI 10 50% Überstand	MOI 10 75% Überstand	MOI 50 10% Überstand	MOI 50 50% Überstand	MOI 50 75% Überstand	
						+ mit Supplementierung durch Insulin, DEXA und IBMX
						+ mit Supplementierung durch Insulin, DEXA und IBMX
						- ohne Supplementierung
						- ohne Supplementierung

(a)



(b)

Abb. 6: Versuchsanordnung bei Stimulierung von 3T3-L1-Zellen durch Überstände von Mode K-Zellen, die zuvor mit *B. adolescentis* inkubiert wurden (in jedem Well $4 \cdot 10^5$ Zellen). (a) mit Überstandsgemisch, (b) Positiv-/Negativkontrolle. n=2

2.2.2.8. Oil Red O Färbung bei 3T3-L1 Zellen

Um die Proliferation der Adipozyten bewerten zu können, mussten die Zellen zunächst angefärbt werden. Die Färbung der intrazellulären Lipidvakuole mit Oil Red O zählt zu den Standardmethoden des Adipozytennachweises¹⁵⁵. Der Färbemechanismus basiert auf der besseren Löslichkeit des Farbstoffes in den Lipiden der Zelle im Vergleich zu dem verwendeten Lösungsmittel (2-Propanol). Der Farbstoff Oil Red O wird von Triglyceriden, Cholesterolester und Fettsäuren absorbiert und gelöst.

In diesen Versuchen wurde die Oil Red O-Färbung nach Shao und Lazar mit Modifikationen von Ramirez-Zacarias et al. sowie Lillie und Fullmer durchgeführt^{111,126,127}.

Vor dem Färbevorgang wurde eine Oil Red O-Stammlösung hergestellt, indem 0,5 g Oil Red O in 100 ml 99 % Isopropylalkohol (2-Propanol) aufgelöst wurden.

Material und Methoden

Die spätere Gebrauchslösung bestand aus sechs Teilen Stammlösung und vier Teilen Aqua dest.

Die frisch hergestellte Gebrauchslösung wurde unter Rühren 24 Stunden inkubiert und vor jedem Gebrauch mit Whatmann-Papier filtriert. Im Kühlschrank ist die Gebrauchslösung bis zu vier Tage lagerbar.

Die adhärennten Monolayerkulturen der 3T3-L1 Adipozyten wurden vor dem Färben dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml 60-prozentiger 2-Propanol für zwei Minuten auf die Wells gegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 10-prozentiger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 1 ml/Well frisch filtrierter Gebrauchslösung inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für jeweils 15 Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde 1 ml 60-prozentiges 2-Propanol für eine Minute auf die Wells gegeben, um den Zellrasen von möglichen Farbresten zu reinigen¹¹¹. Um die gefärbten Zellen vor Austrocknung zu schützen, und für das kurzfristige Mikroskopieren, wurde jeweils 1 ml PBS in die Wells gegeben. Die Adipozyten waren unter dem Mikroskop durch kräftig rot gefärbte intrazelluläre Lipidvakuolen zu erkennen (Abbildung 7).

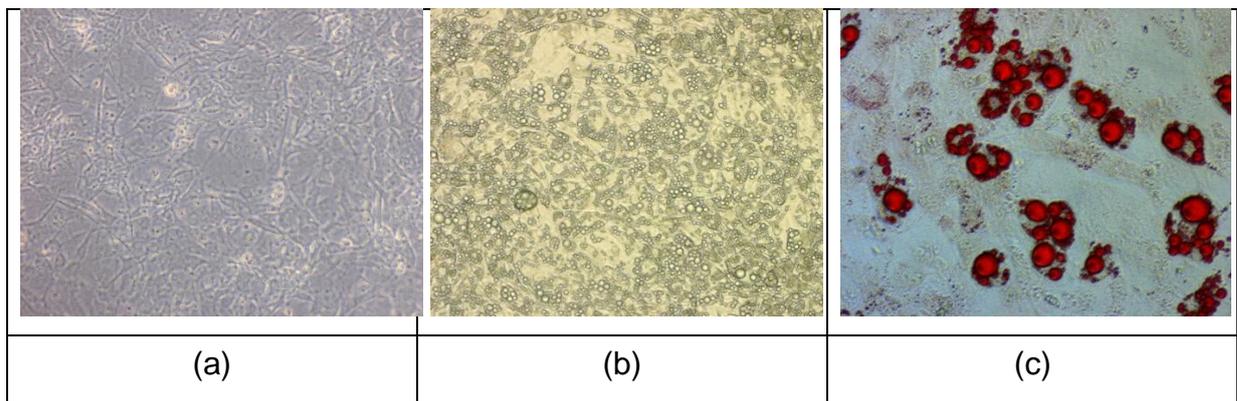


Abb. 7: 3T3-L1-Zellen unter dem Mikroskop. (a) undifferenziert, ungefärbt. 10-fache Vergrößerung (b) differenziert, ungefärbt. 20-fache Vergrößerung (c) differenziert, mit Oil Red O gefärbt. 40-fache Vergrößerung

Für die Eindeckelung wurden die Coverslips mit Pinzetten vorsichtig aus den Wells gehoben und mit Mowiol[®] auf Objektgläsern fixiert.

2.2.2.9. Auswertung des Differenzierungsgrades

Die eingedeckelten Zellen wurden unter dem Mikroskop fotografiert. Von jedem Präparat wurden jeweils zwei Fotos aus dem Randbereich und eines aus der Mitte in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Ausschnitte waren dabei rechteckig und $50000 \mu\text{m}^2$ groß.

Diese Bilder wurden später ausgedruckt und die rot gefärbten Vakuolen gezählt. Aus den drei Bereichen eines Präparates wurde der Mittelwert errechnet und für die Auswertung verwendet.

2.2.3. Bakterien

2.2.3.1. Bakterienkultur und Infektion der Zellkulturen und Mäuse

B. vulgatus mpk und *B. adolescentis* wurden unter anaeroben Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Nach dem zügigen Auftauen bei 37 °C im Wasserbad wurden sie in Brain-heart (BH)-Medium mit Leberstückchen angeimpft und zwei Tage anaerob bei 37 °C bebrütet. Dann konnte die Bifidobakteriensuspension in 50 ml Medium 58, und die Bacteroidessuspension in 50 ml Brain-heart Medium überimpft werden, und weitere ein bis zwei Tage anaerob bei 37 °C bebrütet werden.

E. coli mpk und *E. coli* NISSLE wurden in LB-Medium angeimpft und aerob bei 37 °C bis zur Wachstumsphase (Log-Phase) inkubiert.

Die Bakterien wurden anschließend bei 4000 g für fünf Minuten zentrifugiert und mit PBS gewaschen.

Für die Zellkulturexperimente mit *B. adolescentis* wurde dann die OD_{600} in PBS bestimmt, wobei eine OD_{600} 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 Zellkulturen gegeben werden.

Für die orale Gabe im Trinkwasser der Mäuse wurden die Bakterien nach der Bebrütung abzentrifugiert, um sie in 200 ml autoklaviertem Trinkwasser aufzunehmen.

2.2.3.2. Kryokonservierung von Bakterien

6 ml Übernachtskulturen der Bakterien wurden bei 4000 g für fünf Minuten abzentrifugiert, einmal mit 10 ml PBS gewaschen und das Pellet in LB-Medium + 20 % Glycerin resuspendiert. Die Aliquots wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student t Test oder dem ONEWay-ANOVA (Posttest Bonferroni). Die Differenz von Werten mit $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Mäuse

3.1.1. Vorversuch

3.1.1.1. Gewichtszunahme bei BL/6 Mäusen unter Gabe von *B. adolescentis* im Vergleich zur Gabe von *E. coli* mpk, *E. coli* NISSLE, *B. vulgatus* sowie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

In Vorversuchen zu dieser Arbeit untersuchte Frau Frauke Effinger ob Mäuse, die das Probiotikum *B. adolescentis* über das Trinkwasser verabreicht bekamen, mehr Gewicht zunahmten als Mäuse, die *E. coli* NISSLE, *Bacteroides vulgatus* oder *E.coli* mpk bekamen. Die vier Gruppen wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen, in der die Tiere lediglich autoklaviertes Trinkwasser erhielten. Über die Versuchszeit von 68 Tagen wurden die Tiere 20-mal gewogen.

Fragestellung 1: Ist die Gewichtszunahme bei Mäusen, denen *B. adolescentis* über das Trinkwasser verabreicht wurde, signifikant größer als bei den anderen Mäusen?

Abbildung 8 zeigt die Gewichtszunahme der Mäusegruppen von Tag 1 bis Tag 68 in Form von Regressionsgeraden.

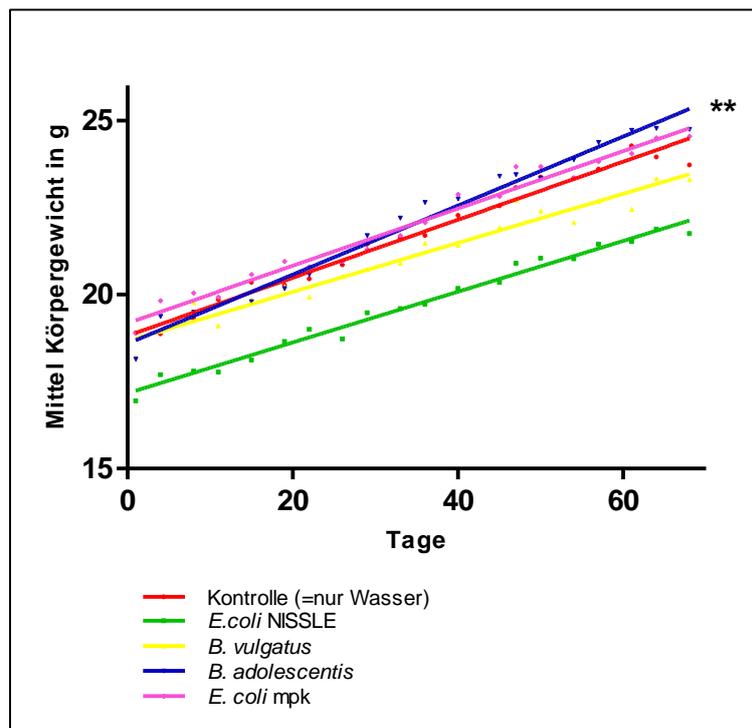


Abb. 8: Regressionsgeraden des mittleren Körpergewichts von Tag 1 bis Tag 68. Mittelwerte, jeweils n = 4. Mäuse mit *B. adolescentis* erreichten am Ende der Versuchsreihe (nach Tag 50) die höchsten Werte von allen Mäusen. Ihre

Ergebnisse

Regressionsgerade startet von einem relativ niedrigen Ausgangsniveau, dabei verläuft sie von allen Gruppen am steilsten, und ihre Steigung unterscheidet sich als einzige signifikant von anderen Gruppen. Die Regressionsgerade zweier anderer Versuchsserien (Kontrolle und *E. coli* mpk) liegen anfänglich höher als die Linie von *B. adolescentis*.

Das Gewicht von Mäusen mit *E. coli* NISSLE war an allen Tagen am niedrigsten.

******, $p < 0,001$ (*B. adolescentis* verglichen mit *E. coli* NISSLE und *B. vulgatus*).

Abbildung 9 gibt die Mittelwerte und ihre 95 %-Vertrauensbereiche für die durchschnittlichen Gewichte der Mäuse am letzten Tag der Versuchsreihe an. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ($n=4$ in allen 5 Gruppen) ergeben sich am letzten Tag keine signifikanten Gewichtsunterschiede ($p=0,3$).

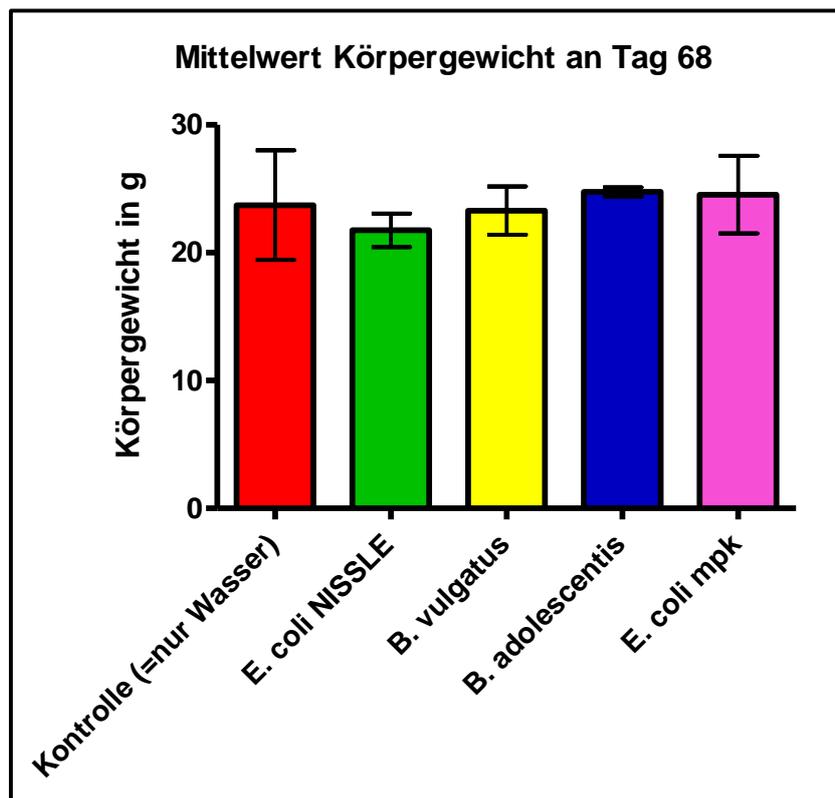


Abb. 9: Durchschnittliches Gewicht der Mäuse am letzten Tag der Versuchsreihe. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 4$. Mäuse mit *B. adolescentis* wiesen an Tag 68 die höchsten Gewichtswerte von allen auf. Es zeigten sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede.

3.1.2. Hauptversuch

3.1.2.1. Gewichtszunahme bei BL/6 Mäusen unter Gabe von *B. adolescentis* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

In dem 98 Tage laufenden Versuch wurden zwei Mäusegruppen zu je fünf Tiere verglichen. Fünf Mäuse bekamen *B. adolescentis* über das Trinkwasser verabreicht, die anderen fünf Mäuse fungierten als Kontrollgruppe, in der die Tiere Trinkwasser ohne spezifische Anreicherung durch bestimmte Bakterien bekamen.

Fragestellung 2: Nehmen Mäuse, die mit dem Bifidobakterium *B. adolescentis* behandelt wurden (im Folgenden auch „*B. adolescentis*-Mäuse“ genannt), signifikant mehr Gewicht zu als die Mäuse aus der Kontrollgruppe (im Folgenden auch „Kontrollmäuse“ genannt)?

Bezug ist das Endgewicht im Hauptexperiment am Tag 96 (Ende der Versuchsreihe), da an Tag 98 das Gewicht nach 16 Stunden Fasten stark erniedrigt ist.

Die prozentuale Gewichtszunahme im Versuchsverlauf (98 Tage) ist in Abbildung 10 dargestellt. Mit zunehmender Versuchsdauer werden die Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe größer.

