

# **Transepitheliale Stimulation humaner Leukozyten durch Bakterien und ihre Oberflächenbestandteile**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

**Institut für  
Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft  
Fachgebiet Ernährungsphysiologie**

vorgelegt von  
Annette Bäuerlein (geb. Grünefeld)

aus Nürnberg

2007

Dekan:	Prof. Dr. H. Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. A. Parlesak
2. berichtende Person:	Prof. Dr. H. Schmidt
3. Prüfer:	Prof. Dr. Ch. Bode
Eingereicht am:	16.05.2007
Mündliche Prüfung am	12.09.2007

Die vorliegende Arbeit wurde am 12.07.2007 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

**Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

**Haller D, L Holt, A Parlesak, J Zanga, A Bauerlein, RB Sartor, C Jobin.** Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor-kappaB activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells. *Immunology*. 2004 Jun;112(2):310-20.

**Parlesak A, D Haller, S Brinz, A Baeuerlein, C Bode.** Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand. J. Immunol.* 2004 Nov;60(5):477-85.



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Gastrointestinaltrakt.....	2
1.2 Abwehrmechanismen.....	2
1.2.1 Nichtimmunologische Abwehrmechanismen.....	3
1.2.2 Das darmassoziierte Immunsystem.....	4
1.2.2.1 Aufgaben des darmassoziierten Immunsystems.....	4
1.2.2.2 Funktionsweise des darmassoziierten Immunsystems .....	5
1.3 Zytokinnetzwerk.....	7
1.3.1 TNF- $\alpha$ .....	8
1.3.2 IL-8.....	9
1.3.3 IL-6.....	10
1.3.4 IL-10.....	11
1.3.5 IFN- $\gamma$ .....	12
1.4 Effekte der Mikroflora und probiotische Bakterien im menschlichen Gastrointestinaltrakt.....	13
1.4.1 Mikroflora.....	13
1.4.2 Probiotische Bakterien .....	14
1.5 Bakterielle Zellwandbestandteile.....	22
1.5.1 Lipopolysaccharide (LPS) .....	22
1.5.1.1 Wirkmechanismen von Endotoxinen .....	22
1.5.1.2 Struktur des LPS.....	24
1.5.2 Lipoteichonsäure (LTA) .....	29
1.6 Stimulationswege an der Mucosa .....	30
<b>2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1 Material .....	37
3.1.1 Chemikalien .....	37
3.1.2 Biologische Materialien .....	40
3.1.3 Geräte .....	41
3.1.4 Software.....	42

<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>43</b>
3.2.1	Bakterien .....	43
3.2.1.1	Anzucht und Lagerung .....	43
3.2.1.2	Ermittlung der Keimzahl bei entsprechender optischer Dichte .....	44
3.2.1.3	Einstellen der Keimzahl auf $1 \times 10^8$ KBE zur Stimulation im Kokulturmodell ..	45
3.2.2	LPS .....	46
3.2.2.1	Isolation.....	46
3.2.2.2	Lösen und Einsetzen im Versuch .....	47
3.2.2.3	SDS-PAGE Gelelektrophorese .....	47
3.2.2.4	Endotoxinmessung im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) .....	51
3.2.2.5	Die Quantifizierung des Lipid A-Gehaltes verschiedener Endotoxine .....	53
3.2.2.5.1	Ummethylierung .....	53
3.2.2.5.2	Derivatisierung .....	55
3.2.3	Zellkultur .....	56
3.2.3.1	Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	56
3.2.3.2	Zellzahlbestimmung .....	57
3.2.3.3	CaCo-2-Zellen.....	57
3.2.3.3.1	Kultivieren und Passagieren von CaCo-2-Zellen .....	57
3.2.3.3.2	Kultivieren von CaCo-2-Zellen auf Inserts.....	57
3.2.3.4	Isolation peripher-venöser mononukleärer Leukozyten aus Buffy Coats mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	58
3.2.4	Stimulationsversuche .....	58
3.2.4.1	Kokulturmodell.....	58
3.2.4.1.1	Stimulantien und Endotoxinbindende Substanzen im Kokulturmodell.....	58
3.2.4.1.2	Durchführung des Kokulturmodells.....	61
3.2.4.2	Direktstimulation.....	62
3.2.4.2.1	Stimulantien der Direktstimulation.....	62
3.2.4.2.2	Durchführung der Direktstimulation.....	62
3.2.5	Methoden zur Integritätskontrolle der CaCo-2-Zellschicht .....	63
3.2.5.1	Bestimmung des Transepithelialen Widerstands TEER .....	63
3.2.5.2	Messung der Fluorescein-Dextran Permeabilität.....	63
3.2.6	Methoden zur Zytokinmessung .....	64
3.2.6.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	64
3.2.6.2	RT-Polymerase Chain Reaktion (RT-PCR).....	66
3.2.7	Statistische Auswertung .....	71
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Adaptation der Enterozyten und Leukozyten in Kokultur vor der Stimulation.....</b>	<b>73</b>
4.1.1	Kontrolle der Integrität der Zellschicht im Verlauf des Versuchs.....	73
4.1.2	Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment.....	74
<b>4.2</b>	<b>Stimulationspotentiale probiotischer und kommensaler Bakterien in Enterozyten-Leukozyten-Kokulturen.....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Integrität der CaCo-2-Zellmonolayer .....	78
4.2.2	Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment.....	81

<b>4.3</b>	<b>Der Einfluss des gram-negativen probiotischen <i>E. coli</i> Nissle im Kokulturmodell im Vergleich zum nichtpathogenen <i>E. coli</i> K12 und dem enteropathogenen <i>E. coli</i> EPEC.....</b>	<b>89</b>
4.3.1	Integrität der CaCo-2-Zellschicht.....	89
4.3.2	Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment.....	91
<b>4.4</b>	<b>Sind die immunstimulierenden Eigenschaften von Bakterien im Kokulturmodell auf definierte Membranbestandteile zurückzuführen? .....</b>	<b>97</b>
4.4.1	Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von Bakterien und deren Membranbestandteilen.....	97
4.4.1.1	Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von <i>E. coli</i> K12 und dessen LPS.....	97
4.4.1.2	Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von <i>B. vulgatus</i> und dessen LPS.....	99
4.4.1.3	Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von <i>B. vulgatus</i> MPK und dessen LPS.....	103
4.4.1.4	Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von <i>E. faecalis</i> und dessen LTA.....	105
4.4.2	Inhibierung der durch <i>E. coli</i> K12 LPS verursachten Zytokinausschüttung durch LPS bindende Peptide.....	107
4.4.2.1	Inhibierung der Zytokinausschüttung mittels Polymyxin.....	107
4.4.2.2	Inhibierung der Zytokinausschüttung mittels Colistin .....	109
<b>4.5</b>	<b>Untersuchungen zur Abhängigkeit der Stimulationsfähigkeit verschiedener Endotoxine von der Struktur des Lipid A und der mittleren Molmasse.....</b>	<b>111</b>
4.5.1	Bioaktivität verschiedener Endotoxine .....	111
4.5.2	SDS-PAGE .....	113
4.5.3	Die Quantifizierung des Lipid A-Anteils verschiedener Endotoxine.....	114
<b>4.6</b>	<b>Weg der Aktivierung im Kokulturmodell - vermitteln Enterozyten die Aktivierung von kokultivierten Lymphozyten?.....</b>	<b>117</b>
4.6.1	Vergleich der im Kokulturmodell durch apikale Stimulation induzierten Zytokinantwort mit der, durch direkte Stimulation von Lymphozyten induzierten Zytokinausschüttung.....	117
4.6.1.1	Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von <i>E. coli</i> K12 .....	118
4.6.1.2	Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von <i>B. vulgatus</i> .....	119
4.6.1.3	Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von <i>B. vulgatus</i> MPK .....	121
4.6.2	Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS durch basolaterale Zugabe von LPS bindenden Peptiden.....	123
4.6.2.1	Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS mit Hilfe von Polymyxin.....	123
4.6.2.2	Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS mit Hilfe von Colistin.....	124
4.6.3	Reihenfolge der Stimulation im Kokulturmodell.....	125