Ergebnisse

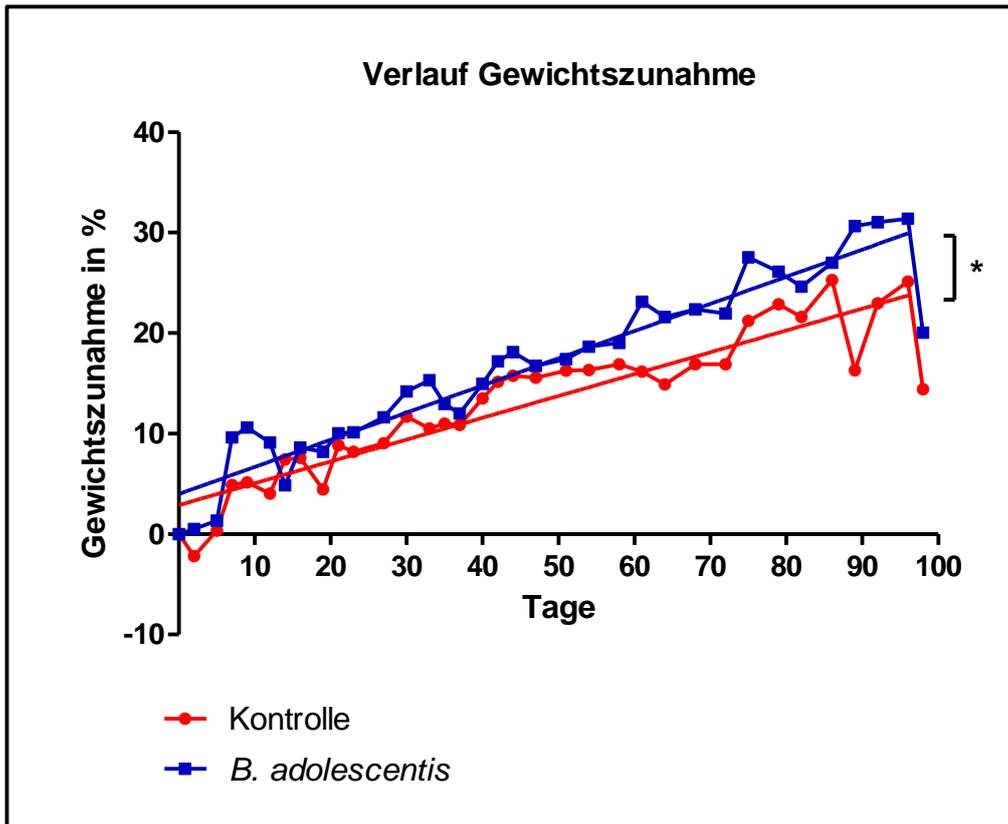


Abb. 10: Verlauf der mittleren, prozentualen Gewichtszunahme beider Mäusegruppen, von Tag 0 bis Tag 98. Dazugehörige Regressionsgeraden von Tag 0 bis Tag 96. Mittelwerte, jeweils $n = 5$. Beide Regressionsgeraden starten von einem ähnlichen Ausgangsniveau, die Regressionsgerade von *B. adolescentis*-Mäusen verläuft jedoch steiler als die der Kontrollmäuse (R^2 Kontrolle = 0,838, R^2 *B. adolescentis* = 0,8952). Die Steigungen unterscheiden sich signifikant voneinander. *, $p=0,025$.

Abbildung 11 und 12 zeigen die sehr ähnlichen Mittelwerte von Gewicht und Gewichtszunahme (in %) an Tag 96.

Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe konnten weder beim absoluten Gewicht noch bei der prozentualen Gewichtszunahme ermittelt werden.

Ergebnisse

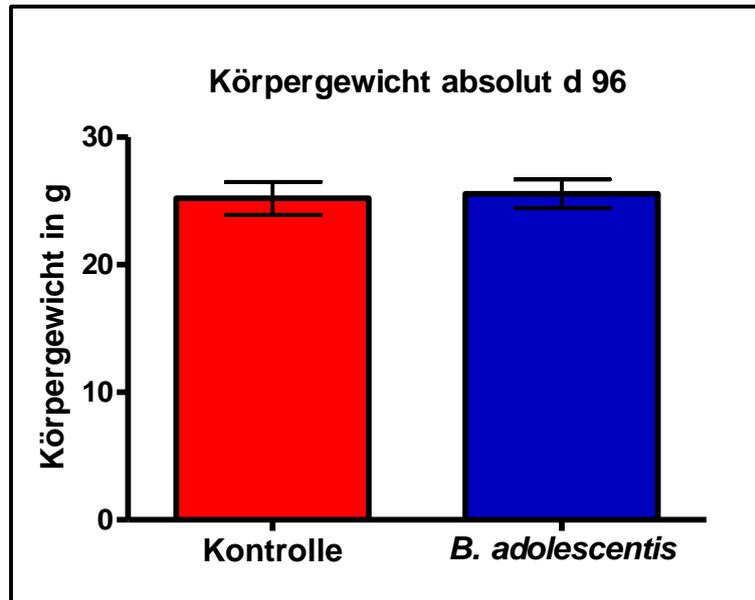


Abb. 11: Absolutes Körpergewicht an Tag 96. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Es ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

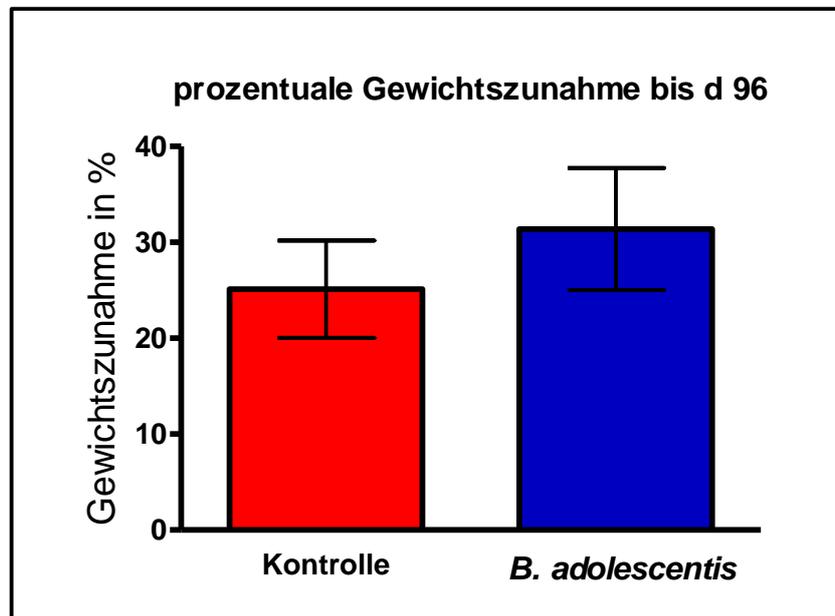


Abb. 12: Prozentuale Gewichtszunahme bis Tag 96. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Es ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

3.1.2.2. Futterverbrauch

Das Futter wurde an 31 Tagen gewogen und der Verbrauch der Gruppen untereinander verglichen.

Ergebnisse

Fragestellung 3: Ist der Futterverbrauch in beiden Gruppen gleich oder in einer der beiden Gruppen erhöht?

Über die gesamte Versuchsdauer bestehen keine signifikanten Unterschiede: Kontroll-Mäuse verbrauchten im Schnitt 14,41 g Futter pro Tag, *B. adolescentis*-Mäuse verbrauchten durchschnittlich 14,72 g Futter pro Tag.

Abbildung 13 zeigt den Verlauf des Futterverbrauches.

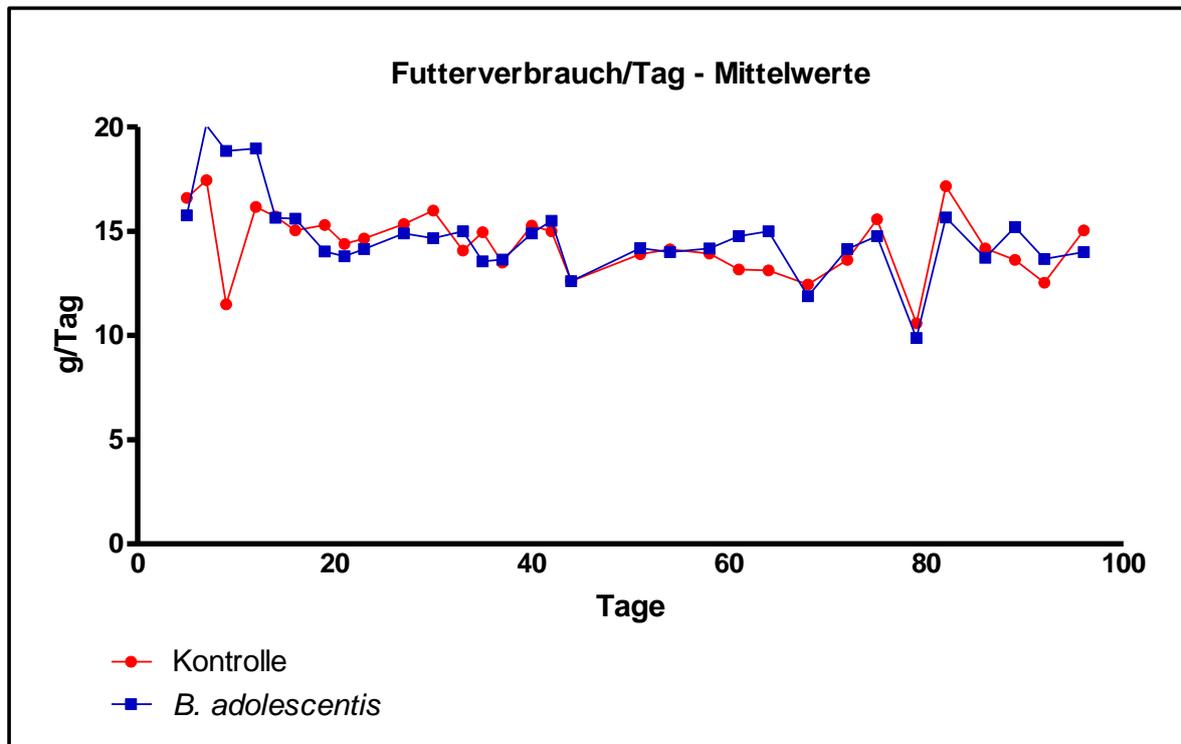


Abb. 13: Verlauf Futterverbrauch bis Tag 96. Mittelwerte, jeweils $n = 5$. Signifikante Unterschiede im Futterverbrauch ergeben sich nicht. $p=0,74$

3.1.2.3. Bauchfett

Nach Tötung der Tiere wurde das Bauchfett entnommen und gewogen, sowie fotografiert (Abbildung 14 und 15).

Fragestellung 4: Bestehen signifikante Unterschiede im Gewicht des Bauchfettes beider Gruppen?

Ergebnisse

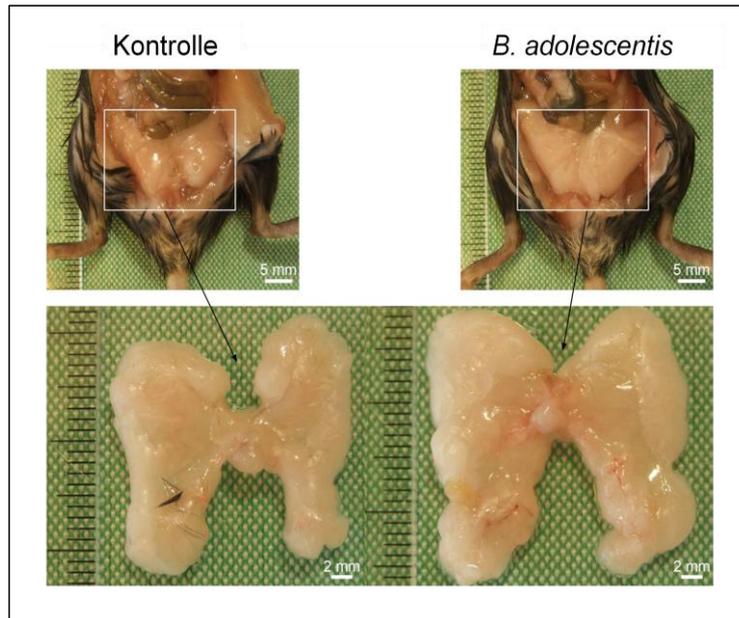


Abb. 14: Exemplarische Bilder des Bauchfetts jeweils einer Maus aus der Kontroll- und der *B. adolescentis*-Gruppe.

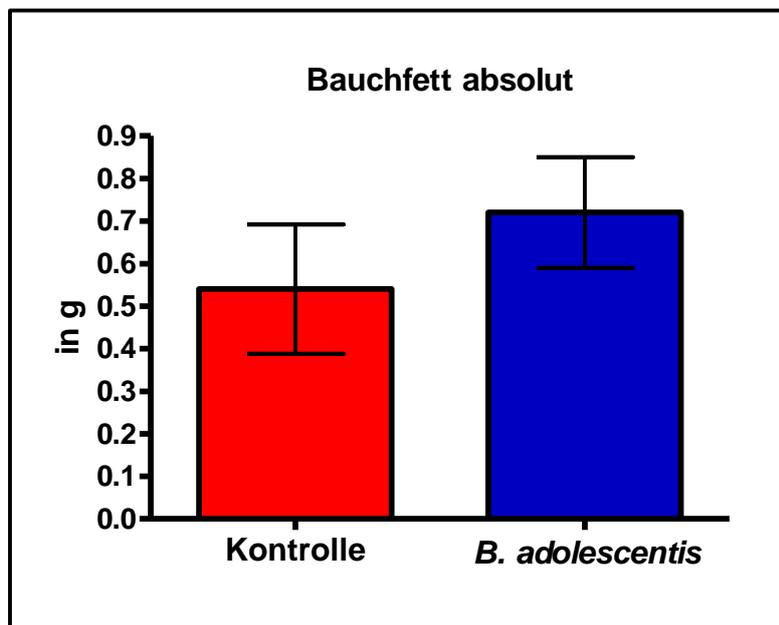


Abb. 15: Absolutes Bauchfettgewicht von Kontroll- und *B. adolescentis*-Gruppe. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Signifikante Unterschiede zeigen sich nicht.

Kontroll-Mäuse wiesen einen Mittelwert von 0,54 g Bauchfett auf, *B. adolescentis*-Mäuse 0,72g. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,12$).

Ergebnisse

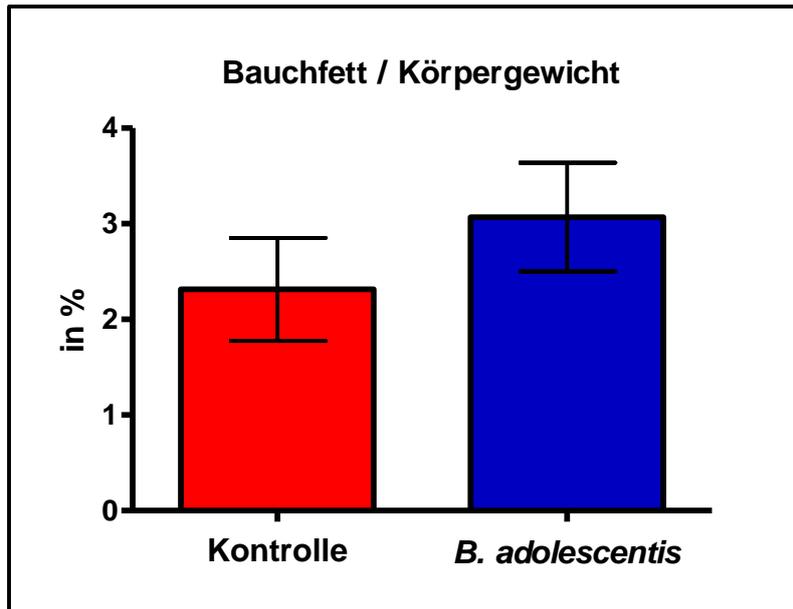


Abb. 16: Bauchfett im Verhältnis zum Körpergewicht. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Keine Signifikanz bei $p=0,095$.

Das Verhältnis von Bauchfett zu Körpergewicht zeigte bei den Kontroll-Mäusen einen Mittelwert von 2,314, bei *B. adolescentis*-Mäusen betrug der Mittelwert 3,07. Bei einem p -Wert von 0,095 ist das Verhältnis von Bauchfett zu Körperfett bei *B. adolescentis*-Mäusen tendenziell erhöht, statistisch signifikante Unterschiede bestehen jedoch nicht.

3.1.2.4. Blutzuckerwerte

Kurz vor Tötung der Mäuse wurde ihnen ein Tropfen Blut aus dem Schwanz entnommen, um mittels Blutzuckerstix (Accu-Check® Sensor) den Blutzuckerwert (BZ-Wert) zu ermitteln. Eine Maus der Kontroll-Gruppe war dabei sehr wehrhaft und hatte deshalb viel Stress. Da ihr BZ-Wert aus diesem Grund erhöht ist und den Mittelwert nach oben zieht, wird der BZ-Wert von dieser Maus bei den Berechnungen nicht mit einbezogen. Die Mittelwerte des Blutzuckers sind in Abbildung 17 dargestellt.

Fragestellung 5: Liegen bei den *B. adolescentis*-Mäusen signifikant erhöhte Blutzucker-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe vor?

Ergebnisse

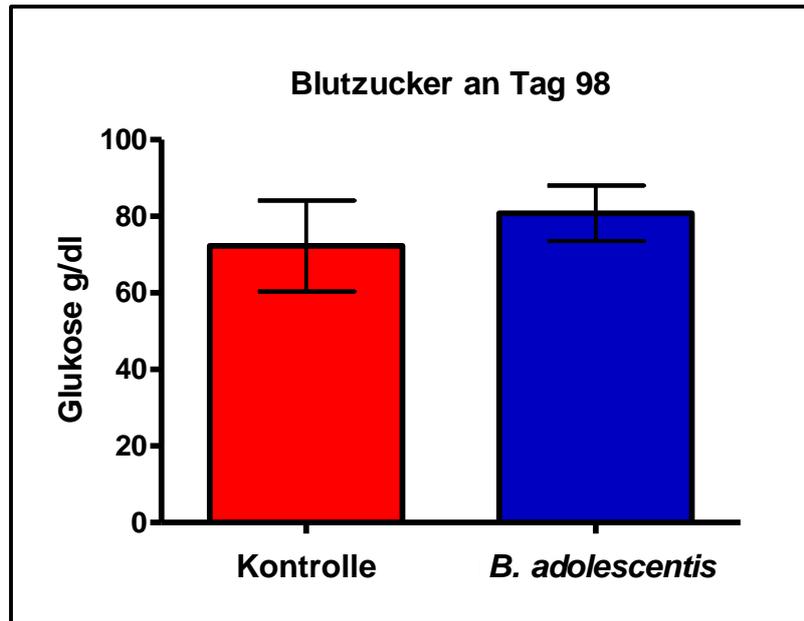


Abb. 17: Blutzuckerwerte an Tag 98. Mittelwerte mit Standardabweichung, Kontrollgruppe n = 4, *B. adolescentis*-Gruppe n = 5. Die mittleren Blutzuckerwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=1,34$).

Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den BZ-Werten der *B. adolescentis*-Mäuse und der Kontroll-Mäuse vor.

3.1.2.5. Blutwerte Cholesterin, freie Fettsäuren, Triglyceride und Insulin

Den getöteten Tieren wurde Herzblut entnommen, um es auf die Parameter Cholesterin, freie Fettsäuren, Triglyceride und Insulin hin zu untersuchen.

Fragestellung 6: Liegen bei den *B. adolescentis*-Mäusen signifikant unterschiedliche Cholesterin-, freie Fettsäuren (FFA)-, Triglycerid- oder Insulinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe vor?

Aus Abbildung 18 geht hervor, dass bei *B. adolescentis*-Mäusen keine signifikant unterschiedlichen Cholesterin-, freie Fettsäuren- oder Triglyceridspiegel im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ermittelt werden konnten.

Jedoch lagen bei *B. adolescentis*-Mäusen signifikant erhöhte Insulinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe vor (Abbildung 19).

Ergebnisse

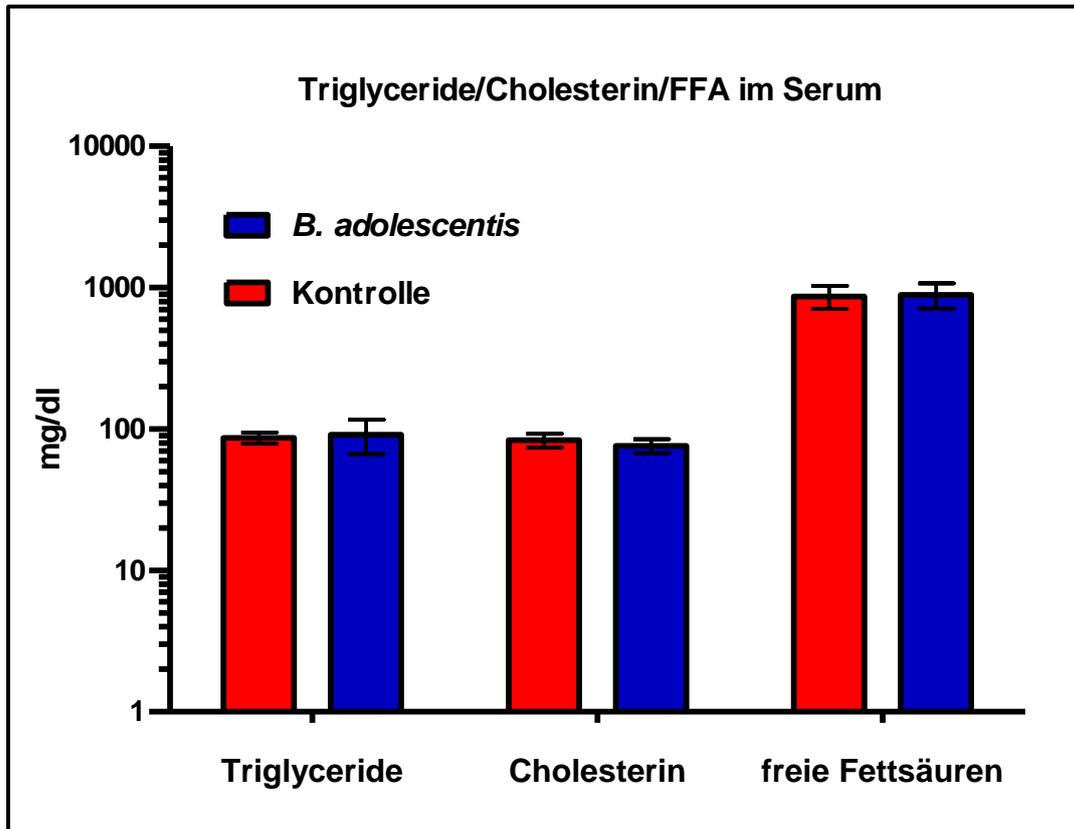


Abb. 18: Konzentration von Triglyceriden, Cholesterin und freien Fettsäuren im Blut der Mäuse in logarithmischer Darstellung. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Signifikante Unterschiede zeigen sich nicht. $p(\text{Triglyceride})=0,7$; $p(\text{Cholesterin})=0,23$; $p(\text{freie Fettsäuren})=0,84$.

Ergebnisse

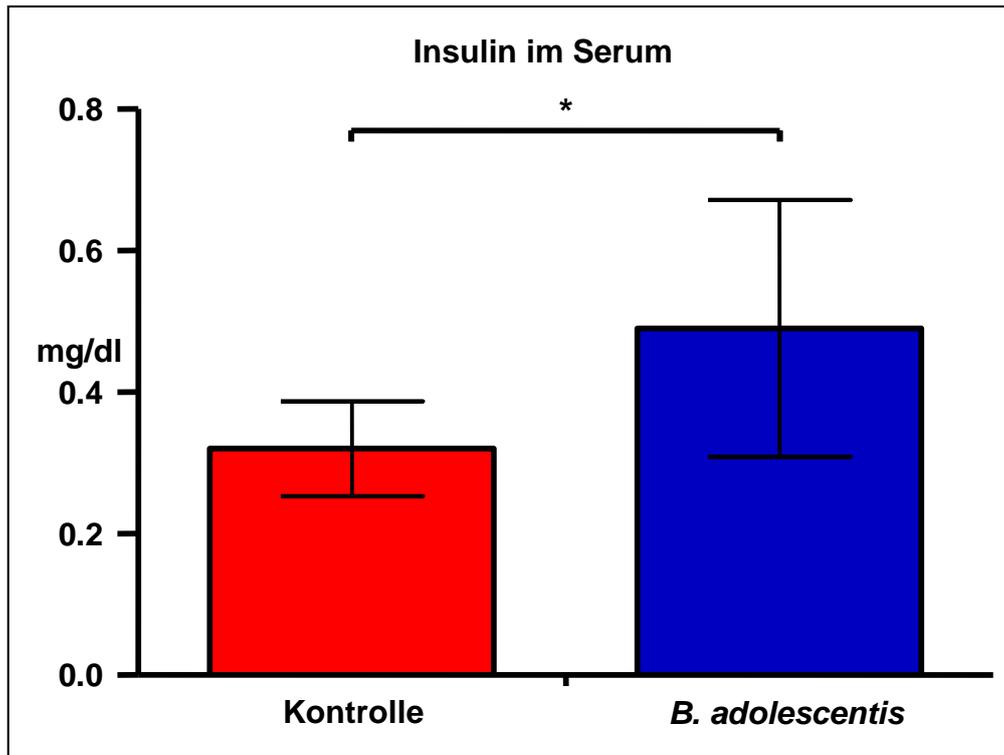


Abb. 19: Insulinspiegel im Serum. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Die Insulinspiegel sind bei *B. adolescentis*-Mäusen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe.

* , $p < 0,05$.

3.1.2.6. Cholesterin und Triglyceride im Lebergewebe

Den getöteten Mäusen wurde die Leber entnommen, um das Lebergewebe später auf den Gehalt an Cholesterin und Triglyceriden, sowie das Gesamteiweiß hin zu untersuchen. Cholesterin und Triglyceride dienen als Parameter für die Leberverfettung, das „Gesamteiweiß“ fungierte als Vergleichsparameter.

Fragestellung 7: Liegen bei den Mäusen der *B. adolescentis*-Gruppe signifikant erhöhte Cholesterin- und Triglyceridwerte vor, im Vergleich zur Kontrollgruppe?

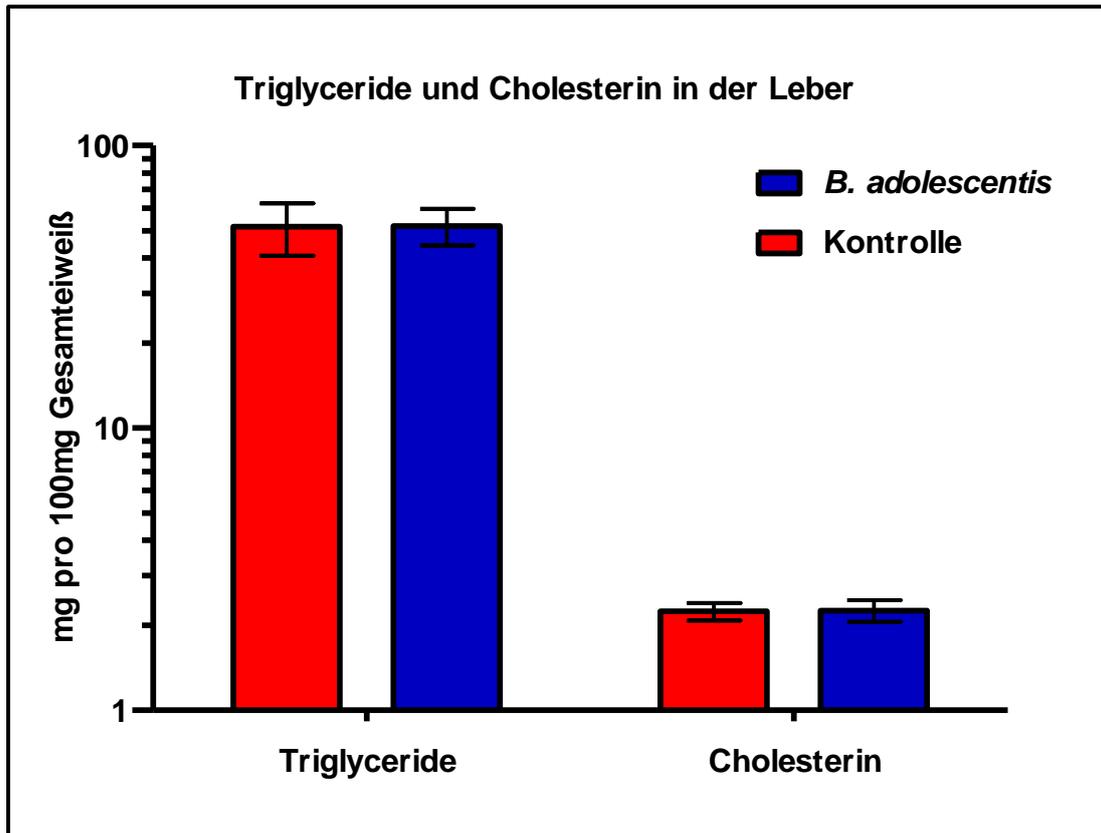


Abb. 20: Triglycerid- und Cholesteringehalt im Vergleich zum Gesamteiweiß der Leberprobe, in logarithmischer Darstellung. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils $n = 5$. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (p [Triglyceride]=1,0; p [Cholesterin]=0,78).

Abbildung 20 zeigt, dass Triglycerid- und Cholesteringehalt im Lebergewebe von *B. adolescentis*-Mäusen und Kontrollmäusen nicht signifikant unterschiedlich sind.

3.1.2.7. Expression des Proteins *Fiaf* im Dünndarmepithel

Den getöteten Mäusen wurde Dünndarm entnommen und das Epithel wurde abgeschabt, um es später mittels qRT-PCR auf die quantitative Expression des *Fiaf*-Rezeptors hin zu untersuchen. Als Referenzgen wurde der Rezeptor *Gapdh* benutzt. Von jeder Maus wurden dabei zwei Proben untersucht. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis.

Fragestellung 8: Die Bifidobakterien sollen das Protein *Fiaf* hemmen, welches unter anderem im Dünndarm exprimiert wird. Geprüft werden soll, ob es einen signifikanten

Ergebnisse

Unterschied in der Expression dieses Rezeptors zwischen den *B. adolescentis*- und den Kontrollmäusen gibt.

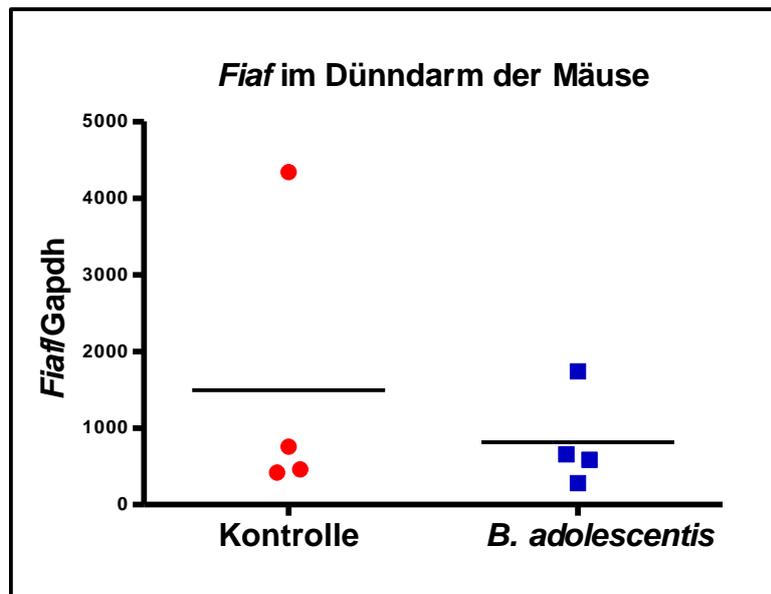


Abb. 21: Grafische Darstellung der Potenz-Werte von *Fiaf* im Verhältnis zu *Gapdh*. Mittelwerte, jeweils $n = 4$. Die Expression des *Fiaf*-Rezeptors ist nicht signifikant unterschiedlich ausgeprägt ($p = 0,86$).

Signifikante Unterschiede in den Potenz-Werten des *Fiaf*-Rezeptors bestehen zwischen den beiden Gruppen nicht.

3.2. Zellkulturen

3T3-L1-Zellen (Prädipozyten) wurden mit Überständen von Mode K-Zellen (murine Darmepithelzellen) stimuliert, die zuvor mit dem *Bifidobacterium adolescentis* inkubiert wurden. *B. adolescentis* wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Mode K-Zellen gegeben: MOI 10 und MOI 50. Die Überstände wurden in drei verschiedenen Konzentrationen in das Zellkulturmedium der 3T3-L1-Zellen gemischt: 10 %, 50 % und 75 % (siehe Abbildung 4 und 5). Das Zellkulturmedium wurde in der Hälfte der Versuchsansätze mit den Supplementen Insulin, DEXA und IBMX versetzt, die andere Hälfte wurde nicht mit Supplementen versetzt. In jedem Versuchsansatz war $n = 2$. Zusätzlich gab es eine Positiv- und eine Negativkontrolle, hier wurden die 3T3-L1-Zellen entweder nur mit supplementiertem Zellkulturmedium oder mit nicht-supplementiertem Zellkulturmedium behandelt, in beiden Fällen jedoch ohne

Ergebnisse

Überstände der Mode K-Zellen (siehe Abbildung 6). In Tabelle VI wird eine Auflistung der einzelnen Versuchsansätze gezeigt.

Die Auswertungen fanden jeweils an Tag 8, 12, 16 und 20 statt (Abbildung 4).

Tabelle VI: Versuchsansätze einzeln aufgelistet.

+ mit den Supplementen Insulin, DEXA und IBMX, n = 2

- ohne die Supplemente Insulin, DEXA und IBMX, n = 2

Versuchsansätze mit den Supplementen Insulin, DEXA und IBMX (+)	Versuchsansätze ohne die Supplemente Insulin, DEXA und IBMX (-)
+ Kontrolle,1	- Kontrolle,1
+ Kontrolle,2	- Kontrolle,2
+ MOI 10 10%,1	-MOI 10 10%,1
+ MOI 10 10%,2	-MOI 10 10%,2
+ MOI 10 50%,1	-MOI 10 50%,1
+ MOI 10 50%,2	-MOI 10 50%,2
+ MOI 10 75%,1	-MOI 10 75%,1
+ MOI 10 75%,2	-MOI 10 75%,2
+ MOI 50 10%,1	-MOI 50 10%,1
+ MOI 50 10%,2	-MOI 50 10%,2
+ MOI 50 50%,1	-MOI 50 50%,1
+ MOI 50 50%,2	-MOI 50 50%,2
+ MOI 50 75%,1	-MOI 50 75%,1
+ MOI 50 75%,2	-MOI 50 75%,2

Fragestellung 9: Funktioniert die Ausdifferenzierung der 3T3-L1-Zellen; sieht man eine Zunahme des Fettes/der Fettvakuolen mit fortschreitender Zeit?