<b>4.7</b>	<b>Lässt sich eine Stimulation durch nicht stimulierende Bakterien oder deren Endotoxine verringern? .....</b>	<b>127</b>
4.7.1	Inhibierung der von <i>E. coli</i> K12 induzierten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden Bakterien.....	127
4.7.1.1	Kostimulation von <i>E. coli</i> K12 mit <i>B. bifidum</i> .....	127
4.7.1.2	Kostimulation von <i>E. coli</i> K12 mit <i>B. vulgatus</i> .....	128
4.7.1.3	Kostimulation von <i>E. coli</i> K12 mit <i>Lb. rhamnosus</i> GG .....	130
4.7.2	Inhibierung der von <i>E. coli</i> K12 LPS induzierten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden LPS .....	131
4.7.2.1	Kostimulation von <i>E. coli</i> K12 LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen an <i>B. vulgatus</i> MPK LPS .....	131
4.7.2.2	Kostimulation von <i>E. coli</i> K12 LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen an <i>B. vulgatus</i> LPS.....	132
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>135</b>
5.1	Adaptation der Enterozyten und Leukozyten in Kokultur vor der Stimulation.....	135
5.2	Stimulationspotentiale probiotischer und kommensaler Bakterien in einer Enterozyten-Leukozyten-Kokultur .....	136
5.3	Stimulationspotentiale verschiedener <i>E. coli</i> sp. im Kokulturmodell .....	142
5.4	Membranbestandteile als Ursache der Immunstimulation.....	144
5.5	Vergleich der immunologischen Bioaktivität des LPS der <i>Bacteroides</i> sp. mit der von <i>E. coli</i> K12 bzw. <i>S. Typhimurium</i> .....	147
5.6	Weg der Aktivierung im Kokulturmodell - vermitteln Enterozyten die Aktivierung von kokultivierten Lymphozyten?.....	150
5.7	Inhibierung der durch <i>E. coli</i> K12 verursachten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden Bakterien.....	152
5.8	Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften des gram-negativen <i>E. coli</i> Nissle und der gram-positiven probiotischen Bakterien.....	154
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>156</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>181</b>
	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>183</b>



## Abkürzungsverzeichnis

3-OH-FS-EE	3-Hydroxy-Fettsäure-Ethylester
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BALT	Bronchial associated lymphoid tissue
<i>B. bifidum</i>	<i>Bifidobakterium bifidum</i>
BC	Buffy Coat
BHI	Hirn-Herz-Bouillon
bp	Base pair
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
CaCo-2	Colon adenocarcinoma cells
CD14	LPS-bindender Oberflächenrezeptor
cDNA	CopyDNA
CMM	Cooked Meat Medium
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CpG	Deoxycytidylate-phosphate-deoxyguanylate
DAG	Diacylglycerin
dd H <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAE	Follikelassoziertes Epithel
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GALT	Gut-Associated Lymphoid tissue (Darm-assoziertes Immunsystem)
GlcN	N-Acetyl-D-Glucosamin
GM-CSF	Granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IBD	Inflammatory bowel disease
IEC	Intestinal epithelial cells
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
InsP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IP-10	Interferon inducible protein 10
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LABIP	Lactic Acid Bacteria Industrial Platform
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
LTA	Lipoteichonsäure

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MALT	Mucosa associated lymphoic tissue
MAPK	Mitogen aktiviertes Proteinkinase System
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MLK	Mesenteriale Lymphknoten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
NEAS	Non-essential amino acids (Nicht-essentielle Aminosäuren)
NK	Natürliche Killerzellen
NOD	Non toll like
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAMP	Pathogen associated pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PP	Payersche Plaques
PPAR $\gamma$	Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptor gamma
PRR	Pattern recognition receptor
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT- PCR	Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sp.	Subspezies
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha

## Zusammenfassung

*Hintergrund:* Die Mucosa des Gastrointestinaltrakts spielt eine entscheidende Rolle bei der Unterscheidung von pathogenen und nichtpathogenen Bakterien und ist an der Vermittlung der systemischen Immunantwort beteiligt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung probiotischer, kommensaler, pathogener und lebensmitteloriginärer Bakterien und deren Oberflächenbestandteilen auf kokultivierte Enterozyten und Lymphozyten untersucht. Dabei war insbesondere die immunologische Reaktion, deren Ursachen, sowie die Reihenfolge der Aktivierung der Epithelzellen und darunter lokalisierten Leukozyten von Bedeutung.

*Material und Methoden:* PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) wurden transepithelial in CaCo-2-Zell/PBMC Kokulturen und direkt mit kommensalen, probiotischen und enteropathogenen Bakterien sowie Zellwandbestandteilen von gram-negativen und gram-positiven Bakterien stimuliert. Die Expression der inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  wurde mittels enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Die Messung des Quotienten aus IL-8/18S mRNA erfolgte mit Hilfe einer quantitativen reversen Transkriptions PCR (qRT-PCR). Das transepithelial permeierte Endotoxin wurde mit dem Limulus-Amochozyte-Test (LAL-Test) gemessen und die Integrität der CaCo-2-Zellmonolayer wurde mit Fluorescein-Dextran und der Messung des transepithelialen Widerstands (TEER) bestimmt.

*Ergebnisse:* Gram-positive probiotische Bakterien führen nicht zu einer signifikanten Aktivierung immunkompetenter Zellen, während der Zusatz des gram-negativen, probiotischen *E. coli* Nissle, eine stärkere Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  zur Folge hat als der des enteropathogenen *E. coli* EPEC. Die Klassifizierung der Bakterien als „probiotisch“ war nicht mit ihrer Fähigkeit assoziiert, die Bildung inflammatorischer Zytokine zu induzieren. Permeabilitätsunterschiede waren gleichfalls nicht prinzipiell mit einer erhöhten Aktivierung basolateraler Leukozyten assoziiert. So war sowohl bei direkter Stimulation als auch bei transepithelialer Stimulation keine Aktivierung durch Lipoteichonsäure (LTA) von *E. faecalis* messbar, während der Zusatz von Endotoxinen in Abhängigkeit von ihrem strukturellen Aufbau eine geringe (*Bacteroides* sp.) bis extrem starke (*E. coli* K12, *E. coli* Nissle, *S. Typhimurium*) Aktivierung immunkompetenter Zellen zur Folge hatten. Eine basolaterale Hemmung der Aktivität des LPS durch Polymyxin B und Colistin konnte die durch LPS von *E. coli* K12 induzierte Aktivierung fast vollständig inhibieren. Außerdem wurde durch direkte Stimulation mit der entsprechenden Menge des

im Kokulturmodell permeierenden Endotoxins eine vergleichbare Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie bei transepithelialer Stimulation bewirkt. Eine Hemmung der durch *E. coli* K12 bzw. LPS von *E. coli* K12 hervorgerufenen Aktivierung immunkompetenter Zellen durch die probiotischen Bakterien *Lb. rhamnosus* und *B. bifidum* sowie den Kommensalen *B. vulgatus* konnte nicht gemessen werden. Bei Kostimulation mit den Endotoxinen von *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK war mit zunehmender Konzentration des Endotoxins ein Trend zu einer Hemmung der *E. coli* K12-LPS-induzierten Zytokinausschüttung messbar.

*Schlussfolgerung:* Diese Ergebnisse belegen, dass die Wirkung von probiotischen Bakterien nicht zwingend mit einer Aktivierung immunkompetenter Zellen in der Mucosa assoziiert ist. Die Fähigkeit zu stimulieren hängt vorrangig von der Gegenwart von Endotoxin ab, wobei die Endotoxinstruktur ausschlaggebend für das jeweilige Stimulationspotential ist. Die Aktivierung von kokultivierten Enterozyten und Leukozyten erfolgt nicht über eine mittelbare Stimulation der Leukozyten via Enterozyten sondern primär über die Aktivierung basolateraler Lymphozyten durch permeierendes Endotoxin. Die Permeabilität der Epithelzellschicht ist nur dann entscheidend für den Grad der Aktivierung, sofern die permeierenden Endotoxine aufgrund ihrer strukturellen Gegebenheiten stimulierend wirksam sind.

## Summary

*Background:* The intestinal mucosa plays an important role in the discrimination of immune response between pathogenic and non-pathogenic bacteria as well as in mediating the systemic immunity. To address the question whether probiotic, commensal, pathogenic germs and bacteria of food origin as well as their membrane components modify the immune response of the intestinal mucosa, we co-cultivated enterocyte-like CaCo-2 cells with human blood leucocytes in transwell cultures. Of further interest was the sequence of enterocyte-leukocyte activation.

*Methods:* PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) were stimulated transepithelially in CaCo-2/PBMC co-cultures and directly challenged with probiotic, commensal, enteropathogenic and food-originating bacteria as well as with membrane components of grampositive and gramnegative bacteria. The expression of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$ ) was studied by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). The ratio of IL-8/18S mRNA was detected using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT PCR). The permeation of endotoxin was quantified via Limulus amoebocyte (LAL) assay and the integrity of the CaCo-2 cell monolayer was detected via fluorescein-dextran and transepithelial electric resistance (TEER).