Fragestellung 10: Differenzieren die 3T3-L1-Zellen mit den Überständen der mit *B. adolescentis* inkubierten Mode K-Zellen besser/schneller aus als bei konventioneller Zellpflege, ohne Überstände? Gibt es Unterschiede in der Ausdifferenzierung bei unterschiedlicher MOI oder unterschiedlicher Konzentration der Überstände (MOI 10 oder MOI 50, bzw. 10 %, 50 %, 75 %) und an verschiedenen Auswertungszeitpunkten?

Ergebnisse

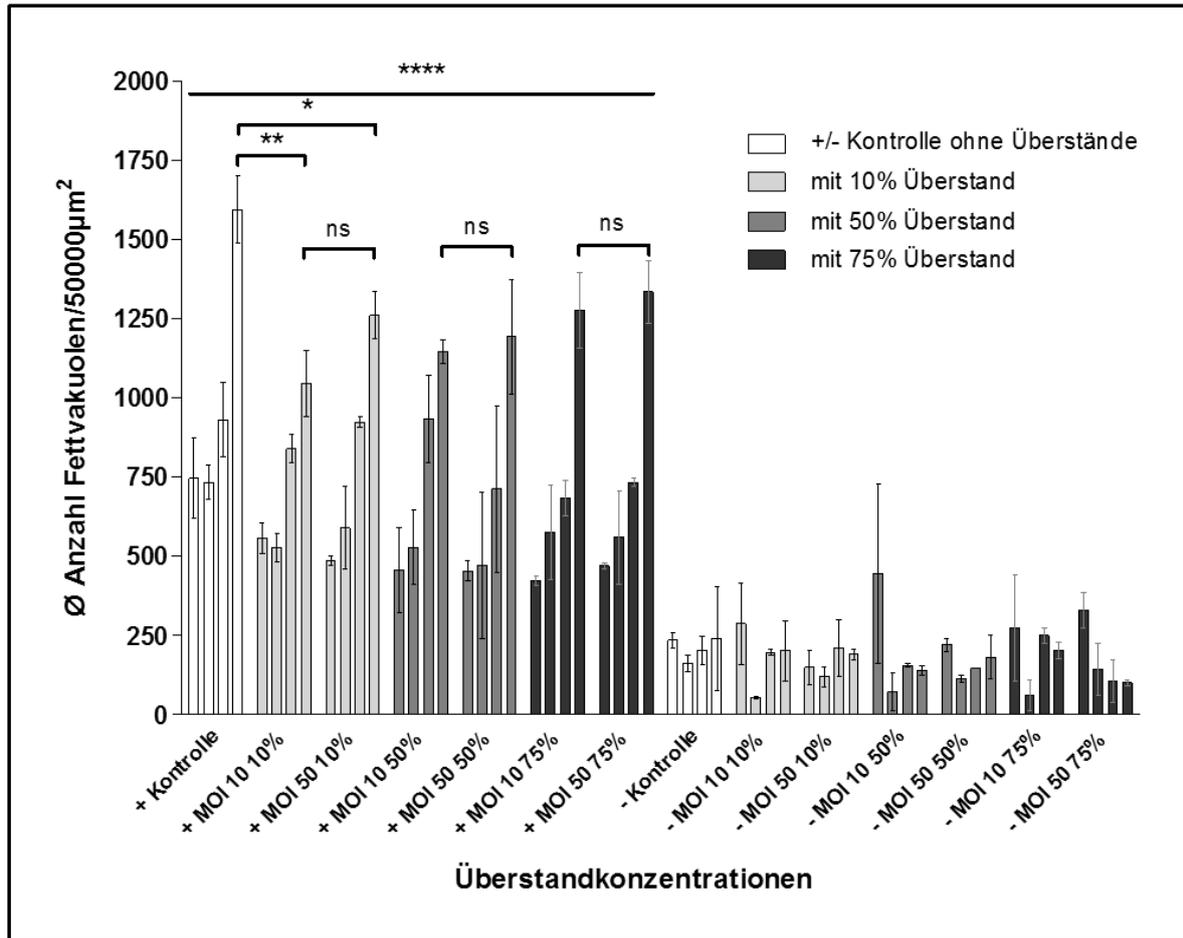


Abb. 22: Gesamtergebnis nach Auszählung der Fettvakuolen. Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils n=2. Jeweils vier farblich zusammengehörende Balken bezeichnen die Tage d08, d12, d16 und d12 (von links nach rechts) der gleichen Überstandskonzentration. Erklärung der Bezeichnungen für die Versuchsansätze in Tabelle VI.

*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$ (a) verglichen mit (b).
ns, nicht signifikant.

Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, dass die Werte an Tag 8 meist niedrig, gelegentlich aber an Tag 12 noch niedriger als an Tag 8 liegen (überwiegend bei den nicht-supplementierten Ansätzen, rechte Hälfte). Die Werte von Tag 16 liegen generell bei allen supplementierten Versuchsansätzen höher als die von Tag 8 oder 12. Die Werte von Tag 20 liegen bei allen supplementierten Versuchsansätzen höher als die von Tag 16. Die Positivkontrolle weist an Tag 20 die höchsten Werte von allen Versuchsansätzen auf. Bei den nicht-supplementierten Versuchsansätzen sind keine konsistenten Muster in Abhängigkeit von den Auszählungszeitpunkten ersichtlich. Die beiden großen Gruppen „Supplementiert“ zu „Nicht-Supplementiert“ sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$).

Ergebnisse

Bei den supplementierten Gruppen ist an Tag 20 die Tendenz zu erkennen, dass bei gleichbleibender Überstandskonzentration und mit zunehmender MOI die Anzahl der gezählten Vakuolen zunimmt (z.B. „+ MOI 10 10 %“ zu „+ MOI 50 10 %“, siehe Abbildung 22). Diese Unterschiede sind nur in der Tendenz vorhanden und nicht signifikant.

Vergleicht man die supplementierten Gruppen an Tag 20 bei gleichbleibender MOI, jedoch unterschiedlicher Überstandskonzentration (z.B. „+MOI 10 10%“ zu „+MOI 10 50%“, siehe Abbildung 22), dann ist die oben beschriebene Tendenz nicht in gleichem Maße zu beobachten.

Führt man die Tage 8 bis 20 eines Überstandgemisches jeweils zu einer großen Gruppe zusammen, zeigen sich alle supplementierten, einzelnen Proben signifikant unterschiedlich zu allen nicht-supplementierten, einzelnen Proben ($p < 0,0001$). Dies zeigt Abbildung 23.

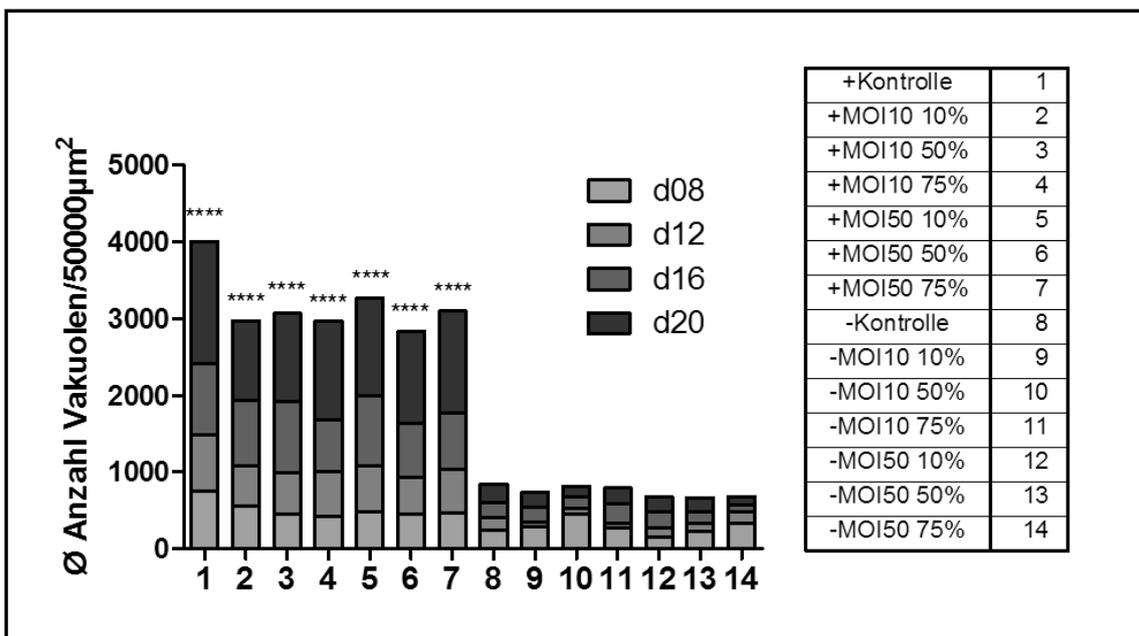


Abb. 23: d08 bis d20 als Gruppe der jeweiligen Konzentration zusammengefasst. Jede Gruppe von 1 bis 7 unterscheidet sich in der Anzahl der Fettvakuolen signifikant von jeder Gruppe von 8 bis 14.

****, $p < 0,0001$ verglichen mit den Gruppen 8 bis 14.

Vergleicht man die Anzahl der Vakuolen innerhalb der großen Gruppe „Supplementiert“ zwischen den einzelnen Auszählungszeitpunkten (d08 bis d20),

Ergebnisse

dann zeigt sich, dass die Vakuolenzahl von der frühesten bis zur letzten Auszählung signifikant zunimmt (Abbildung 24).

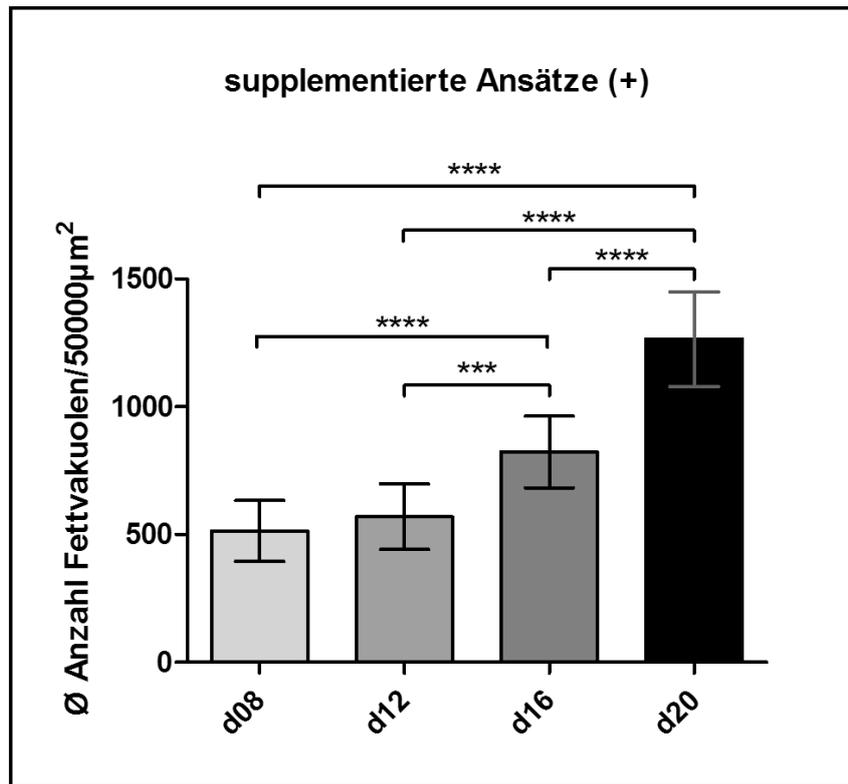


Abb. 24: Alle supplementierten Ansätze (+) sind jeweils als Gruppe der Auszählungszeitpunkte d08, d12, d16 und d20 zusammengefasst. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Anzahl der Vakuolen nimmt zu, je später der Auszählungszeitpunkt.

, $p < 0,001$; *, $p < 0,0001$.

Innerhalb der großen Gruppe „Nicht Supplementiert“ nimmt die Anzahl der Vakuolen mit zunehmender Zeit nicht zu. An Tag 8 ist die Vakuolenzahl signifikant größer als an allen anderen Auszählungszeitpunkten (siehe hierzu Abbildung 25).

Ergebnisse

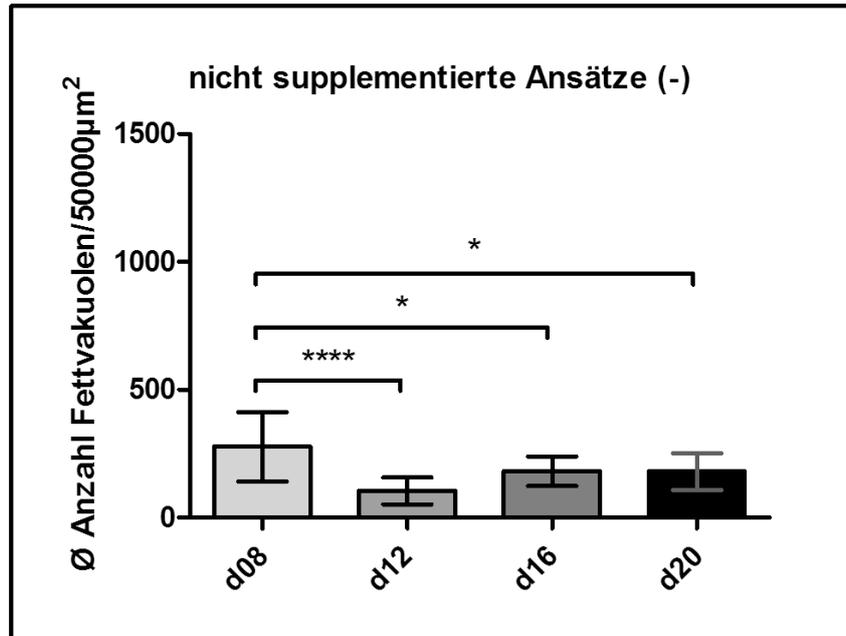


Abb. 25: Alle nicht supplementierten Ansätze (-) sind jeweils als Gruppe der Auszählungszeitpunkte d08, d12, d16 und d20 zusammengefasst. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Anzahl der Vakuolen ist an Tag 8 am größten.

*, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Probiotika einerseits auf den Fettstoffwechsel von C57 BL/6-Mäusen und andererseits auf die Ausdifferenzierung der Präadipozyten 3T3-L1 hin untersucht. Als Probiotikum diente hierbei hauptsächlich *Bifidobacterium adolescentis*.

Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen regelmäßig *B. adolescentis* im Trinkwasser verabreicht wurde, mehr Gewicht zunahmen, als Mäuse die mit *B. vulgatus*, *E. coli* mpk oder *E. coli* NISSLE supplementiert wurden.

In dieser Arbeit wurden zwei Mäusegruppen verglichen, von denen eine *B. adolescentis* mit dem Trinkwasser verabreicht bekam, die andere nicht. Dabei zeigte sich, dass bei ähnlichem Futterverbrauch die Gewichtszunahme bei den Mäusen mit *B. adolescentis* deutlich höher, jedoch nicht signifikant höher als bei der Kontrollgruppe war. *B. adolescentis* -Mäuse hatten tendenziell mehr Bauchfett im Verhältnis zum Körpergewicht als die Mäuse der Kontrollgruppe, jedoch war diese Tendenz nicht statistisch signifikant. Bei den Bluttests war der Insulinspiegel der *B. adolescentis*-Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die anderen Blutwerte (Blutzucker, Triglyceride, Cholesterin und FFA) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Der Cholesteringehalt in der Leber unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Auch die Expression des Rezeptors *Fiaf* in der Dünndarmwand der Tiere war nicht signifikant unterschiedlich.

Darüber hinaus wurden für diese Arbeit 3T3-L1-Zellen mit Überständen von Mode K-Zellen, die zuvor mit *B. adolescentis* inkubiert wurden, stimuliert. Es zeigte sich, dass 3T3-L1-Zellen tendenziell vermehrt ausdifferenzierten, wenn *B. adolescentis* für die Überstände in höherer MOI auf die Mode K-Zellen gegeben wurde. Diese Tendenz zeigte sich nur bei den Zellen, die zusätzlich mit Insulin, DEXA und IBMX supplementiert wurden, und sie war nicht signifikant.

Die gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss nicht zu, dass das *Bifidobacterium adolescentis* oder ein von ihm sezernierter Faktor in der Lage ist, den Fettstoffwechsel von C57 BL/6-Mäusen und 3T3-L1-Zellen zu beeinflussen, da es zu wenig signifikante Ergebnisse gibt. Man gewinnt jedoch den Eindruck, dass die Einwirkung von *B. adolescentis* auf die Mäuse und die Zellen eine schwache, anabole Wirkung ausübt. Dies zeigt sich vor allem am deutlich höheren Gewicht der Mäuse mit *B. adolescentis* am Versuchsende, sowie an der höheren Bauchfettmasse der *B. adolescentis*-Mäuse und ihrem signifikant erhöhten Insulinspiegel, der für eine entwickelte Insulinresistenz spricht. Auch im Zellversuch zeigte sich die anabole Tendenz in den mit Insulin, DEXA und IBMX supplementierten Versuchsreihen.

4.2. Die Mechanismen der Wirkung von Kommensalen und Probiotika auf den Fettstoffwechsel *in vivo*

Verschiedene Studien zeigen, dass kommensale Bakterienstämme den Wirtsfettstoffwechsel beeinflussen können. Dabei wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, Probiotika verwendet. Bei der Beeinflussung des Wirtsfettstoffwechsels geht man von verschiedenen Mechanismen aus.

Die Erhöhung der Energieaufnahme aus der Nahrung ist einer dieser Mechanismen. Kaoutari et al. fanden heraus, dass Mikroorganismen essentiell für die Verdauung von Polysacchariden im menschlichen Organismus sind ¹²⁸. Darmbakterien besitzen Enzyme, zum Beispiel *carbohydrate-active enzymes* (CAZymes), die in der Lage sind, normalerweise für den Menschen unverdauliche Polysaccharide aufzuspalten. Die daraus entstehenden, kurzkettigen Kohlenhydrate können vom Darm aufgenommen oder zu Fettsäuren umgebaut werden. Diese wiederum können von der Darmwand aufgenommen werden. Beides nimmt dann am Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel des Menschen teil, dadurch wird die Energieaufnahme des Organismus gesteigert ¹²⁸. Bäckhed, Gordon et al. zeigten, dass keimfreie Mäuse (KF-Mäuse) mehr Nahrung zu sich nehmen mussten, um das gleiche Gewicht zu erlangen wie Mäuse mit einer normalen Darmflora ³⁸. Die Übertragung der normalen Darmflora auf die keimfreien Mäuse führte zu einer

Diskussion

Zunahme an Körpergewicht und Körperfett. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikroorganismen die Energieaufnahme aus der Nahrung erhöhen können.

Auch die Veränderung der Darmflora ist ein Mechanismus, der den Fettstoffwechsel beeinflusst. Ley et al. zeigten, dass die Darmflora von adipösen Mäusen (ob/ob) eine deutlich höhere Anzahl an Firmicutes spp. und eine wesentlich niedrigere Anzahl an Bacteroidetes aufwies als die Darmflora von schlanken Mäusen (+/+) ⁵⁴. Auch bei fettleibigen Menschen konnten Ley et al. zeigen, dass die Verteilung der Darmbakterien zugunsten der Firmicutes spp. ausfiel, und dass verhältnismäßig weniger Bacteroidetes nachweisbar waren. Nach einer kalorienreduzierten Diät beobachteten Ley et al., dass die Anzahl der Firmicutes abnahm und die Anzahl der Bacteroidetes zunahm ⁵⁵. Ley et al. fanden auch heraus, dass aus der Kolonisation von KF-Mäusen mit der Darmflora von dicken, konventionell aufgezogenen (CONV-R) Mäusen eine signifikant größere Zunahme an Körperfett resultierte als bei der Kolonisation von KF-Mäusen mit der Darmflora von schlanken CONV-R Mäusen ⁵⁵.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Darmflora in der Lage ist, Stoffwechsellenzyme im Wirt zu beeinflussen. Gordon, Bäckhed et al. zeigten, dass die Darmflora das Protein *Fiaf* hemmt, woraus eine vermehrte LPL-Aktivität resultiert und die Aufnahme von freien Fettsäuren in die Adipozyten gesteigert wird ³⁸. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) durch Darmbakterien gehemmt wird, was zu verminderter Fettsäureoxidation und somit zu Adipositas führt ⁶⁸. Samuel und Gordon konnten eine deutlich gesteigerte Effektivität bei der Fermentation von Polysacchariden feststellen, als sie KF-Mäuse mit *Bacteroides thetaiotaomicron* und *Methanobrevibacter smithii* besiedelten. *Bacteroides thetaiotaomicron* ist ein wichtiges, saccharolytisch wirkendes Bakterium im menschlichen Darm. *Methanobrevibacter smithii*, ein dominanter, methanbildender Archaeon, fördert die Fermentation von Polysacchariden durch Entfernung des Wasserstoffendprodukts. Im Vergleich zu Mäusen, die nur eine der beiden oben genannten Bakterienarten erhielten, waren die Tiere adipöser und zeigten eine vermehrte *De-Novo*-Lipogenese, sowie eine deutlich reduzierte Expression des

Diskussion

Fiaf-Rezeptors¹²⁹. Dieselben Bakterienarten verwendeten Samuel et al. um zu zeigen, dass kurzkettige Fettsäuren (die Endprodukte der bakteriellen Fermentation) als Signalmoleküle fungieren, um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie Gpr41, zu aktivieren¹³⁰. Dabei fanden sie heraus, dass CONV-R Gpr41^{-/-} Mäuse und mit oben genannten Bakterien kolonisierte Gpr41^{-/-} Mäuse schlanker waren als ihre WT (+/+)-Vergleichsgruppe, bei ähnlichem Futterverbrauch. Diese Unterschiede zeigten sich nicht beim Vergleich der keimfreien Gpr41^{-/-}-Mäuse mit den keimfreien WT (+/+) -Mäusen. Aus ihren Untersuchungen schlossen sie, dass die Gpr41-Defizienz mit reduzierter Expression des Hormons PYY, schnellerer Magen-Darm-Passage und reduzierter Energieaufnahme aus der Nahrung (v.a. kurzkettige Fettsäuren) assoziiert ist. PYY ist ein enteroendokrines Hormon, das normalerweise die Darmmotilität hemmt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Gpr41 den Energiehaushalt, abhängig von der Darmflora, regulieren kann¹³⁰.

Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass eine fettreiche Ernährung (high fat diet, HFD) die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen in Leber, Muskel und im Fettgewebe auslösen kann. Dies führt zu einer *Low grade inflammation*, die mit Fettleibigkeit, Insulinresistenz und anderen Stoffwechselerkrankungen vergesellschaftet sein kann^{131,132}.

Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält Lipopolysaccharide (LPS), die beim Zerfall der Bakterien frei werden. Sie stimulieren die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen¹³³. Cani et al. konnten die Aufnahme von LPS aus dem Darm verringern, indem sie Mäusen Oligofruktose gaben⁸³. Oligofruktose ist ein Präbiotikum, welches das Wachstum von Bifidobakterien fördert. Cani et al. leiten daraus ab, dass durch das Wachstum der Bifidobakterien vermehrt Tight Junctions gebildet werden und dadurch die Durchlässigkeit der Darmwand verringert wird. Folglich ist die LPS-Aufnahme aus dem Darm verringert und die LPS-Serumspiegel können weder steigen, noch einen proinflammatorischen Status auslösen⁸³. Gaben Cani et al. den Mäusen Oligofruktose zur HFD, so war die Anzahl der Bifidobakterien im

Diskussion

murinen Zökum deutlich erhöht und die Endotoxämie konnte normalisiert werden. Die größere Anzahl an Bifidobakterien korrelierte signifikant mit verbesserter Glukosetoleranz, Glukose-induzierter Insulinsekretion und normalisiertem Entzündungsstatus⁷⁹. Dies lässt ebenfalls den Schluss zu, dass Darmbakterien bei der Regulation von Endotoxämie und Entzündung mitwirken und dadurch die Entstehung oder den Verlauf von Fettleibigkeit und Diabetes beeinflussen können. Ewaschuk et al. konnten in einem Zellversuch mit humanen T84-Zellen zeigen, dass sezernierte Faktoren von *Bifidobacterium infantis* die Barriere zwischen den Zellen verstärken können und die Expression der Tight Junction-Proteine *Zonula Occludens 1* und *Occludin* erhöhen. Das führte zu einer Normalisierung der Darmwandpermeabilität und zu einer geringeren Entzündungsreaktion in Mäusen.

In Abbildung 26 wird das Zusammenspiel von Darmflora, Fettspeicherung und Entzündungsstatus schematisch gezeigt.

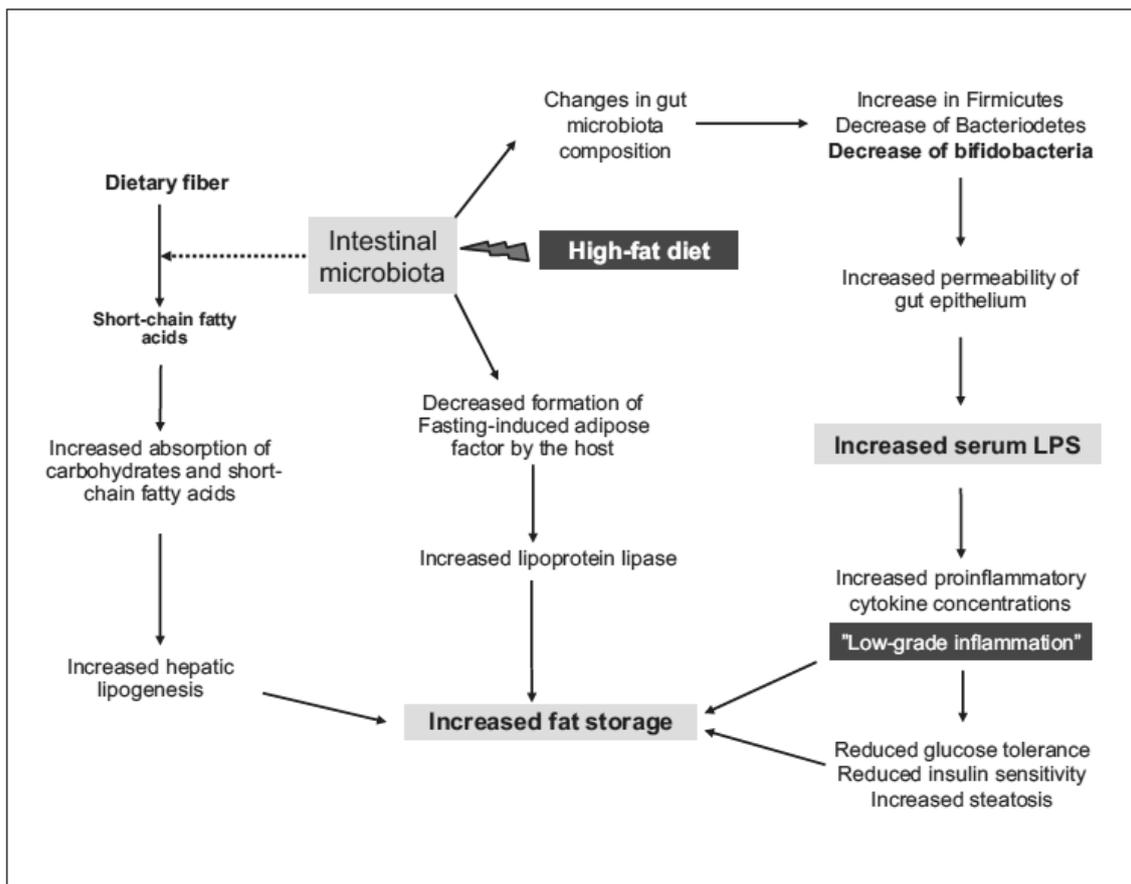


Abb. 26: Rolle der Darmflora bei der Regulation der Nahrungsaufnahme, Fettspeicherung und des Entzündungstatus im Wirt durch fettreiche Ernährung¹³⁴. LPS=Lipopolysaccharid

Aussagen über die Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Probiotika sind oft widersprüchlich. Einigen Probiotika konnte eine anti-adipöse Wirkung nachgewiesen werden¹³⁵⁻¹⁴¹, andere Probiotika begünstigen die Fettleibigkeit^{142,143}. Und es gibt Probiotika, denen weder ein positiver noch ein negativer Effekt auf das Körpergewicht nachgewiesen werden konnte¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Lactobacillus paracasei und *Lactobacillus plantarum* werden unter anderem als Nahrungsergänzungsmittel oder als Mittel gegen Reisediarrhö genutzt. Lee et al. fanden heraus, dass die Fermentationsprodukte von *L. paracasei*, *L. plantarum* und Sojamilch (soy milk fermented products, SM101 und SM102) das Körpergewicht und den Körperfettanteil bei HFD-gefütterten Ratten reduzierte, und dass ihr Serum-Leptin-Spiegel erhöht war. Diese Effekte wurden auf die erhöhten Daidzein- und Genistein-Spiegel in der Sojamilch während der Fermentation durch *L. paracasei* und *L. plantarum* zurückgeführt¹³⁵.

Lactobacillus gasseri wird im Handel als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Kadooka et al. zeigten, dass *L. gasseri* SBT2055 das abdominale Fett und das Körpergewicht bei Erwachsenen reduzieren kann¹³⁶. Kang et al. vermuteten, dass die antiadipöse Wirkung von *L. gasseri* BNR 17 der vermehrten Expression von Genen, die mit der Fettsäureoxidation assoziiert sind, und dem erniedrigten Leptinspiegel zuzuschreiben sind. Die Ursache der antidiabetogenen Wirkung vermuten sie in der vermehrten Expression von GLUT 4-Rezeptoren und dem reduzierten Insulin-Spiegel¹⁴⁰.

Kondo et al. fanden heraus, dass die gewichtsreduzierende Wirkung von *Bifidobacterium breve* bei HFD-Mäusen dosisabhängig ist. Je nach Dosishöhe wurden bei Supplementierung mit *B. breve* das Körpergewicht und das epididymale Fett reduziert und der Cholesterin-, Blutzucker- und Insulinspiegel verbessert¹³⁷.

Diskussion

Yin et al. zeigten, dass die Wirkung von Probiotika auf den Stoffwechsel von Ratten auch stammabhängig ist. Die Ratten wurden mit vier verschiedenen Bifidobakterium-Stämmen (*B. L66-5*, *B. L75-4*, *B. M13-4* und *B. FS31-12*) zu einer HFD supplementiert. Von diesen vier Stämmen führte ein Stamm zu erhöhtem Körpergewicht (*B. M13-4*), ein anderer Stamm führte zu reduziertem Körpergewicht (*B. L66-5*), während die beiden anderen Stämme (*B. L75-4* und *B. FS31-12*) keinen Effekt, bezogen auf das Körpergewicht, zeigten ¹⁴³.

Das Milchsäurebakterium *Leuconostoc plantarum* LP 14 konnte in Studien von Takemura et al. das Körpergewicht und das Gewicht des Weißen Fettgewebes sowie Cholesterin- und Leptin-Spiegel senken ¹³⁸. Der Stamm *L. plantarum* OLL2712 wiederum konnte das Körpergewicht bei HFD-Mäusen nicht verändern (Sakai et al.) ¹⁴⁴. In Studien von Park et al. konnte die Gewichtszunahme bei HFD-gefütterten Mäusen reduziert werden als sie mit dem Stamm *KY1032* von *L. plantarum* sowie *L. curvatus HY7601* supplementiert wurden ¹⁴¹. Darüber hinaus änderte sich auch die Zusammensetzung der Darmflora, und die Expression von Genen in Leber und Fettgewebe, die in Stoffwechselfunktionen und Entzündung involviert sind ¹⁴¹.

VSL#3 ist ein probiotisches Präparat, das vier *Lactobacillus*-Stämme (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii bulgaricus*), drei *Bifidobacterium*-Stämme (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*) und *Streptococcus salivarius thermophilus* enthält. Yadav et al. zeigten im Mausmodell, dass VSL#3 das Körpergewicht und die Insulinresistenz reduziert ¹³⁹. Dies führten sie auf einen Mechanismus zurück, nach dem die Anzahl der kurzkettigen Fettsäuren durch die modulierte Zusammensetzung der Darmflora deutlich erhöht wird und dadurch die Freisetzung des Hormons GLP-1 gesteigert wird. Das führt zu reduzierter Nahrungsaufnahme und verbesserter Glukosetoleranz. Im Zellversuch konnten Yadav et al. nachweisen, dass Butyrat (einfachste, kurzkettige Fettsäure) die Ausschüttung von GLP-1 aus intestinalen L-Zellen stimuliert ¹³⁹. Diese Ergebnisse zeigen, dass VSL#3 das Körpergewicht und die Insulinresistenz über den Mechanismus Darmflora → SCFA → Hormon-ausschüttung verbessern kann.