*Results:* Grampositive bacteria did not activate immunocompetent cells in leukocyte-enterocyte co-cultures whereas a stimulation with the gramnegative probiotic *E. coli* Nissle resulted in higher expressions of TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  than stimulation with the enteropathogenic *E. coli* (EPEC). The feature "probiotic" results not necessarily in an enhanced production of inflammatory cytokines. Differences in epithelial permeability were not necessarily associated with an enhanced activation of immunocompetent cells. There was no activation of immunocompetent cells after direct or transepithelial stimulation with lipoteichoic acid (LTA) of *E. faecalis*. In contrast, endotoxin depending on its structure was a very potent (*E. coli* K12, *E. coli* Nissle, *S. Typhimurium*) or a moderately potent (*B. vulgatus*, *B. vulgatus* MPK) inducer of an inflammatory cytokine response. A neutralisation of endotoxin permeating into the basolateral compartment with Polymyxin B and Colistin resulted in a nearly total inhibition of inflammatory response. Furthermore, directly stimulated PBMC with comparable amounts of the permeating endotoxin in CaCo-2/PBMC co-cultures showed the same activation status as transepithelially stimulated cells. The probiotic, nonstimulating bacteria (*Lb. rhamnosus* GG, *B. vulgatus*, *B. bifidum*) were not able to reduce the *E. coli* K12 induced TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  production. A co-

## SUMMARY

stimulation of LPS from *E. coli* K12 (1 µg/ml) with non-stimulating endotoxins (*B. vulgatus* and *B. vulgatus* MPK) 100 µg/ml tended to reduce cytokine expression.

*Conclusion:* These results show that the attribute “probiotic” does not result in an obligatory activation of immunocompetent cells. The ability to stimulate immunocompetent cells is preferentially dependent on the presence of endotoxin, regarding the structure which is responsible for the stimulating capacity and is not mediated by enterocytes in first line. Activation of the basolaterally located lymphocytes occurs via permeating endotoxin. The permeability of the intestinal epithelial layer is only relevant when permeating endotoxin is able to stimulate immunocompetent cells to due its structural features.

# 1 Einleitung

Die Mucosa des Gastrointestinaltrakts ist kontinuierlich einer enormen Menge und Vielfalt von Bakterien ausgesetzt. Dabei fungiert das Epithel als Barriere vor dem Eindringen von Bakterien und gleichzeitig als afferenter Teil des mucosalen Immunsystems, der die Aufgabe hat nichtpathogene, von pathogenen Darmbakterien zu unterscheiden und entsprechende Signaltransduktionskaskaden in Gang zu setzen. Demzufolge sind neben den dendritischen Zellen die Epithelzellen die Zellen des Wirtes, die als erstes mit den luminalen Bakterien und Antigenen in Kontakt kommen und die Signale an das mucosale Immunsystem weiterleiten (Kagnoff und Eckmann, 1997). Das Darmepithel ist damit in der Lage, pathogene und kommensale Mikroorganismen wahrzunehmen und entsprechende Signale weiterzuleiten. Intestinale Epithelzellen reagieren auf bestimmte Bakterienspezies mit einer Ausschüttung bestimmter Chemokine und Zytokine zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen (Jung et al., 1995). Jedoch reagiert das Darmepithel nicht auf alle Bakterienspezies in der gleichen Art und Weise, manche Bakterien bewirken eine starken Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, während andere eine sehr geringe oder keine Zytokinantwort zur Folge haben (Kagnoff und Eckmann, 1997; Haller et al., 2000). Dabei erfolgt die Erkennung der verschiedenen Mikroorganismen über verschiedene PRR (pattern recognition receptors) der Epithelzellen, die an bestimmte strukturelle Oberflächenkomponenten PAMPs (pathogen associated molecular patterns) der bakteriellen Zellwand binden (Cario et al., 2002b).

Die physiologische Relevanz von kommensalen Bakterien in der Signalvermittlung des intestinalen Epithels verdeutlichen Versuche von Haller et al. (2002b und 2003), die durch garm-negative nichtpathogene Bakterien der Darmflora eine schnelle, temporäre Aktivierung der intestinalen Epithelzellen zeigen konnten.

## 1.1 Gastrointestinaltrakt

Der menschliche Gastrointestinaltrakt weist mit mehr als 200 m<sup>2</sup> die größte Oberfläche des Körpers auf. Diese wird von 10<sup>13</sup> bis 10<sup>14</sup> Mikroorganismen besiedelt (Savage et al., 1977), die unter normalen Bedingungen mit dem Wirt in einem physiologischen Gleichgewicht stehen. Des weiteren beherbergt der Gastrointestinaltrakt ca. 70 % der Lymphozytenpopulation des Wirts (Didierlaurent et al., 2002). Dabei werden die Lamina propria Lymphozyten sowie intraepithelialen Lymphozyten zum darmassoziierten Immunsystem gezählt. Erstere setzen sich zu 64 % aus CD 4+, 36 % CD 8+ und 1,8 % CD 4+ und CD 8+ Zellen zusammen (van Damme et al., 2001). Ausserdem gehören auch komplex organisierte Strukturen wie Lymphfollikel, Peyer'sche Plaques und mesenteriale Lymphknoten dem darmassoziierten Immunsystem an. Ein optimales Zusammenspiel dieser verschiedenen Komponenten ist Voraussetzung für die Entwicklung oraler Toleranz gegenüber erwünschten Antigenen, aber auch für die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen oder Toxinen.

Neben den immunkompetenten Zellen des darmassoziierten Immunsystems haben auch die Epithelzellen des Darmes (Rimoldi et al., 2005) sowie ihre Interaktion mit den oben beschriebenen Leukozytenpopulationen eine zentrale Rolle in der Immunantwort.

## 1.2 Abwehrmechanismen

Aufgrund der enormen Oberfläche des Gastrointestinaltrakts, der einer permanenten Konfrontation mit Mikroorganismen und einem breiten Spektrum verschiedenster Antigene ausgesetzt ist, ist ein effektives Abwehrsystem nötig, um eine Schädigung des Organismus zu vermeiden. Zu diesem Zweck sind nichtimmunologische Barrieren, die eine Kolonisation mit pathogenen Mikroorganismen ausschließen (Immunausschluss), angeborene, antigenunspezifische sowie erworbene Abwehrmechanismen komplex miteinander verknüpft. Damit können unerwünschte Bakterien- und Mikroorganismenbestandteile (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns), wie z.B. Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäuren oder Nahrungs- und Luftbestandteile eliminiert (Immunelimination), aber auch eine orale Toleranz gegenüber erwünschten Mikroorganismen und Nahrungsbestandteilen entwickelt werden (Cummings et al., 2004).



Viele chronische Erkrankungen, darunter chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Allergien, scheinen ihre Ursache in veränderten Mechanismen der lokalen Immunität und Toleranz zu haben. Dies kann zu Barrierefunktionsstörungen und verstärkter Invasion von Antigenen in den Blutkreislauf führen (Tlaskalova-Hogenova et al., 2002).

### 1.2.1 Nichtimmunologische Abwehrmechanismen

Die Mucosa, (physikalische Barriere), die Verdauungssekrete (chemische Barriere), sowie die Kommensalfloora (biologische Barriere) sind Komponenten einer nichtimmunologischen Abwehr.

Erstere besteht aus einer Epithelzellschicht, der Lamina propria, der Muscularis mucosa und dem Mucus. Letzterer setzt sich aus verschiedenen mucosalen Sekreten, v. a. Mucin, Trefoil Peptide sowie den Surfactant Lipiden zusammen. Die Epithelzellen von Dün- und Dickdarm gehen unter physiologischen Bedingungen aus Stammzellen der Kryptenregion hervor, die auf ihrer Wanderung zur Kryptenoberfläche zu absorptiven Epithelzellen, schleimproduzierenden Becherzellen, Paneth'schen Körnerzellen oder enteroendokrinen Zellen differenzieren. An den Villi kommt es zur Abschilferung der älteren Zellen, die gemeinsam mit den Sekreten der Krypten zum Schutz vor pathogenen Keimen beitragen. Die Anzahl der Tight Junctions, die die einzelnen Epithelzellen miteinander verbinden, hat Einfluss auf die Durchlässigkeit der Epithelzellschicht. So konnte bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität sowie der Transmigration von Neutrophilen aufgrund einer verringerten Expression von Tight Junction Proteinen nachgewiesen werden (Kucharazik et al., 2001). Auch der Mucus unterstützt die physische Trennung der Bakterien im Lumen von den Epithelzellen. Seine Hydrophobizität an der Oberfläche der Mucusschicht, hält wasserlösliche Toxine von der Mucosa fern. Diese Hydrophobizität wird auf eine Lipidschicht, die ca. 20% der organischen Masse des Mucus umfasst, sowie eine Phospholipidfraktion zurückgeführt (Lichtenberger et al., 1995). Dabei ist die Hydrophobizität im Magen und Colon besonders hoch, während sie im Bereich der Nährstoffabsorption deutlich geringer ist (Tatsumi et al., 1996). Auch die Dicke der Mucusschicht ist in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts unterschiedlich. So ist sie im Magen am höchsten (Matsuo et. al., 1997).