Lactobacillus acidophilus wird unter anderem Milchprodukten als Nahrungsergänzung hinzugesetzt. Arora et al. konnten bei (diätinduziert) fettleibigen Mäusen keine Gewichtsabnahme während einer Substitution von *Lactobacillus acidophilus* NCDC 13 feststellen ¹⁴⁵.

4.3. Wirkung des Probiotikum *Bifidobacterium adolescentis* auf den Fettstoffwechsel *in vivo*

In dieser Arbeit wurde das Probiotikum *Bifidobacterium adolescentis* für die Versuche an Mäusen verwendet. Dabei waren am Ende des Versuchs die Mäuse, die *B. adolescentis* bekamen, tendenziell schwerer als die Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant. In den Serumtests dieser Arbeit zeigte sich ein signifikant erhöhter Insulinspiegel bei *B. adolescentis*-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe, was ein Hinweis auf eine Insulinresistenz sein könnte. Bei allen anderen Serumtests zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ein recht ähnliches Experiment führten Chen et al. durch. Sie verglichen 4 Gruppen von Ratten bezüglich der Supplementation mit *B. adolescentis* miteinander ¹⁴⁶. Eine Gruppe erhielt eine Standard-Diät (Kontrollgruppe), eine andere Gruppe Standard-Diät plus *B. adolescentis*. Eine weitere Gruppe erhielt eine HF-Diät, und die vierte Gruppe HF-Diät plus *B. adolescentis*. Die Ergebnisse zeigten, dass die Ratten, die *B. adolescentis* zu sich nahmen, am Ende des Experiments deutlich mehr Bifidusflora im Darm hatten als die Ratten ohne *B. adolescentis*. Weiter zeigten sie, dass die HFD-Ratten signifikant mehr Körpergewicht und mehr Bauchfett hatten als alle anderen Mäuse. Die Tiere, die HFD plus *B. adolescentis* erhielten, waren in Körpergewicht und Bauchfett der Kontrollgruppe ähnlich. Die Supplementation von *B. adolescentis* hatte also die anabolen Effekte der fettreichen Diät ausgeglichen. Die Supplementation wirkte auch dem erhöhten Lebergewicht und der Steatosis in den Leberzellen, die sich bei den HFD-Ratten gebildet hatten, entgegen. Darüber hinaus zeigte sich bei den HFD-Ratten auch eine ausgeprägte Insulin-Resistenz, der die Supplementation durch *B. adolescentis* entgegenwirkte, so dass sich hier kein Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Das reduzierte Pankreasgewicht bei den

HFD-Ratten wurde ebenfalls durch die *B. adolescentis*-Supplementation ausgeglichen, so dass es hier keinen Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe gab ¹⁴⁶.

Vergleicht man die Experimente von Chen et al. mit den Experimenten in dieser Arbeit, so fällt auf, dass Chen et al. zusätzlich zu den Gruppen „Standard-Diät“ und „Standard-Diät plus *B. adolescentis*“ die zwei Gruppen „HF-Diät“ und „HF-Diät plus *B. adolescentis*“ untersucht haben. Zunächst sind die Ergebnisse sich sehr ähnlich, es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen „Standard-Diät“ und „Standard-Diät plus *B. adolescentis*“. Chen et al. fanden keinen Hinweis auf eine Insulinresistenz im Vergleich dieser beiden Gruppen. Deutliche Unterschiede zwischen *B. adolescentis*-supplementierten und nicht-*B. adolescentis*-supplementierten Tieren zeigten sich bei Chen et al. bei den HFD-gefütterten Ratten. Im Gegensatz dazu wurde den Mäusen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine HFD verabreicht.

Andere Forschergruppen beobachteten, dass *B. adolescentis* durch die Erniedrigung der Plasma-LPS-Spiegel die Leberverfettung verringern konnte ¹⁴⁷. Deshalb vermuteten Chen et al., dass die diffuse Leberverfettung und das erhöhte Lebergewicht das Ergebnis einer systemischen, metabolischen Entzündung ist, die durch die HF-Diät hervorgerufen wird. Sie nahmen an, dass die *B. adolescentis*-Supplementation diese Effekte dadurch linderte, dass die Translokation der Bakterien aus dem Darm in den Körper und die Endotoxämie vermindert wurden. Den Grund für die Verbesserung des Diabetes und der Insulinsensitivität vermuteten sie in einem Mechanismus, der die Synthese und die Sekretion vom Incretin Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) fördert ^{80, 148}.

4.4. Wirkung von Probiotika auf Präadipozyten *in vitro*

In den *in vitro*-Experimenten dieser Arbeit wurden 3T3-L1-Zellen mit den Überständen von Mode K-Zellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Mode K-Zellen wurden zuvor mit *B. adolescentis* in zwei verschiedenen MOI inkubiert. Im Ergebnis sah man nur bei den Adipozyten der Versuchsreihe „+“, d.h. mit Supplementation durch Insulin, DEXA und IBMX, eine Zunahme der Ausdifferenzierung. Diese Versuchsreihe hatte auch die Tendenz, besser

mit den Überständen auszdifferenzieren, die durch Inkubation in höherer MOI hergestellt wurden. Signifikante Ergebnisse ließen sich jedoch nicht erzielen, was vermutlich auch der geringen Fallzahl (n=2) zugrunde liegt.

Bei Experimenten anderer Forschergruppen konnte eine Inhibierung der Ausdifferenzierung von 3T3-L1-Zellen durch andere Probiotika gezeigt werden.

Choi et al. inkubierten 3T3-L1-Zellen mit dem Fermentationsprodukt aus Soja-Isoflavon-Glycosiden und *Bifidobacterium breve*. Die aglykone Form der Isoflavone inhibierte die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen dosisabhängig ¹⁴⁹.

Kim et al. inkubierten 3T3-L1-Zellen mit *Soypro*, einer mit Milchsäurebakterien (z.B. *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, und *Lactobacillus plantarum*) fermentierten Sojamilch ¹⁵⁰. Der Triglyceridgehalt der Zellen war signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich fanden Kim et al. heraus, dass die PPAR- γ 2- und die C/EBP- α mRNA-Expression deutlich reduziert waren. Beide Rezeptoren sind zentrale Regulatoren des Energiestoffwechsels ¹⁵⁰. Im *in vivo*-Experiment mit Ratten hatte die Supplementation durch *Soypro* keinen Effekt auf das Körpergewicht oder die Nahrungsaufnahme. Der LDL-Spiegel war bei den supplementierten Tieren erniedrigt ¹⁵⁰.

4.5. Beeinflussung von *Fiaf* durch die Darmflora und Probiotika

Der *Fasting-induced adipose factor (Fiaf)* inhibiert die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) und erhöht somit indirekt die Plasmatriglyceridspiegel, während die Aufnahme von freien Fettsäuren und Cholesterol ins Gewebe vermindert wird ^{35,151-153}. Eine besondere Eigenschaft des intestinalen *Fiaf*-Rezeptors ist seine Beeinflussung durch die Darmflora ^{38,106}.

In dieser Arbeit wurde die Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch *B. adolescentis* in Hinblick auf den *Fasting-induced adipose factor (Fiaf)*, auch bekannt als *angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4)*, untersucht. Es ging um die Frage, ob *B. adolescentis* in der Lage ist, die Expression des intestinalen *Fiaf*-Rezeptors bei C57 BL/6-Mäusen, die eine Standard-Diät erhielten, zu inhibieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der *Fiaf*-Rezeptor im intestinalen Epithelgewebe beider Versuchsgruppen am Ende des Experiments ungefähr gleich stark exprimiert wurde. Damit besteht kein Unterschied zwischen den

Gruppen. Dieses Ergebnis deckt sich damit, dass ebenfalls kein signifikanter Unterschied beim Körpergewicht festgestellt werden konnte.

Bäckhed et al. fanden heraus, dass gnotobiotische Mäuse, die mit einer normalen Darmflora konventionalisiert wurden, deutlich an Gewicht zunahmten und eine verminderte Expression der intestinalen *Fiaf*-Rezeptoren aufwiesen³⁸. Da *Fiaf* die LPL-Aktivität inhibiert, vermuteten sie, dass die erniedrigte Anzahl an zirkulierenden *Fiaf*-Rezeptoren für die erhöhte Fettspeicherung im Fettgewebe verantwortlich war³⁸. Die normale Darmflora schien die Expression intestinaler *Fiafs* zu inhibieren. Daraus schlossen sie, dass die erhöhte Anzahl intestinaler *Fiaf*-Rezeptoren in KF-Mäusen vor diätinduzierter Adipositas schützen kann.

In einer ähnlichen Studie von Fleissner et al. konnte bestätigt werden, dass der intestinale *Fiaf*-Rezeptor durch Konventionalisierung gehemmt wird¹⁰⁶, jedoch zeigten sie auch, dass dieser Effekt von der Art der HF-Diät abhängig ist. Dies geschieht durch die Induktion des *peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator-1α* (PPARGC1A), indem Stoffwechselfgene reguliert werden¹⁰⁶. Darüber hinaus stellten Fleissner et al. fest, dass die *Fiaf*-Spiegel im Plasma konventionalisierter Mäuse nicht erniedrigt waren, im Vergleich zu keimfreien Mäusen. Bei den konventionalisierten Mäusen wurde eine erhöhte Konzentration gespaltenen *Fiaf*-Rezeptoren beobachtet, während die normale *Fiaf*-Isoform in unveränderter Konzentration vorlag¹⁰⁶. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Darm nicht die Hauptquelle für *Fiaf* im Körper ist, und dass *Fiaf* möglicherweise auch an anderen Orten im Körper als im Darm durch die mikrobielle Gemeinschaft moduliert werden kann. Darüber hinaus scheint auch die vorliegende Isoform von *Fiaf* (z.B. gespalten oder ungespalten) möglicherweise wichtig für die physiologischen Funktionen von *Fiaf* zu sein.

In manchen Publikationen wird die Vermutung geäußert, dass es von den einzelnen Bakterienarten im Darm und ihren Stoffwechselprodukten abhängt, wie hoch das Potential zur Hemmung *Fiafs* ist¹⁵⁴. Samuel und Gordon berichteten, dass die Kombination von *B. thetaiotaomicron* und *Methanobrevibacter smithii* zu einer effizienteren saccharolytischen Fermentation und einer stärkeren Inhibition von *Fiaf* in mit diesen Bakterien

konventionalisierten Mäusen führte ¹²⁹. Aronsson et al. berichteten dass *Fiaf* in Darmkrebszellen durch ein Stoffwechselprodukt von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 hochreguliert wurde. Diese Stoffwechselprodukte wurden in den oben genannten Studien nicht identifiziert, und somit blieb der vollständige Mechanismus der *Fiaf*-Regulation im Darm und dem restlichen Körper weiterhin unklar.

Grootaert et al. ¹⁵⁵ konnten in Zellversuchen nachweisen, dass prominente Vertreter der normalen Darmflora die *Fiaf*-Produktion in kolorektalen Krebszelllinien beeinflussen (*E. faecalis*, *C. perfringens*, *B. thetaiotaomicron* und *E. coli*). Dabei verwendeten sie die kolorektalen Krebszelllinien Caco-2, HAT-29 und HCT-116 sowie die hepatische Krebszelllinie HepG2. Sie zeigten, dass die *Fiaf*-Regulation (Ausprägung der Expression und Isoform) dabei von der Bakterienspecies und dem verwendeten Zelltyp abhing. Darüber hinaus konnten sie kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat und Propionat sowie H₂O₂ als mikrobielle Stoffwechselprodukte identifizieren, die die *Fiaf*-Produktion und -Struktur aktiv modulieren. SCFAs, als sezernierte mikrobielle Stoffwechselprodukte, konnten *Fiaf* in allen getesteten Zelllinien heraufregulieren ¹⁵⁵.

4.6. Methodik und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit lautet die Fragestellung, ob das Probiotikum *B. adolescentis* den Wirtsfettstoffwechsel *in vivo* und *in vitro* verändern kann. Es zeigen sich leider keine eindeutigen Ergebnisse, obgleich sich einzelne Tendenzen abbilden lassen.

Die Ergebnisse *in vivo* haben gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Parameter Körpergewicht, Bauchfettgewicht, Futterverbrauch, Blutzucker, Triglyceride im Serum, Cholesterin im Serum, FFA im Serum, Cholesteringehalt in der Leber und Expression von *Fiaf* im Dünndarmepithel gab. Der Insulinspiegel bei *B. adolescentis*-Mäusen war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

In den oben beschriebenen Studien waren meist signifikante Unterschiede zu beobachten, als den Tieren eine HF-Diät verabreicht wurde. Die verwendeten

Diskussion

Mäuse dieser Arbeit bekamen eine Standard-Diät. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass der Stoffwechsel der Mäuse durch das verwendete Probiotikum nur minimal (erhöhter Insulinspiegel) oder nicht messbar beeinflusst werden konnte. Auch wurden für die Versuche der anderen Studien meist gnotobiotische Tiere verwendet, die nur mit den supplementierten Bakterien besiedelt waren. In dieser Arbeit hingegen wurden Tiere verwendet, die unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten wurden, jedoch keine keimfreien oder gnotobiotischen Mäuse.

Weiter kann für die geringe Anzahl an signifikanten Unterschieden die kleine Fallzahl ($n=5$ in beiden Versuchsgruppen) ursächlich sein. Der erhöhte Insulinspiegel bei den *B. adolescentis*-Mäusen könnte einerseits Zufall, oder andererseits ein Hinweis für eine erworbene Insulinresistenz in *B. adolescentis*-Mäusen sein.

In vielen Studien werden die Stoffwechselprodukte von Probiotika für die Modulation des Fettstoffwechsels im Wirt verantwortlich gemacht^{128,139}. Vor allem kurzkettige Fettsäuren versorgen intestinale Epithelzellen mit Energie, und Butyrat ist hier die bevorzugte kurzkettige Fettsäure¹⁵⁶. Berücksichtigt man die Ergebnisse der oben genannten Forschergruppen, so könnte man die Vermutung aufstellen, dass *B. adolescentis* in dieser Studie eventuell zu wenig oder keine Stoffwechselprodukte (z.B. SFCA) herstellt, die für die Modulation von *Fiaf* im intestinalen Epithelium benötigt werden. Für *B. adolescentis* weiß man jedoch schon sehr lange, dass es Polysaccharide zu kurzkettigen Fettsäuren umwandeln kann¹²⁶. Belenguer et al. zeigten, dass die Effektivität für die Bereitstellung von Butyrat aus Oligofruktose und mittels Kreuzfütterung der Probiotika *B. adolescentis* und *E. hallii* gesteigert werden konnte. *B. adolescentis* produziert Laktat, welches von *E. hallii* zu Butyrat umgewandelt wird¹⁵⁸. Oligofruktose wird unter anderem als Präbiotikum verwendet¹⁵⁹.

Bei den Ergebnissen des *in vitro*-Versuchs in dieser Arbeit waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Es zeigte sich aber folgende Tendenz: die Adipozyten, deren Überstände durch Insulin, DEXA und IBMX supplementiert wurden und bei der Inkubation mit Mode K-Zellen eine höhere MOI von *B. adolescentis* hatten, differenzierten besser aus.

Diskussion

Da die Überstände vor der Verwendung mit 3T3-L1-Zellen bereits 24 Stunden mit den Mode K-Zellen und den Bakterien inkubiert waren, war das verwendete Medium-/Überstandsgemisch für die 3T3-L1-Zellen je nach Überstandskonzentration entsprechend verbraucht und enthielt bereits unterschiedliche Mengen an Stoffwechselabfallprodukten. Automatisch enthielt das Medium-/Überstandsgemisch für die 3T3-L1-Zellen bei höherer Konzentration der Überstände also auch weniger Nährstoffe, und es kann sein, dass die Ausdifferenzierung durch das Vorhandensein von Stoffwechselabbauprodukten und die gleichzeitige Reduktion an Nährstoffen gehemmt wurde. Möglicherweise hätte man die 3T3-L1-Zellen direkt mit *B. adolescentis* inkubieren können, um den Mediumverbrauch im Voraus zu vermeiden.

In den Zellversuchen war die Fallzahl der verwendeten Proben sehr klein (n=2). Möglicherweise hätte sich bei einer höheren Fallzahl ein signifikantes Ergebnis zeigen lassen.

Durch die gewählte Auswertungsmethode könnten Ungenauigkeiten entstanden sein, da das Auszählen der Vakuolen mühsam und mitunter tagesformabhängig ist. Andere Forschergruppen werteten die Versuche mit 3T3-L1-Zellen beispielsweise mittels photometrischer Messung (bei 520-540nm)^{149, 150} oder per ELISA mit einem Triglycerid Essay Kit (z.B. „AdipoRed assay“)¹⁶⁰ aus.