Zu den chemischen Abwehrmechanismen werden die Magensäure, das Pankreas- und Gallensekret gezählt. Sie dienen neben ihren Verdauungsfunktionen auch der Abwehr von Pathogenen. So kann sich *Shigella flexneri* nach einer Neutralisation der Magensäure mit Bicarbonat dreimal so schnell vermehren (Sarker et. al., 1992). Auch Patienten mit einer Achlorhydrie oder Hypochlorhydrie zeigen eine erhöhte orale Infektanfälligkeit. Darüber hinaus erkranken Patienten mit Pankreasinsuffizienz häufiger an akuten Diarrhoen was darauf schliessen lässt, dass auch das Pankreassekret an der Abwehr von Pathogenen beteiligt ist. Ausserdem konnte Cario (2005) eine bakteriostatische Wirkung des Pankreassekrets nachweisen. Eine antientzündliche Wirkung weisen auch Gallensäuren auf. Diese wird zumeist auf Veränderungen der Integrität und Permeabilität der Zellmembran durch Gallensäuren zurückgeführt (Begley et al., 2005). Ein weiterer chemischer Abwehrmechanismus sind die verschiedenen, von Enterozyten und Panethzellen produzierten antimikrobiellen Peptide oder Enzyme wie Defensine, Lysozym, DNAsen, Trypsin und Phospholipase A2 (Ouellette und Bevins, 2001).

Als biologische Abwehr dienen kommensale Bakterien, die entweder durch Konkurrenz oder durch Produktion von Bakteriozinen in der Lage sind, eine Vermehrung von Pathogenen zu unterbinden. Dies zeigt sich v. a. nach einer Antibiotikatherapie, wo bereits von Freter (1955) eine Erhöhung der Infektanfälligkeit beobachtet wurde (Freter, 1955).

### 1.2.2 Das darmassoziierte Immunsystem

#### 1.2.2.1 Aufgaben des darmassoziierten Immunsystems

Das darmassoziierte Immunsystem stellt die zweite Linie der Verteidigung nach den nichtimmunologischen Abwehrmechanismen dar. Es hat die Aufgabe, unerwünschte Substanzen zu eliminieren, sowie orale Toleranz gegenüber erwünschten Nahrungsbestandteilen und Organismen der kommensalen Darmflora zu üben.

Bei der Immunelimination werden Fremdstoffe, die die epitheliale Barriere durchdrungen haben, entfernt, so dass sie eine Art „zweite Linie der mucosalen Verteidigung“ darstellt. Diese erfolgt zum Teil über systemische Immunkomponenten, wie Serumantikörper, aber auch über lokale Antikörper, oft in Kombination mit cytotoxischen CD8+ T und NK-Zellen. Werden die Antigene nicht schnell genug entfernt, kommt es zu entzündlichen Erkrankungen. Derartig fehlgeschlagene Immuneliminationen sind häufig eine Ursache der Pathogenese von Allergien, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen u. ä. (Brandtzaeg 1997). Die orale Toleranz ist ein bereits seit langem bekannter physiologischer Mechanismus,

bei dem das Immunsystem nicht auf Nahrungsantigene und Antigene der kommensalen Mikroflora reagiert. Als Variablen dieses komplexen Phänomens werden Gene, Alter, Dosis und Zeitpunkt der postnatalen Antigenexposition, Antigenstruktur und deren Zusammensetzung, die Integrität der Epithelzellschicht, sowie der lokale Aktivierungszustand diskutiert (Cummings et al., 2004). Auch die kommensale Mikroflora spielt eine Rolle bei der Entwicklung der oralen Toleranz (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Wichtig scheint des weiteren ein ausbalanciertes Th1/Th2 Verhältnis, sowie die Aktivierung regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) zu sein (Qiao et al., 1996). Zu dem Phänomen der oralen Toleranz kommt es, wenn T-Zellen aufgrund hoher Antigenexposition Apoptose begehen (klonale Deletion), jedoch eine Anergie der kostimulatorischen antigenpräsentierenden Zellen vorliegt, eine Antigen clearance durch die Mucosa oder eine Induktion regulatorischer T-Zellen erfolgt (Brandtzaeg et al., 1998). Zur Komplexität der oralen Toleranz trägt darüber hinaus bei, dass nicht nur regulatorische T-Zellen die immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  produzieren, sondern auch antigenpräsentierende Zellen und Epithelzellen. Unklar scheint jedoch noch, ob die orale Toleranz von den Peyer'schen Plaques, der intestinalen Mucosa, den mesenterischen Lymphknoten oder der Leber ausgeht. (Cummings et al., 2004)

#### **1.2.2.2 Funktionsweise des darmassoziierten Immunsystems**

Bezüglich der Funktionsweise lässt sich das darmassoziierte Immunsystem in einen afferenten und einen efferenten Teil unterteilen. Den afferenten Teil stellt das MALT dar, welches das größte lymphatische Organ des menschlichen Körpers ist. Dazu zählen die Tonsillen, die Peyer'schen Plaques und weitere Lymphfollikel. Zum efferenten Teil gehören die diffus in der Lamina propria und intraepithelial verteilten Lymphozyten, sowie das Oberflächenepithel (Cummings et al., 2004).

Die Peyer'schen Plaques, 1977 von Johann C. Peyer entdeckt, sind in der Submukosa des terminalen Ileums lokalisiert und bestehen unter anderem aus B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Das Domepithel, das diese sekundär lymphoiden Organe vom Darmlumen trennt, beherbergt die so genannten M-Zellen (microfolded oder membraneous epithelial cells). Im Vergleich zu den umgebenden Enterozyten besitzen die M-Zellen beim Menschen nur eine sehr dünne Glykokalix- bzw. Mucusschicht und haben

nur wenige kurze, teilweise verzweigte Microvilli (Neutra et al., 1996). Ihre Hauptfunktion liegt in der Aufnahme von luminalen Antigenen und deren aktivem Transport in die Lymphfollikel (Neutra et al., 2001). Dabei beruhen die Untersuchungen hauptsächlich auf *in-vitro* Modellen von CaCo-2-Zellen, die auf Transwell Filtern ausdifferenzieren und nach Kokultivierung mit Peyer'schen Plaque Lymphozyten oder bestimmten B-Zell-Linien Zellverbände mit den Charakteristika eines Follikel-assoziierten Epithels entwickeln. So zeigte sich, dass die  $\beta_1$  Integrine, die ausschließlich auf M-Zellen, nicht auf polarisierten Darmepithelzellen zu finden sind, für die Interaktion mit den Invasionsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* verantwortlich sind und eine Translokation ermöglichen (Grassl et. al. 2003;; Autenrieth, 2000). Neben dem Weg exogener Stimuli über die M-Zellen zu den immunkompetenten Zellen sind auch dendritische Zellen in der Lage, Tight Junctions zwischen den einzelnen Epithelzellen zu lösen und direkt aus dem Lumen Bakterien aufzunehmen (Rescigno et al., 2001). Dennoch erfolgt die Induktion und Regulation der mucosalen Immunantwort v. a. über das MALT und nur selten über Strukturen der Effektorseite (Cummings et al., 2004).

Die Immunantwort beginnt immer mit der Aufnahme und Präsentation von zu immunogenen Peptiden degradierten Antigen mittels MHCII durch APC (antigen presenting cells) und Enterozyten. Außerdem kommen MHCII-positive Zellen, naive und memory-B-Zellen gehäuft in der direkten Umgebung von M-Zellen vor, nehmen dort Antigene auf und präsentieren sie sehr effektiv T-Zellen. Diese wiederum produzieren die entsprechenden Zytokine, wie TGF- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und initiieren damit den „switch“ von IgM zu IgA produzierenden Plasmazellen sowie die Differenzierung von antigenspezifischen B-Zellen zu IgA produzierenden Plasmazellen (Brandtzaeg et al., 2005, Brandtzaeg et al., 2001).

Naive CD4-Zellen wandern in die mesenterialen Lymphknoten, wo eine weitere Stimulation über die Bindung der präsentierten immunogenen Peptiden mit dem T-Zellrezeptor erfolgt und differenzieren dann zu Th1 oder Th2 Zellen aus (Cummings et al., 2004). Als Effektorzellen gelangen sie schließlich über den Ductus thoracicus und den systemischen Blutkreislauf an mucosale Effektorstellen („homing“) aber auch zu anderen Schleimhautoberflächen. Nach Ankunft in der Mukosa entfalten die T-Zellen ihre Effektorfunktionen und die B-Zellen differenzieren zu ortsansässigen IgA-produzierenden Plasmazellen. Die in das Interstitium sezernierten IgA-Moleküle binden als Dimere an Poly-Immunglobulin-Rezeptoren (Poly-Ig-Rezeptor), die sich auf der basolateralen Membran der

Enterozyten befinden. Die Dimere bestehen aus zwei mittels eines Joining-Proteins kovalent verbundenen IgA-Molekülen. Der entstehende IgA-Rezeptorkomplex wird über Endozytose aufgenommen, in Vesikeln durch den Enterozyten transportiert, von wo aus er an dessen apikale Oberfläche gelangt. Während dieser Transzytose wird der Poly-Ig-Rezeptor enzymatisch gespalten, sein extrazellulärer Anteil, die so genannte sekretorische Komponente, bleibt jedoch mit dem IgA verbunden (Phalipon et al., 2002 und 2003). Dieses Peptid schützt IgA vor Proteolyse und sorgt für dessen geeignete Lokalisierung im Lumen. Dort vermischt sich IgA mit dem Mucin und bildet eine schützende Oberflächenschicht. Es dient zum einen der lokalen Abwehr von Fremdkörpern, indem es an Bakterien bindet und die Adhäsion von Pathogenen an Enterozyten erschwert und zum anderen verhindert es durch Komplexbildung die Penetration von Antigenen ins Körperinnere. (Fagarasan et al., 2003; Mestecky et al., 1999; Phalipon et al., 2002).

Auch die Enterozyten haben neben ihren Funktionen in Absorption, Resorption und Sekretion eine immunologische Funktion im MALT. Sie sind beispielsweise in der Lage, Zytokine und Defensine zu produzieren sowie PRRs (pattern recognition receptors) wie z. B. TLR (toll like receptor) oder Rezeptoren der NOD Familie zu exprimieren (Ogle et al., 2002, Eckmann, 2004). Des Weiteren verfügen sie über Zytokinrezeptoren und polymere Immunglobulinrezeptoren, die den Transport von IgA und IgM auf die mukosale Oberfläche ermöglichen (Stadnyk, 2002)). Außerdem sind sie in der Lage, über MHC-Moleküle Antigene zu präsentieren (Lin et al., 2005). Eine Translokation von Mikroorganismen durch M-Zellen führt an der basolateralen Seite der Enterozyten zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Dies hat eine Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie z. B. IL-8 zur Folge (Autenrieth, 2000; Maaser und Kagnoff, 2002)

### 1.3 Zytokinnetzwerk

Zytokine sind hormonähnliche, zellregulatorische Peptide oder Glycopeptide mit einem Molekulargewicht von <60 kDa (Thomson, 1998). Sie sind bereits in femtomolaren Konzentrationen wirksam. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) werden sie meist nur vorübergehend produziert. Deshalb können sie hochspezifisch sein und schnell auf das Vorhandensein von Fremdkörpern reagieren. Dabei bilden sie zusammen mit anderen Zell-zu-Zell-Signalstoffen ein Kommunikationsnetzwerk, das sowohl die Aktivierung immunkompetenter Zellen untereinander als auch die Regulation

nicht immunassoziierter Gewebe (v. a. Endothelzellen und Hepatozyten) ermöglicht. Das Netzwerk ist parakrin, endokrin und autokrin wirksam. Des Weiteren zeigen Zytokine meist eine pleiotrope Wirksamkeit, die deren Effizienz zusätzlich steigert. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Zytokine auch die gleiche Signaltransduktionskaskade aktivieren können. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Zytokine in der Lage, Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose der Zielzellen zu nehmen. Auch sind Interaktionskaskaden möglich, bei denen ein Zytokin die Sekretion weiterer Zytokine induziert. Die Wechselwirkungen von Zytokinen können also in der Summe additiv, synergistisch oder gar antagonistisch sein. Entscheidend dabei ist die Reihenfolge, in der die Zellen den Zytokinmediatoren ausgesetzt sind.

Zu den Zytokinen werden Interleukine, Chemokine, Interferone und Wachstumsfaktoren gezählt. Je nach Ursprung wurden sie zunächst als Monokine oder Lymphokine bezeichnet. Diese Terminologie suggeriert eine klare Zuordnung zu einem Zelltyp oder Wirkungsort. Viele Zytokine werden jedoch sowohl von Lymphozyten als auch Monozyten gebildet. Chemokine sind chemotaktisch wirksame Zytokine, die Leukozyten an einen gewünschten Ort lotsen, und sie dort aktivieren. Die Bezeichnung Interleukine wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen der Leukozyten beeinflussen (Sartor, 1994; Aderem, 1993; Dwinell et al., 1999). Je nach Wirkung werden Zytokine auch häufig in pro- und antiinflammatorische sowie immunregulatorische Zytokine unterteilt. Zu den proinflammatorischen Zytokinen werden z. B. TNF- $\alpha$  und IL-8 gezählt, zu den antiinflammatorischen IL-10 und zu den immunregulatorischen IL-2, IL-6 und IFN- $\gamma$ .

Da in der vorliegenden Arbeit mit TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 sowie IFN- $\gamma$  als Messparameter gearbeitet wurde, sollen die genannten Zytokine im folgenden etwas genauer vorgestellt werden.

### 1.3.1 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa und besteht aus 157 Aminosäuren. Produziert wird es von Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Basophilen, Eosinophilen, Neutrophilen, sowie nicht immunkompetenten Zellen wie z. B. Enterozyten (Zhang und Tracey, 1998).

Die TNF- $\alpha$  Synthese kann sowohl durch biologische, chemische oder physikalische Stimuli, wie Viren, bakterielle Produkte (z. B. LPS), parasitäre Produkte und Zytokine induziert werden. Aber auch die Suppression der TNF- $\alpha$  Expression in Makrophagen kann durch

verschiedene Substanzen geschehen, u. a. durch PGE-2, durch die Zytokine TGF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, G-CSF, sowie durch verschiedene virale Produkte (Zhang und Tracey, 1998). In unstimulierten Zellen wird TNF- $\alpha$  in verschwindend geringen Mengen produziert, jedoch zählt es in aktivierten Zellen zu den hauptsächlich sekretierten Entzündungsfaktoren (Beutler et al., 1985) TNF- $\alpha$  zählt zu den frühen Zytokinen, bei dem die mRNA Konzentration bereits nach 15 bis 30 Minuten ansteigt, ohne dass zuvor eine *de novo* Synthese der zur Induktion der TNF-Expression nötigen Faktoren stattfinden muss. Dies lässt den Schluss zu, dass diese die TNF-Expression induzierenden Faktoren bereits in der unstimulierten Zelle vorliegen (Zhang und Tracey, 1998) An der Regulation der Transkription von TNF- $\alpha$  sind neben der TATA Box diverse regulatorische Sequenzen des TNF-Gens bekannt, u. a. NF $\kappa$ B  $\kappa$ 1, $\kappa$ 2 und  $\kappa$ 3 sowie T-Zell Aktivierungsfaktoren bindende Stellen („nuclear factor of activated T cells“ (NFAT)) für NFATp, NFAT-149, NFAT-117 und NFAT-76 (Tsai et al., 1996 a, b).

Neben verschiedenen anderen Zytokinen (u. a. IL-1 $\beta$ ) gilt TNF- $\alpha$  als Hauptmediator der Wirtsabwehr gegen gram-negative Bakterien und spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Elimination von Bakterien. Außerdem zählen zum Wirkungsspektrum von TNF- $\alpha$  die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen, die Induktion der Produktion von MHC-I-Molekülen, die Hemmung der Virusreplikation, eine via IL-6 vermittelte Induktion der Akut-Phase-Antwort, sowie die Verstärkung der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel. Darüber hinaus besitzt es Tumortoxizität und führt bei längerfristiger Anwendung zu Kachexie. Es induziert Fieber, Gewebsnekrosen, aktiviert die Cyclooxygenase Typ II und veranlasst die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. (Ibelgaufts, 1995; Siegenthaler, 2001).

### 1.3.2 IL-8

IL-8 gehört zur Gruppe der Chemokine, besteht zumeist aus 72 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 8 kDa auf (Ibelgaufts, 1995). Daneben existieren noch weitere IL-8 Formen mit 77, 71, 70 und 69 Aminosäuren und verschiedenen Konstellationen am NH<sub>2</sub>-Ende. Dabei hängt die Abspaltung der Aminosäuren von den Proteasen der jeweils IL-8 sezernierenden Zellen ab. Am häufigsten kommen die IL-8 Formen mit 77 und 72 Aminosäuren vor. IL-8 mit 77 Aminosäuren wird vor allem von Fibroblasten und Endothelzellen produziert, während Leukozyten vermehrt IL-8 mit 72 Aminosäuren freisetzen. (Ibelgaufts, 1995; Wuyts et al., 1998). Des Weiteren produzieren Monozyten, Makrophagen und Granulozyten IL-8.

Induziert wird die IL-8-Synthese durch proinflammatorische Zytokine, vor allem IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und INF- $\gamma$ , sowie bakteriellen Produkten wie LPS, virale Produkte oder doppelsträngige RNA (Wuyts et al., 1998). Dabei ist LPS einer der wichtigsten Auslöser einer IL-8 Produktion in Monozyten (Wuyts et al., 1998). Im Gegensatz dazu hemmen IL-10, Glucocorticoide, IL-4, IP-10 und TGF- $\beta$  die IL-8 Synthese. NF $\kappa$ B ist der entscheidende Transkriptionsfaktor. Durch seine Inaktivierung sind Glucocorticoide, IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in der Lage, die IL-8 Transkription zu inhibieren (Oliveira et al., 1992).