In zukünftigen Studien zum gleichen Thema sollten bei *in vivo*-Versuchen möglichst mehr Tiere verwendet werden als bei den vorliegenden Experimenten, um durch die höhere Fallzahl aussagekräftigere Ergebnisse erzielen zu können. Auch sollten die Tiere möglichst gnotobiotischer Herkunft sein und sowohl mit einer Standard- als auch einer *High-Fat*-Diät gefüttert werden, ähnlich wie bei Chen et al.¹⁴⁶. Eine Kreuzfütterung ist denkbar, um die Ausbeute an Stoffwechselprodukten zu erhöhen. Darüber hinaus könnte der Fäzes der Tiere auf Stoffwechselprodukte hin untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Mechanismen der Stoffwechselbeeinflussung ziehen zu können.

Diskussion

Bei *in vitro*-Versuchen zu dieser Fragestellung könnte die direkte Inkubation von 3T3-L1-Zellen mit *B. adolescentis* gewagt werden, ohne zuvor Überstände herzustellen, damit die Zellen mit frischem, unverbrauchtem Medium ausdifferenzieren können.

In diesem Experiment hat es sich bewährt, dem Medium die Supplemente Insulin, DEXA und IBMX zuzufügen, deshalb sollte daran nichts geändert werden, jedoch kann der Versuchsarm ohne die genannten Supplemente wahrscheinlich weggelassen werden.

In zukünftigen Studien könnte für die Quantifizierung der ausdifferenzierten Zellen z.B. die photometrische Messung herangezogen werden.

5. Zusammenfassung

Die Beziehung zwischen Darmflora und Körpergewicht beschäftigt Forscher weltweit. Spätestens seit der Entschlüsselung des Mikrobioms herrscht die Gewissheit, dass die Darmflora entscheidenden Einfluss auf den menschlichen Stoffwechsel nimmt. Inzwischen konnte man einige Mechanismen identifizieren, über die die Darmflora Fettaufnahme und -speicherung im Körper beeinflusst. Dabei hat man gesehen, dass einige Bakterienarten zu einer Gewichtszunahme, und andere Bakterienarten zur Gewichtsabnahme im Wirt führen können. Teilweise finden sich diese unterschiedlichen Effekte bei verschiedenen Subgruppen der gleichen Bakterienart. In manchen Studien konnten auch durch die Kombination von unterschiedlichen Bakterienarten größere Effekte aufgezeigt werden, als mit einzelnen Spezies.

Zu einer Gewichtszunahme können beispielsweise Bakterien beitragen, die die für den Menschen unverdaulichen Polysaccharide fermentieren und zu kurzkettigen Fetten umbauen, so dass sie vom Darm aufgenommen werden können. Die entstandenen kurzkettigen Fette können später am Stoffwechsel teilnehmen.

Andere Bakterien sind in der Lage, die Permeabilität der Darmwand zu verändern, so dass sie unter anderem für LPS durchlässiger wird. So wird im Körper eine *Low grade inflammation* ausgelöst, die mit Adipositas assoziiert ist. Darüber hinaus wurden Proteine entdeckt, deren Expression durch die Darmflora verändert werden kann, und die in der Lage sind, den Fettstoffwechsel zu beeinflussen. Eines dieser Proteine ist der *Fiaf*-Rezeptor, dessen Expression durch die Anwesenheit der Darmflora gehemmt wird.

In der Fragestellung um die Beeinflussung des Wirtsfettstoffwechsels *in vivo* und *in vitro* durch Probiotika, genauer durch das Probiotikum *B. adolescentis*, wurden für diese Dissertation Experimente an C57 BL/6-Mäusen und 3T3-L1-Zellen durchgeführt.

Um herauszufinden, ob sich der Fettstoffwechsel von C57 BL/6-Mäusen durch Supplementierung mit dem Probiotikum *B. adolescentis* verändert, wurden zwei Gruppen à 5 Mäuse gebildet. In einer der Gruppen wurde das Trinkwasser mit

Zusammenfassung

B. adolescentis angereichert, in der anderen, der Kontrollgruppe, nicht. Am Ende des Versuchs war die Gewichtszunahme der Mäuse der *B. adolescentis*-Gruppe zwar größer als in der Vergleichsgruppe, jedoch nicht signifikant. Das Verhältnis von Bauchfett zu Körpergewicht war bei den Mäusen mit *B. adolescentis* tendenziell höher als bei der Kontrollgruppe. Im Serum zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Insulinspiegels bei *B. adolescentis*-Mäusen, was ein Hinweis auf eine entwickelte Insulinresistenz ist. Bei den anderen ermittelten Blutwerten waren keine signifikanten Unterschiede messbar (Blutzucker, Triglyceride, Cholesterin und FFA). Der Cholesteringehalt in der Leber war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen, und auch die Expression des Rezeptors *Fiaf* in der Dünndarmwand der Tiere wurde nicht signifikant unterschiedlich exprimiert.

3T3-L1-Zellen wurden mit Überständen von Mode K-Zellen stimuliert, die zuvor mit *B. adolescentis* in unterschiedlicher MOI inkubiert wurden. Dabei zeigte sich die Tendenz, dass 3T3-L1-Zellen mit Überständen aus höherer *B. adolescentis*-MOI und mit den Supplementen Insulin, DEXA und IBMX besser ausdifferenzierten.

In beiden Versuchsarmen zeigte sich nur wenig bis keine Signifikanz. Sowohl bei den Versuchen mit Mäusen als auch mit Zellen kann die Ursache hierfür in der geringen Fallzahl liegen (Mäuse n=5, Zellen n=2). In der Literatur wurden oftmals signifikante Ergebnisse bei Tierversuchen erzielt, als mit gnotobiotischen Tieren gearbeitet wurde und in denen die Tiere mit einer *High Fat*-Diät gefüttert wurden. 3T3-L1-Zellen hätten womöglich auch direkt mit den Bifidobakterien inkubiert werden können. Der Umweg über die Herstellung von Überständen durch Inkubation mit Mode K-Zellen führte eventuell dazu, dass das Medium teilweise schon verbraucht war oder zu wenig Nährstoffe und zu viele Stoffwechselabfallprodukte enthielt. Zudem birgt die angewandte Auswertungsmethode (Auszählen der fotografierten Zellen) mögliche Fehlerquellen. Ein genaueres Ergebnis wäre durch andere Auswertungsmethoden, wie zum Beispiel die photometrische Messung, möglich gewesen.

Zusammenfassung

Für Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora spielen viele Einflussfaktoren wie zum Beispiel Umwelt, Genetik, Ernährung und Alter eine große Rolle. Die Ergebnisse vieler bisheriger Studien lassen vermuten, dass es eine Adipositas-assoziierte Darmflora gibt, und dass sie durch probiotische oder präbiotische Nahrungsergänzung moduliert werden kann. Da der Gebrauch von Probiotika für die Behandlung von Adipositas sehr komplex ist, sollten zukünftige Studien sich sowohl mit der effektiven Dosis der benutzten Probiotika als auch der Behandlung am Menschen befassen. Ein Großteil der bisher durchgeführten Experimente fand an Tieren statt. Es sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse sich auch auf den Menschen übertragen lassen. Darüber hinaus sollten die Studien über lange Zeit durchgeführt werden, um auch die Langzeiteffekte beobachten zu können.

Um nicht nur Patienten mit Adipositas, sondern auch untergewichtige Patienten behandeln zu können, sollten auch Probiotika, die gewichtssteigernde Effekte haben, untersucht werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die durchgeführten Interventionen keinen relevanten Einfluss auf den Stoffwechsel *in vivo* oder *in vitro* haben. Weitere Studien zu diesem Thema könnten unser Verständnis über die Physiologie und Pathophysiologie des Mikrobioms steigern und somit den Weg für die Behandlung der Adipositas und damit assoziierten Erkrankungen ebnen.

Möglicherweise sollten die Leitlinien über Adipositasbehandlung in naher Zukunft um die Probiotika- oder Präbiotikaeinnahme erweitert werden, da dieser Therapieansatz eine nebenwirkungsarme Alternative zur bisherigen medikamentösen oder chirurgischen Therapie bieten würde.

Die Hauptursachen für erhöhte Fettspeicherung, aus der Übergewicht und Adipositas folgen, bleiben jedoch weiterhin überhöhtes Nahrungsangebot und Bewegungsarmut. Deshalb wird die Basistherapie der Adipositas weiterhin aus Ernährungsumstellung und körperlichem Training sowie Verhaltensmodifikation bestehen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organisation (2000) "WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic". WHO Technical Report Series 894, Genf S. 6-15.
- 2 OECD (2010) Health at a Glance: Europe 2010. OECD Publishing, S. 72-73.
- 3 Owen J and Reisin E (2012) Non-communicable disease: a welcome and long needed addition to the WHO's 2012 World Health Statistics. *Curr Hypertens Rep* 14:475–477.
- 4 Tappy L and Le KA (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90:23–46.
- 5 Hauner H, Buchholz G, Hamann A, Husemann B, Koletzko B, Liebermeister H, Wabitsch M, Westenhöfer J, Wirth A and Wolfram G (2007) „Prävention und Therapie der Adipositas“ Version 2007. Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin, S. 6-21.
- 6 Duvnjak L and Duvnjak M (2009) The metabolic syndrome – An ongoing story. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60, Suppl 7, 19-24.
- 7 Everard A and Cani PD (2013) Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(1):73-83. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.007. Review.
- 8 Masi LN, Martins AR, Rosa Neto JC, do Amaral CL, Crisma AR, Vinolo MA, de Lima Junior EA, Hirabara SM and Curi R (2012) Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. *J Biomed Biotechnol*. doi:10.1155/2012/945131.
- 9 Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444(7122):1027-31.
- 10 Schmidt, Lang, Thews, (2005) "Physiologie des Menschen", S. 882-884, 29. Auflage Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 11 Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl, (2010) „Physiologie“, S. 454-489, 6. Auflage Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.

Literaturverzeichnis

- 12 Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann, (2012) „Duale Reihe – Biochemie“, S. 221-248, 3. Auflage Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- 13 Herdegen, (2008) “Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie”, S. 203-215, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- 14 Silbernagl, Despopoulos, (2012) “Taschenatlas Physiologie”, S. 266-268, 8. Auflage Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- 15 Boeck, Bommas-Ebert, Brandenburger, (2009) „Prüfungswissen Physikum“ S. 581, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- 16 Mead JR, Irvine SA and Ramji DP (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80:753–769.
- 17 Merkel M, Eckel RH and Goldberg IJ (2002) Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43:1997–2006.
- 18 Mead JR and Ramji DP (2002) The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 55:261–269.
- 19 Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G and Zechner R (2002) Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 13(5):471-81.
- 20 Greenwood MR. (1985) The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes; 9(Suppl 1):67-70.*
- 21 Pentikainen MO, Oksjoki R, Oorni K and Kovanen PT (2002) Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol;* 22:211-217.
- 22 Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL and Shulman GI (2001) Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA;* 98:7522-7527.
- 23 Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga JI, Ohashi K, Yazaki Y and Yamada N (1996) Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA;* 93:7242-7246.

Literaturverzeichnis

- 24 Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, Kitamine T, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Shionoiri F, Yahagi N, Gotoda T, Yazaki Y and Yamada N (1999) Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res*; 40:1677-1685.
- 25 Fan J, Unoki H, Kojima N, Sun H, Shimoyamada H, Deng H, Okazaki M, Shikama H, Yamada N and Watanabe T (2001) Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem*; 276:40071-40079.
- 26 Greenwood MR (1985) The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes*; 9(Suppl 1):67-70.
- 27 Borensztajn J. (1987) "Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase". S. 133-148, Borensztajn J, editor. *Lipoprotein lipase*. Chicago: Evener.
- 28 Nikkilä EA (1987) "Role of lipoprotein lipase in metabolic adaption to exercise and training". S. 187-199, Borensztajn J, editor. *Lipoprotein lipase*. Chicago: Evener.
- 29 Bergö M, Olivecrona G and Olivecrona T (1996) Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J*; 313 (Pt 3):893-8.
- 30 Greten, Rinninger and Greten (2010) „Innere Medizin“, S. 647-661, 13. Auflage Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- 31 Gehrlich S (1999) Common mutations of the lipoprotein lipase gene and their clinical significance. *Curr Atheroscler Rep*; 1:70-78.
- 32 Horton, Moran and Biele (2008) „Biochemie“, S. 643-696, 4. Auflage Pearson Studium Verlag München.
- 33 Wirth and Hauner (2013) „Adipositas“ S. 68-76, 4. Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 34 Georg Löffler (2008) „Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie“, S. 91-134, 7. Auflage Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 35 Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Müller M and Kersten S. (2005) The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*; 281(2):934-44.

Literaturverzeichnis

- 36 Schäffler A, Schölmerich J and Salzberger B (2007) Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol*;28(9):393-9.
- 37 A. Schäffler, Müller-Ladner U, Schölmerich J and Büchler C (2006) Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases, *Endocr. Rev.* **27** S. 449–467.
- 38 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF and Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*, vol. 101, no. 44
- 39 Schulze, Sonnenborn, Ölschläger and Kruis. (2008) „Probiotika“, S. 4-17, S. 24f., Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- 40 Cummings JH, Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism, *Clinical nutrition* 16:3-11, 1997
- 41 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA and Gordon JI (2005) Host bacterial Mutualism in the human intestine. *SCIENCE* Vol 307, Page 1915.
- 42 Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD and Gordon JI (2005) Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307, 1955–1959
- 43 Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Kubota H, Gawad A, Sakai T, Oishi K, Martin R, Ben-Amor K, Knol J and Tanaka R (2013) Mother-to-Infant Transmission of Intestinal Bifidobacterial Strains Has an Impact on the Early Development of Vaginally Delivered Infant's Microbiota. *PLoS One*;8(11):e78331. doi: 10.1371/journal.pone.0078331.
- 44 Di Gioia D, Aloisio I, Mazzola G and Biavati B (2013) Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- 45 Bixquert Jiménez M (2009) Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? *Rev Esp Enferm Dig*;101(8):553-64.
- 46 Rolle and Mayr (2007) „Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre“, S. 344f., 8. Auflage Enke Verlag Stuttgart.
- 47 Shroff KE, Meslin K and Cebra JJ (1995) Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun*;63:3904-3913.

Literaturverzeichnis

- 48 Gibson GR and Wang X (1994) Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* ;77:412-420.
- 49 Card T, Logan RF, Rodrigues LC and Wheeler JG (2004) Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 53, 246-250.
- 50 Ekblom A and Montgomery SM (2004) Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 497-508.
- 51 Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, and Shroff KE (1998) Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev. Immunol.* 6, 13-18.
- 52 Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V. and Gordon, J.I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* 4, 269-273 (2003).
- 53 Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., & Kasper, D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107-118 (2005).
- 54 Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD and Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11070-11075.
- 55 Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, and Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- 56 Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, Coutinho PM, Minx P, Latreille P, Cordum H, Van Brunt A, Kim K, Fulton RS, Fulton LA, Clifton SW, Wilson RK, Knight RD and Gordon JI (2007) Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS. Biol.* 5, e156.
- 57 Hooper LV, Midtvedt T and Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283-307.
- 58 Kraehenbuhl JP and Corbett M (2004) Immunology. Keeping the gut microflora at bay. *Science* 303, 1624-1625.
- 59 Goeser F (2012) Mikrobiomforschung: Wie körpereigene Keime als „Superorgan“ agieren. *Dtsch Arztebl* 2012; 109(25): A-1317 / B-1140 / C-1120

- 60 Yazdi AS (2012) Hautbakterien steuern die Immunantwort. *Der Hautarzt*. Volume 63, Issue 12, S. 985-987 Springer.
- 61 Stoneking M (2011) What we can learn from spit: Diversity in the human salivary microbiome. *Forschungsbericht 2011 - Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie*.
- 62 Turnbaugh PJ, Ley R, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R and Gordon JI (2007) The Human Microbiome Project. *NATURE* Vol 449 doi:10.1038/nature06244
- 63 Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, Patel S, Cutting M, Madden T, Hamilton H, Harris E, Gevers D, Simone G, McInnes P and Versalovic J (2013) The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J.* (3):1012-22. doi: 10.1096/fj.12-220806. Epub 2012 Nov 19.
- 64 Vindigni SM, Broussard EK and Surawicz CM (2013) Alteration of the intestinal microbiome: fecal microbiota transplant and probiotics for *Clostridium difficile* and beyond. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* ;7(7):615-28. doi: 10.1586/17474124.2013.832501.
- 65 Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R and Gordon JI (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484.
- 66 Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, and Leclerc M (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11, 2574–2584.
- 67 Kahn SE, Hull RL and Utzschneider KM. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* ;444(7121):840-6. Review.
- 68 Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF and Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:979–984.
- 69 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC and Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, S. 1761–1772.