Die Hauptzielzellen von IL-8 sind Granulozyten und T-Zellen. Darüber hinaus wirkt IL-8 aber auch auf Monozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten, Basophile, Eosinophile, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und glatte Muskelzellen. Es führt zu Entzündungen und Zellmigration. So ist es in der Lage, Neutrophile durch Chemotaxis an den Ort der Entzündung zu lotsen und spezifisch zu aktivieren (Yoshimura et al., 1987; van Damme J., 1988). Es sorgt für eine vermehrte Bildung von Sauerstoffmetaboliten und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen (Ibelgaufts, 1995; Siegenthaler, 2001). Außerdem stimuliert IL-8 die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten (Diapedese). Des weiteren wird durch IL-8 die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration in Neutrophilen (Thelen et al., 1988) und ein leichter respiratorischer Burst induziert (Schröder et al., 1987). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass IL-8 in erster Linie die Elimination von Mikroorganismen durch Steigerung der bakteriziden Aktivität von Neutrophilen fördert.

### 1.3.3 IL-6

IL-6 ist ein Glycoprotein mit einer Masse zwischen 21 und 28 kDa und besteht aus 212 Aminosäuren mit einer hydrophoben Signalsequenz von 28 Aminosäuren. Die IL-6 Produktion wird durch verschiedenste Stimuli initiiert. Beispielsweise sind mitogene und antigene Substanzen, Viren (Cayphas et al., 1987), Peptide (IL-1 (Shalaby et al., 1989) TNF- $\alpha$  allein oder in Kombination mit IFN- $\gamma$  (Shalaby et al., 1989), IL-3 sowie GM-CSF (v. Snick, 1990) und platelet-derived growth factor (PDGF)), aber auch die Proteinkinase C, das Calciumionophor A23187 und verschiedene Substanzen, die eine Steigerung des intrazellulären zyklischen AMP-Spiegels bewirken, in der Lage, die IL-6-Produktion zu steigern (Hirano, 1998; v. Snick, 1990).

IL-6 ist ein Zytokin, das sowohl von lymphoiden als auch nicht-lymphoiden Zellen produziert wird. Es ist beteiligt an der Regulation der Immunantwort, Akutphase Reaktionen, sowie der Hämatopoiese (Hirano, 1998). Bei der Proliferation und



Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen wurde IL-6 als einer der Faktoren identifiziert, der eine Rolle in der Induktion der IgG Produktion spielt (Muraguchi et al., 1981). Beagley et al. (1989) konnten zeigen, dass IL-6 die IgA Produktion in den B-Zellen der Peyer'schen Plaques bei Mäusen (Beagley et al., 1989) bzw. humanen Appendix B-Zellen erhöht (Fujihashi et al., 1991). Fujihashi et al. (1992) schließen daraus, dass IL-6 eine wichtige Rolle in der mucosalen Immunantwort spielt.

#### 1.3.4 IL-10

IL-10 ist ein 18 kDa Polypeptid, das als „cytokine synthesis inhibitory factor“ (CSIF) in Th2-Zellklonen von Mäusen, als ein, die Produktion von Zytokinen in Th1-Klonen inhibierendes Zytokin entdeckt wurde (Fiorentino et al., 1989). Yssel et al. (1992) zeigten dann, dass IL-10 neben Th2- und Th0-Zellen bei entsprechender Stimulation auch von Th1 CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen sowie CD8<sup>+</sup> Zellen, Monozyten/Makrophagen und Kerationocyten und aktivierten B-Zellen produziert wird. Im Gegensatz zu Monozyten produzieren humane bronchiale Epithelzellen IL-10 konstitutiv (Bonfield et al., 1995). Auch mittels LPS oder PHA stimulierte T-Zellen produzieren IL-10 (Yssel et al., 1992). Auch kann die IL-10-Produktion durch IL-12 und IL-6 noch gesteigert werden (Daftarian et al., 1996; Jeannin et al., 1996).

Im Vergleich zu anderen Zytokinen ist IL-10 ein verzögert gebildetes Zytokin, das in Folge der Aktivierung von T-Zellen oder Monozyten bzw. Makrophagen gebildet wird (de Waal et al., 1991a, Fiorentino et al., 1991a, Yssel et al., 1992).

Stimuliert wird die IL-10 Ausschüttung in Monozyten durch LPS, TNF- $\alpha$  sowie den intrazellulären cAMP Spiegel steigernden Substanzen (Daftarian et al., 1996). Dagegen vermag IL-4 nach de Waal et al. (1991a) die Produktion von IL-10, in durch LPS stimulierten humanen Makrophagen zu hemmen. Fioretino et al. (1991b) und Chomarat et al. (1993) zeigten das Wechselspiel von IL-10 und IFN- $\gamma$  an Mäusemakrophagen und PBMCs. Dabei führt eine hohe Konzentration von IFN- $\gamma$  zu einer Hemmung von IL-10 und umgekehrt.

IL-10 bewirkt bei Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen eine starke Hemmung der Produktion u. a. von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie eine Eigenhemmung (Fioretino et al., 1991a; de Waal et al., 1991a). Des Weiteren bewirkt IL-10 in Monozyten und Makrophagen eine erhöhte Produktion von IL-1-Rezeptor-Antagonisten (de Waal et al., 1991a) und verschiedenen weiteren stimulatorischen und costimulatorischen Molekülen. Aufgrund dessen gibt es eine Verschiebung der Entzündungsmediatoren zur antiinflammatorischen Seite. Als direkter Effekt von IL-10 auf T-Zellen und T-Zellklone wird die Inhibition der

Zytokinproduktion sowie der Proliferation der Zellen in Anwesenheit von APC betrachtet. Dieser Effekt wird v. a. auf die immunsupprimierende Funktion der APC zurückgeführt (de Waal et al., 1991b; Fiorentino et al., 1991b).

IL-10 spielt auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle. So entwickeln IL-10 defiziente Mäuse eine Colitis und in fortgeschrittenem Stadium Adenokarzinome (Berg et al., 1996), die durch IL-10-Gaben von Geburt an oder durch anti-IFN- $\gamma$  oder anti-TNF- $\alpha$  Antikörper verhindert werden können. Daraus schließen Davidson et al. (1996), dass die Entzündungsprozesse bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf eine Dysregulation der Interaktion zwischen kommensaler Flora und immunkompetenten Zellen in Abwesenheit von IL-10 zu einer unkontrollierten, überschiessenden Th1-Antwort führen.

### 1.3.5 IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  zählt zu den Interferonen vom Typ II und hat ein Molekulargewicht je nach Glycosilierungsgrad von 20 bzw. 25 kDa (Ibelgaufits, 1995). Seine wichtigste Aufgabe ist die Aktivierung von Makrophagen zur Abwehr von Viren und Bakterien. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Krankheitserreger sowie der Elimination maligner Transformationen durch Makrophagen (Dunn et al., 2004).

IFN- $\gamma$  wird von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie natürlichen Killerzellen produziert. Bei Mäusen produzieren v. a. Th1-Zellen IFN- $\gamma$ . Nur sehr wenig oder gar kein IFN- $\gamma$  wird von murinen Th2-Zellen produziert (Mosmann et al., 1986). Außerdem inhibiert IFN- $\gamma$  v. a. die Proliferation von Th2-Zellen, nicht aber, die von Th1-Zellen, so dass es in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  zu einer Expansion von Th1-Zellen kommt (Gajewski et al., 1988). Die Produktion von IFN- $\gamma$  wird durch die Monokine TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert (Boehm et al., 1997; Cooper et al. 2001). Inhibiert wird die IFN- $\gamma$  Produktion dagegen durch TGF- $\beta$  (Bellone et al., 1995).

## 1.4 Effekte der Mikroflora und probiotische Bakterien im menschlichen Gastrointestinaltrakt

### 1.4.1 Mikroflora

Die Oberfläche des Darms, sowie das Darmlumen sind von einer beträchtlichen Vielfalt von kommensalen Mikroorganismen besiedelt (Savage, 1977; Moore and Holdeman, 1974). Diese Symbionten bilden ein komplexes ökologisches „steady-state-System“, an dem ca. 400 bis 500 verschiedene Spezies beteiligt sind (Abrams, 1983; Brown, 1977; Gall, 1970; Lee, 1985; Luckey, 1974; Moore and Holdeman, 1974; Ozawa and Freter, 1964; Savage, 1977; Simon und Gorbach, 1984). In der Abwehr gegenüber Pathogenen sind sie ein wichtiger biologischer Faktor. Bei geeigneter Zusammensetzung ist die Darmflora in der Lage, die Adhäsion und Vermehrung pathogener Bakterien auf der Enterozytenoberfläche („colonization resistance“) und deren Invasion in die Epithelzellen und den Blutkreislauf zu verhindern. Außerdem spielen kommensale Mikroorganismen sowohl durch direkte Interaktion mit pathogenen Keimen als auch durch Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems eine bedeutende Rolle in der Infektabwehr (Ganguly und Waldmann, 1977; Moreau et al., 1978; Nielsen und Friis, 1980; Rolfe, 1984; Shedlofsky und Freter, 1974). Die Flora ist auch bei der Entwicklung des darmassoziierten Immunsystems von großer Bedeutung. In der frühen postnatalen Phase stimuliert sie sowohl die Ausbildung der lokalen als auch der systemischen Immunität. Später aktiviert sie regulatorische Mechanismen, die die lokale und systemische Immunantwort in Balance halten (Tlaskalova-Hogenova et al., 2002; Wilson et al., 2002).

Bei unter keimfreien Bedingungen aufgewachsenen Tieren konnten u. a. Veränderungen in der GALT-Struktur und -funktion festgestellt werden. Die lymphatischen Bestandteile des Darms waren bei diesen Tieren unterentwickelt und die Anzahl der GALT-Lymphozyten verringert (Cebra et al., 1999).

Des Weiteren spielt auch die mikrobielle Flora bei der Durchblutung (Kvietys et al., 1981), dem Stoffwechsel (Hoverstad, 1986 und 1989; Rasic und Kurmann, 1983) und der Motilität des Darms (Abrams und Bishop, 1967 und 1983) eine wichtige Rolle.

Die Darmflora setzt sich in den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts unterschiedlich zusammen, so dass sich die jeweils ansässigen Bakterien erheblich bezüglich ihrer Quantität unterscheiden (vgl. Tabelle 1.1.1) (Lee, 1985; Knoke et al., 1986).

Tabelle 1: Bakterielle Besiedlungsdichte und Zusammensetzung der Darmflora verschiedener Abschnitte des menschlichen Gastrointestinaltrakts (Simon und Gorbach, 1984); \* KBE/ml Darminhalt bzw. pro g Fäzes.

	Magen	Jejunum	Illeum	Faeces
<b>Gesamtkeimzahl</b>	0-10 <sup>3*</sup>	0-10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
<b>Aerobe oder fakultativ anaerobe Bakterien:</b>				
Coliforme	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>
Streptokokken	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup>
Staphylokokken	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>9</sup>
Lactobazillen	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>
Pilze/Hefen	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
<b>Obligat anaerobe Bakterien</b>				
Bacteroides	selten	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Bifidobakterien	selten	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>11</sup>
Clostridien	selten	selten	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup>
Eubakterien	selten	selten	selten	10 <sup>9</sup> -10 <sup>12</sup>

Der Magen und der obere Dünndarm beherbergen aufgrund des gastralen Milieus nur sehr säureresistente Bakterien und sind deshalb relativ keimarm (<10<sup>3</sup> KBE/ml). Hier sind vor allem aerobe Streptokokken, Staphylokokken und Lactobazillen zu finden. Vom proximalen Jejunum (10<sup>3</sup> bis 10<sup>4</sup> KBE/ml) bis zum distalen Illeum (10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> KBE/ml) nimmt die Bakterienanzahl und -vielfalt zu, wobei sowohl die fakultativ anaeroben als auch die strikt anaeroben Spezies immer stärker in den Vordergrund treten (Haenel und Bendig, 1975; Simon und Gorbach, 1984). Im Kolon steigt die Besiedlungsdichte sprunghaft an und erreicht Werte zwischen 10<sup>11</sup> und 10<sup>12</sup> KBE/ml. Mindestens 95 % der anzüchtbaren Darmbakterien gehören zu den obligaten Anaerobiern (z.B. Bacteroides, Bifidobakterien, Eubakterien etc.). Aerobe Arten und fakultative Anaerobier (z.B. Koliforme, Enterokokken etc.) machen ca. 1-5 % der Gesamtflora aus (Haenel und Bendig, 1975; Hill und Draser, 1975; Lee 1985; Salfinger, 1980; Simon und Gorbach, 1984).

### 1.4.2 Probiotische Bakterien

Aufgrund der Einflussmöglichkeiten der Darmflora auf die Abwehrmechanismen des GIT liegt der Gedanke nahe, mit Hilfe von zugeführten Bakterien die Abwehr zu modifizieren. Probiotika (aus dem griechischen pro bios = für das Leben, das Leben fördernd) wurden 1965 von Lilly und Stillwell als synergistische Wechselwirkung der Mikroorganismen untereinander definiert (Lilly und Stillwell, 1965). Parker (1974) fasste den Begriff Probiotika

als „Mikroorganismen oder Substanzen, die die Gesundheit eines Wirtsorganismus durch Wechselwirkungen mit der natürlichen Darmflora positiv beeinflussen“ deutlich enger (Parker 1974). Seit dem Expertentreffen der LABIP (Lactic Acid Bacteria Industrial Platform) – Arbeitsgruppe im Jahre 1996 gelten Probiotika als „lebende, definierte Mikroorganismen, die nach ihrem Verzehr gesundheitsfördernde Effekte ausüben, die über das Maß der grundlegenden ernährungsphysiologischen Effekte hinausgehen“. Probiotika sind demnach lebende Mikroorganismen, die nach exogener Zufuhr aktiv und in ausreichender Menge ihren Wirkort (meist das Kolon) erreichen und damit die Gesundheit auf unterschiedliche Art und Weise positiv beeinflussen (BGVV, 1999).

*In-vitro-Studien* zeigen, dass Probiotika einen antimikrobiellen Effekt durch die Modifikation der Mikroflora ausüben, antibakterielle Substanzen sekretieren, mit Pathogenen um die Adhäsion ans intestinale Epithel und die Nährstoffe kompetieren, sowie Einfluss auf die Konsequenzen einer Entzündung haben, wie z. B. sekretorische Veränderungen und die Migration von Neutrophilen (Michail und Abernathy, 2002 und 2003). Des Weiteren sind Probiotika in der Lage eine Modulation zellulärer allergischer Reaktionen (Kalliomaki und Isolauri, 2004), sowie eine Reduktion der Zellproliferation bei Krebs zu bewirken (Lee et al., 2004). Diese Effekte gehen über einen rein gastrointestinalen Nutzen hinaus, so dass auch entfernte Bereiche des Körpers, wie z. B. der Urogenitaltrakt oder die respiratorische Mucosa davon profitieren können. Des Weiteren ist es nicht zwingend notwendig, lebende probiotische Organismen zu verabreichen. So zeigten auch Teile probiotischer Bakterien, wie sekretierte Proteine oder DNA die Fähigkeit, Entzündungen zu hemmen, sowie die Apoptose von Epithelzellen zu verhindern (Jijon et al., 2004; Yan und Polk, 2002). Rachmilewitz et al. (2004) zeigten, dass die DNA von unterschiedlichen probiotischen Mischungen in der Lage ist eine experimentelle Colitis in verschiedenen Tiermodellen zu unterdrücken. Effekte von Probiotika konnten sowohl bei verschiedenen Erkrankungen des GIT aber auch bei extraintestinalen Funktionsstörungen gezeigt werden.

Probiotika wurden beispielsweise erfolgreich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt.

Bei Pouchitis, einer akuten oder chronischen Entzündung eines ileoanalen Pouch, der aufgrund einer Kolektomie z. B. bei Colitis ulcerosa zur Erhaltung der Kontinenz angelegt wird, konnte in kleinen kontrollierten Studien mit der probiotischen Mischung VSL#3, einer Kombination aus 8 verschiedenen probiotischen Bakterien, eine Pouchitis Prävention bei

Erwachsenen gezeigt werden (Mimura et al., 2004; Gionchetti et al., 2003; Gionchetti et al., 2000). Durch die Gabe der VSL#3 Mischung konnten Kuhbacher et al. (2006) eine Steigerung der bakteriellen Gesamtkeimzahl messen, wobei sowohl die Anzahl an sich, als auch die Diversität der bakteriellen, v. a. der anaeroben, Mikroflora stieg. Dagegen kam es bei der Pilzflora zu einer Verringerung der Diversität. Daraus wurde geschlossen, dass die Wiederherstellung der Integrität einer „protektiven“, der intestinalen Mucosa assoziierten Mikroflora ein Wirkprinzip probiotischer Bakterien bei entzündlichen Darmerkrankungen sein könnte (Kuhbacher T. et al., 2006). Im Gegensatz zu der VSL#3 Mixtur konnte durch *Lb. rhamnosus* GG kein positiver Effekt bei Patienten mit Pouchitis gefunden werden (Kuisma J. et al., 2003). In einer retrospektiven Studie konnten Gosselink et al. (2004) dagegen bei einer täglichen Dosis von  $1-2 \times 10^{10}$  KBE *Lb. rhamnosus* GG signifikante klinische Vorteile bei Pouchitis Patienten messen.