- 70 J. Shen, M.S. Obin and L. Zhao (2013) The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 34, S. 39–58.
- 71 Everard A and Cani PD. (2013) Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* (1):73-83. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.007. Review.
- 72 Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC and Xu J (2010) Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 61, pp. 69–78.
- 73 Schwiertz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C and Hardt PD (2010) Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (SilverSpring)*, 18, S. 190–195.
- 74 Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, Corthier G, Doré J, Henegar C, Rizkalla S and Clément K (2010) Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, S. 3049–3057.
- 75 O'Mahony D, Murphy S, Boileau T, Park J, O'Brien F, Groeger D, Konieczna P, Ziegler M, Scully P, Shanahan F, Kiely B and O'Mahony L (2010) *Bifidobacterium animalis* AHC7 protects against pathogen-induced NF-kappaB activation in vivo. *BMC Immuno* 11, p. 63.
- 76 Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S and Isolauri E (2008) Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* 87, S. 534–538.
- 77 Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GM, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J and Cani PD (2011) Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60, S. 2775–2786.
- 78 Gibson GR, Beatty ER, Wang X and Cummings JH (1995) Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin. *Gastroenterology* ;108(4):975-82.
- 79 Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR and Delzenne NM (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*; 50: 2374–2383.

Literaturverzeichnis

- 80 Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM and Burcelin R (2006) Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by Oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55, 1484–1490.
- 81 Neyrinck AM, Van Hee VF, Piront N, De Backer F, Toussaint O, Cani PD and Delzenne NM. (2012) Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes* ;2:e28.
- 82 Cani PD, Neyrinck AM, Maton N and Delzenne NM. (2005) Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res* ;13:1000–7.
- 83 Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG and Delzenne NM (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* ; 58: 1091–1103.
- 84 Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, Catry E, Neyrinck AM, Dewulf EM, Sohet FM, Portois L, Clerbaux LA, Carpentier YA, Possemiers S, Bommer GT, Cani PD and Delzenne NM (2013) Prebiotic approach alleviates hepatic steatosis: Implication of fatty acid oxidative and cholesterol synthesis pathways. *Mol Nutr Food Res* ;57:347–59.
- 85 Cani PD, Dewever C and Delzenne NM (2004) Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr* ;92:521–6.
- 86 Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J and Bäckhed F. (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. ;498(7452):99-103.
- 87 Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K and Wang J. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.

Literaturverzeichnis

- 88 Teitelbaum JE and Walker WA (2002) Nutritional Impact of pre- and probiotics as protektive gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*. Vol.22: 107-138.
- 89 Ge H, Cha JY, Gopal H, Harp C, Yu X, Repa JJ and Li C (2005) Differential regulation and properties of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *J Lipid Res.*;46(7):1484-90.
- 90 Kersten S, Lichtenstein L, Steenbergen E, Mudde K, Hendriks HF, Hesselink MK, Schrauwen P and Müller M (2009) Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 969–974.
- 91 Dutton S and Trayhurn P (2008) Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (ANGPTL4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Br J Nutr* 100: 18–26.
- 92 Murata M, Yudo K, Nakamura H, Chiba J, Okamoto K, Suematsu N, Nishioka K, Beppu M, Inoue K, Kato T and Masuko K (2009) Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *J Orthop Res* 27: 50–57.
- 93 Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, Xu JY, Chen B, Chow WS, Tso AW and Lam KS (2005) Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;102(17):6086-91.
- 94 Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J, Philippe J, Sibony M, Gasc JM, Corvol P and Germain S (2003) Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *American Journal of Pathology*; 162:1521-1528.
- 95 Stapleton CM, Joo JH, Kim YS, Liao G, Panettieri RA Jr and Jetten AM (2010) Induction of ANGPTL4 expression in human airway smooth muscle cells by PMA through activation of PKC and MAPK pathways. *Exp Cell Res* 316: 507–516.
- 96 Galaup A, Cazes A, Le Jan S, Philippe J, Connault E, Le Coz E, Mekid H, Mir LM, Opolon P, Corvol P, Monnot C and Germain S (2006) Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18721–18726.

Literaturverzeichnis

- 97 Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, and Massague J (2008) TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietinlike 4. *Cell* 133: 66–77.
- 98 Verine J, Lehmann-Che J, Soliman H, Feugeas JP, Vidal JS, Mongiat-Artus P, Belhadj S, Philippe J, Lesage M, Wittmer E, Chanel S, Couvelard A, Ferlicot S, Rioux-Leclercq N, Vignaud JM, Janin A and Germain S (2010) Determination of angptl4 mRNA as a diagnostic marker of primary and metastatic clear cell renal-cell carcinoma. *PLoS ONE* 5: e10421.
- 99 Zandbergen F, van Dijk S, and Kersten S (2006) Fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4: a potential target for dyslipidemia? *Future Lipidol* 1: 227– 236.
- 100 Koliwad SK, Kuo T, Shipp LE, Gray NE, Backhed F, So AY, Farese RV Jr and Wang JC (2009) Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4/FIAF) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *J Biol Chem* 284: 25593–25601.
- 101 Lichtenstein L, and Kersten S (2010) Modulation of plasma TG lipolysis by angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1801: 415– 420.
- 102 Goh YY, Pal M, Chong HC, Zhu P, Tan MJ, Punugu L, Tan CK, Huang RL, Sze SK, Tang MB, Ding JL, Kersten S and Tan NS (2010) Angiopoietin-like 4 interacts with matrix proteins to modulate wound healing. *J. Biol. Chem.* 285(43),332999–33009.
- 103 Kim HK, Youn BS, Shin MS, Namkoong C, Park KH, Baik JH, Kim JB, Park JY, Lee KU, Kim YB and Kim MS (2010) Hypothalamic ANGPTL4/Fiaf is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes* 59(11), 2772–2780.
- 104 Grootaert C, Van de Wiele T, Verstraete W, Bracke M and Vanhoecke B (2012) Angiopoietin-like Protein 4: Health Effects, Modulating Agents and Structure-function Relationships. *Expert Rev Proteomics* ;9(2):181-99. doi: 10.1586/epr.12.12.
- 105 Jia W, Li H, Zhao L and Nicholson JK (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* ; 7(2):123-9.
- 106 Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S and Blaut M (2010) Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr* 104: 919–929.

Literaturverzeichnis

- 107 Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ and Brummer JR (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 104–119.
- 108 Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, Macchi V, D'Incà R, Scarpa M, Palù G, Sturniolo GC, Morelli L and Castagliuolo I. (2008) *Lactobacillus crispatus* M247-derived H₂O₂ acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor γ in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 135: 1216–1227.
- 109 Belanger AJ, Lu HW, Date L, Liu LX, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ and Jiang CW (2002) Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: Role of hypoxia inducible factor 1 alpha. *JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY*; 34 (7) S. 765-774.
- 110 Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K, Matsumoto S, Sugano S, Tanihara H, Masuho Y, and Suda T (2003) Inhibition of Angiogenesis and Vascular Leakiness by Angiopoietin-Related Protein 4. *Cancer Res.* 63, 6651-6657.
- 111 Ramirez-Zacarias JL, Castro-Mufiozledo F and Kuri-Harcuch W (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* 97(6):493-7.
- 112 Vidal K, Grosjean I, Evillard JP, Gespach C and Kaiserlian D (1993) Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE K cell line. *J Immunol Methods.* 166 (1):63-73.
- 113 El-Semman IE, Karlsson FH, Shoaie S, Nookaew I, Soliman TH and Nielsen J (2014) Genome-scale metabolic reconstructions of *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 and *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 and their interaction. *BMC Syst Biol* 8(1):41. doi: 10.1186/1752-0509-8-41.
- 114 Groß (2006) "Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie", S 57-58, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 115 Sartor RB (2005) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21, 44-50.
- 116 Adam B, Liebrechts T and Holtmann G (2006) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia Coli* NISSLE 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Z. Gastroenterol.* 44, 267-269.

Literaturverzeichnis

- 117 Kruis W, Schreiber S, Theuer D, Brandes JW, Schütz E, Howaldt S, Krakamp B, Hämling J, Mönnikes H, Koop I, Stolte M, Pallant D and Ewald U (2001) Low dose balsalazide (1.5 g twice daily) and mesalazine (0.5 g three times daily) maintained remission of ulcerative colitis but high dose balsalazide (3.0 g twice daily) was superior in preventing relapses. *Gut* 49, S. 783-789.
- 118 Malchow HA (1997) Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J. Clin. Gastroenterol.* 25, S. 653-658.
- 119 Mollenbrink M and Bruckschen E (1994) Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* NISSLE 1917 strain (Mutaflor). *Med. Klin. (Munich)* 89, S. 587-593.
- 120 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, and Axon AT (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639.
- 121 Lodinova-Zadnikova R and Sonnenborn U. Effect of preventive administration of a non-pathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol. Neonate* 71, 224-232.
- 122 Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, Lehr HA, Schubert S, Dobrindt U, Loeffler J, Bohn E and Autenrieth IB (2003) *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 125, 162-177.
- 123 Fink, Kerstin: Intestinale kommensale Bakterien als potentielle Inhibitoren oder Aktivatoren einer CD4+ T-Zell-induzierten Kolitis in Rag1^{-/-} Mäusen. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2008.
- 124 Schmitz S (2011) „Der Experimentator – Zellkultur“ S. 87-102, 3. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg / Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 125 Lindl T (2013) „Zell- und Gewebekultur“ S. 53-14, 7. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg / Springer Medizin Verlag.
- 126 Shao D and Lazar MA (1997) Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell

- cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 272(34):21473-8.
- 127 Lillie R.D. und Fullmer H.M. (1976) "Histopathologic Technic and Practical Histochemistry". S. 559-610, McGraw-Hill New York.
- 128 Kaoutari AE, Armougom F, Gordon JI, Raoult D and Henrissat B (2013) The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 11:497–504.
- 129 Samuel BS and Gordon JI (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10011–10016.
- 130 Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M and Gordon JI (2008) Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16767–16772.
- 131 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808.
- 132 Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J and Shoelson SE (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183–190.
- 133 Aggarwal J, Swami G and Kumar M (2013) Probiotics and their effects on metabolic diseases: an update. *J Clin Diagn Res* 7:173–177.
- 134 Blaut M and Bischoff SC (2010) Probiotics and obesity. *Ann Nutr Meta ;57(suppl 1):20–23.*
- 135 Lee BH, Lo YH and Pan TM (2013) Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *J Funct Foods* 5:905–913.
- 136 Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M and Tsuchida T (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 64:636–643.
- 137 Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, Odamaki T, Takahashi S, Sugahara H, Yaeshima T, Iwatsuki K, Kamei A and Abe K (2010) Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a

Literaturverzeichnis

- mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1656–166.
- 138 Takemura N, Okubo T and Sonoyama K (2010) *Lactobacillus plantarum* strain no. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med* (Maywood) 235:849–856.
- 139 Yadav H, Lee JH, Lloyd J, Walter P and Rane SG (2013) Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate induced GLP-1 secretion. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M113.452516.
- 140 Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY and Park HO (2013) Antiobesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One* 8:e54617.
- 141 Park DY, Ahn YT, Park SH, Huh CS, Yoo SR, Yu R, Sung MK, McGregor RA and Choi MS (2013) Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One* 8:e59470.
- 142 Tsai YT, Cheng PC and Pan TM. (2013) Anti-obesity effects of gut microbiota are associated with lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-013-5346-3.
- 143 Yin YN, Yu QF, Fu N, Liu XW and Lu FG (2010) Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol* 16:3394–3401.
- 144 Sakai T, Taki T, Nakamoto A, Shuto E, Tsutsumi R, Toshimitsu T, Makino S and Ikegami S (2013) *Lactobacillus plantarum* OLL2712 regulates glucose metabolism in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 59:144–147.
- 145 Arora T, Anastasovska J, Gibson G, Tuohy K, Sharma RK, Bell J and Frost G (2012) Effect of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 13 Supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 108:1382–1389.
- 146 Jinjin Chen, Ren Wang, Xiao-Fang Li and Rui-Liang Wang (2012) *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 107: 1429–1434.
- 147 Wu J, Wang X, Cai W, Hong L and Tang Q (2010) *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates parenteral nutrition-induced liver injury in infant rabbits. *Dig Dis Sci* 55, 2814–2820.

- 148 Cani P1, Daubioul CA, Reusens B, Remacle C, Catillon G and Delzenne NM (2005) Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1 (7–36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J Endocrinol* 185, 457–465.
- 149 Choi I, Kim Y, Park Y, Seog H and Choi H (2007) Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *Biofactors* 29:105–112.
- 150 Kim NH, Moon PD, Kim SJ, Choi IY, An HJ, Myung NY, Jeong HJ, Um JY, Hong SH and Kim HM (2008) Lipid profile lowering effect of Soypro fermented with lactic acid bacteria isolated from Kimchi in high-fat diet-induced obese rats. *Biofactors* 33:49–60.
- 151 Lee EC, Desai U, Gololobov G, Hong S, Feng X, Yu XC, Gay J, Wilganowski N, Gao C, Du LL, Chen J, Hu Y, Zhao S, Kirkpatrick L, Schneider M, Zambrowicz BP, Landes G, Powell DR and Sonnenburg WK (2009) Identification of a new functional domain in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *J Biol Chem* 284: 13735–13745.
- 152 Shan L, Yu XC, Liu Z, Hu Y, Sturgis LT, Miranda ML and Liu Q (2009) The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 284: 1419–1424.
- 153 Lichtenstein L, Berbée JF, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A, Kema IP, Voshol PJ, Müller M, Rensen PC and Kersten S (2007) ANGPTL4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2420–2427.
- 154 Aronsson L, Huang Y, Parini P, Korach-André M, Håkansson J, Gustafsson JÅ, Pettersson S, Arulampalam V and Rafter J (2010) Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS ONE* 5: e13078.
- 155 Grootaert C, Van de Wiele T, Van Roosbroeck I, Possemiers S, Vercoutter-Edouart AS, Verstraete W, Bracke M and Vanhooecke B (2011) Bacterial monocultures, propionate, butyrate and H₂ O₂ modulate the expression, secretion and structure of the fasting-induced adipose factor in gut epithelial cell lines. *Environ Microbiol* 13: 1778–1789. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02482.x.

Literaturverzeichnis

- 156 Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C and Flint HJ. (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Apr;66(4):1654-61.
- 157 Arunachalam and Kantha D (1999) "The Role of Bifidobacteria in Nutrition, Medicine, and Technology" S. 1559-1597, *Nutrition Research*. Vol 19, No. 10, Elsevier Science Inc., USA.
- 158 Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE and Flint HJ (2006) Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* ;72(5):3593-9.
- 159 Kaur N and Gupta AK (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* ;27(7):703-14.
- 160 Park DY, Ahn YT, Huh CS, Jeon SM and Choi MS (2011) The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* KY1032 cell extract on the adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *J Med Food* ;14(6):670-5. doi: 10.1089/jmf.2010.1355.

7. Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption und Betreuung der Studie erfolgte durch Frau Professor Dr. Julia-Stefanie Frick, Stellvertretende Ärztliche Direktorin der Medizinischen Mikrobiologie, Tübingen.

Der Vorversuch wurde durch Frau Frauke Effinger durchgeführt, und die ermittelten Daten zu meiner Verfügung gestellt.

Die anderen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Frauke Effinger von mir teils eigenständig und teils in Zusammenarbeit mit ihr durchgeführt.

Die quantitative *real time* PCR wurde durch Frau Frauke Effinger durchgeführt.

Die Serum- und Gewebeanalysen erfolgten durch Herrn PD Dr. Andreas Peter, Medizinische Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen, Zentrallabor.

Das Fotografieren und Bearbeiten der Mausebilder erfolgte durch Frau Dr. Monika Schütz.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Danksagung

8. Danksagung

Mein Dank geht an:

Professor Dr. Julia-Stefanie Frick für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und Arbeitsplatzes sowie für ihre kompetente Anleitung.

Professor Dr. Stephan C. Bischoff für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Professor Dr. Harald Staiger, Medizinische Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen, für die hilfreichen Anregungen und Tipps bezüglich der 3T3-L1-Adipozyten-Stimulation.

PD Dr. med. Andreas Peter, Medizinische Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen, für die Durchführung der Serum- und Gewebeanalysen.

Frauke Effinger für die professionelle und fröhliche Einführung in sämtliche Arbeiten mit Bakterien und Zellkulturen sowie für die Durchführung der Vorversuche.

Monika Schütz für das Fotografieren und Bearbeiten der Mausebilder.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kolitis (Kerstin, Alex, Frauke, Julia, Jule, Alex, Ute), für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für die gute und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Meinen Freunden für ihre Unterstützung und Aufmunterungen, insbesondere Danke an Kristian fürs Korrekturlesen.

Matthias dafür, dass er ein toller Bruder ist.

Bernd für seine Liebe, seine unermüdliche Unterstützung und Motivation sowie wiederholtes Korrekturlesen.