In der Colitis Ulcerosa Therapie zeigten verschiedene Probiotika vielversprechende Ergebnisse. Beispielsweise hatte der nichtpathogene, *E. coli* Nissle 1917 die gleiche Effektivität in der Prävention eines Rezidivs wie die Standardmedikation mit Mesalamin (1500mg/d) (Rembacken et al., 1999; Kruis et al., 2004; Kruis et al., 1997). Des Weiteren zeigten Pilotstudien für die probiotische Mischung VSL#3 bei Colitis Ulcerosa eine Erhaltung der Remission bei 75 % der Patienten mit moderater Colitis Ulcerosa, sowie eine Reduktion von aktiven Entzündungsgeschehen in 87 % der Fälle (Venturi et al., 1999; Bibiloni et al., 2005). Eine Senkung der Rezidivrate konnte auch durch die Gabe einer mit Bifidobakterien fermentierten Milch bewirkt werden (Ishikawa et al., 2003). Aber nicht nur probiotische Bakterien sondern auch die probiotische Hefe *Saccharomyces boulardii* führte bei moderater Colitis Ulcerosa bei 17 von 24 Patienten zur Remission (Guslandi et al. 2003).

Für Morbus Crohn sind klinische Studien eher rar und die Ergebnisse sind uneinheitlich (Malchow, 1997; Prantera et al., 2002). Auch bei Gabe von *Lb. rhamnosus* GG sind die Ergebnisse sehr widersprüchlich. In einer pädiatrischen Pilotstudie kommt es durch *Lb. rhamnosus* GG zu einer Verbesserung der Darmbarrierefunktion, wohingegen in einer grösseren Studie *Lb. rhamnosus* GG nicht die Zeitspanne bis zum nächsten Rezidiv verlängern konnte (Gupta et al., 2000; Bousvaros et al., 2005).

Auch bei Reizdarmsyndrom existieren diverse Studien, die eine Verbesserung der Symptome durch Probiotikatherapie dokumentieren. So gibt es sowohl für *Lb. rhamnosus* GG als auch für die probiotische Mischung VSL#3 Studien, die eine Reduktion der Symptome zeigen, aber auch Studien, die keine Effekt nachweisen können (Baussermann und Michail, 2005; O'Sullivan et al., 2000; Kim HJ et al., 2005; Brigidi et al., 2001).

Eine günstige Wirkung auf die Therapie von Antibiotika-assoziiierter Diarrhoe wird Probiotika von Goldin et al. (1992) und Siitonen et al. (1990) zugeschrieben. Zwei Metaanalysen sprechen von einer Verringerung der Antibiotika assoziierten Diarrhoen um etwa 60 %. Dabei waren die Probiotika *S. boulardii* bei Erwachsenen und *Lb. rhamnosus* GG bei Kindern wirksam (Cremonini et al., 2002; D'Souza et al., 2002). Allerdings sind nicht alle Probiotika gleich effektiv. So war eine Kombination aus *Lb. acidophilus* und *Lb. bulgaricus* nicht in der Lage, eine Diarrhoe bei Kindern mit Amoxicillintherapie zu verhindern (Tankanow et al., 1990).

Die meisten Studien in Bezug auf probiotische Bakterien existieren vermutlich zu infektiösen Diarrhoen. Dabei zeigt sich v. a. bei leichten bis moderaten Diarrhoen eine Verkürzung der Erkrankungsdauer (Van Niel et al., 2002; Huang et al., 2002). V. a. die Gabe von *Lb. rhamnosus* GG führte durchgängig zu einer Verkürzung der Erkrankungsdauer (Szajewska et al., 2001a). Diese Reduktion der Dauer und Häufigkeit von Durchfallerkrankungen wird auf die Konkurrenz probiotischer Mikroorganismen mit Pathogenen zurückgeführt (Bernet et al., 1993; Perdigon et al., 1995; Tuomola et al., 2001; Kirjavainen et al., 1998; D'Souza et al., 2002). Dabei kommt es laut Reid et al. (1988) zur spezifischen Bildung von Coaggregaten zwischen probiotischen Bakterien und Pathogenen. Außerdem werden pathogene Bakterien durch die Einnahme von probiotischen Lebensmitteln infolge einer pH-Absenkung und der Produktion organischer Säuren (Milch- oder Essigsäure) und antimikrobieller Substanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Bakteriozinen unterdrückt (Jack et al., 1995; Goldin et al., 1992). Bei schweren Diarrhoen kann durch Behandlung mit Probiotika kein derartiger Effekt erzielt werden (Salazar-Lindo E. et al., 2004).

Ebenfalls konnten probiotischen Bakterien die Symptome der Lactosedigestion verbessern (Dewit et al., 1987).

Neben den verschiedenen Effekten bei gastrointestinalen Erkrankungen gibt es Hinweise, dass auch Erkrankungen im extraintestinalen Bereich durch Probiotika zu beeinflussen sind. So zeigten Probiotika beispielsweise positive Wirkung bei Harnwegsinfekten (Reid, 2000), bei vulvo-vaginaler Candidiasis, Otitis media (Tagg und Dierksen, 2003) aber auch bakterieller Vaginose (Golledge und Riley, 1996).

Auch bei allergischen Erkrankungen zeigen verschiedenen Studien die Wirksamkeit von probiotischen Bakterien. So konnte eine signifikante Verringerung der Entwicklung einer Atopischen Dermatitis bei 2 (Kalliomaki et al., 2001) bzw. 4 jährigen (Kalliomaki et al., 2003)

Kindern aus Familien mit einem hohen Erkrankungsrisiko gemessen werden, wenn den Müttern während der Schwangerschaft und den Kindern während der ersten 6 Lebensmonate *Lb. rhamnosus* GG verabreicht wurde. Eine andere Studie zeigt bei Kindern mit Atopischer Dermatitis signifikante Verbesserungen nach 6 wöchiger Gabe von *Lb. rhamnosus* 19070-2 und *Lb. reuteri* DSM 122460 (Rosenfeldt et al., 2003). Ausserdem sprachen Kinder mit hohen IgE Konzentrationen im Blut und positiven Hauttests besser auf die Therapie mit probiotischen Bakterien an (Rosenfeldt et al., 2003). Dagegen konnte bei Kindern mit Pollenallergie durch *Lb. rhamnosus* Supplementierung kein Effekt erzielt werden (Helin et al., 2002).

Aber nicht nur in der Therapie verschiedener Erkrankungen konnte teilweise die Wirksamkeit von Probiotika belegt werden, sondern auch in der Prävention. Beispielsweise zeigen diverse Studien die Effektivität spezifischer Probiotika im Bereich der Prävention von Diarrhoen (Saavedra et al., 1994; Oberhelman et al., 1999; Szajewska et al., 2001). Des weiteren konnte eine Senkung der Konzentration gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte und Expression krebspromovierender Enzyme im Colon, wie  $\beta$ -Glucuronidase, Azoreduktase und Nitroreduktase von Spanhaak et al., (1998) und Goldin et al. (1992) gemessen werden.

Diese Effekte im gastrointestinalen und extraintestinalen Bereich haben eine Milderung von Krankheitsverläufen oder Minderung der Infektanfälligkeit zur Folge. Die Mechanismen der probiotischen Bakterien, die diese protektiven oder therapeutischen Effekte bewirken, sind noch nicht vollständig erforscht. Die bereits postulierten probiotischen Mechanismen sollen im folgenden näher dargestellt werden. So produzieren Milchsäurebakterien *in-vitro* diverse antimikrobielle Substanzen, wie organische Säuren, freie Fettsäuren, Ammoniak, Wasserstoffperoxid und Bakteriozine. Diese werden dazu genutzt, die Haltbarkeit zu verlängern und den Verderb durch Lebensmittelpathogene in Milchprodukten zu unterbinden (Servin, 2004). Auch die Inhibition der Adhärenz von Pathogenen an die mucosalen Oberflächen, die zumeist als Eintrittspforte für Infektionserreger dienen, ist eine häufig dokumentierte Funktion von Probiotika (Bernet et al., 1993; Gopal et al., 2001). Bernet et al. (1993) zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Adhärenz von enterotoxischen und enteropathogenen *E. coli* und *S. Typhimurium* an CaCo-2-Zellen durch Bifidobakterien. Darüber hinaus zeigen probiotische Bakterien in verschiedenen Studien auch einen Einfluss auf die Infektanfälligkeit, der über eine Beeinflussung der Mucusproduktion erfolgt. Hooper



et al. (2001) konnten eine vermehrte Expression des CRP-ductin-Gens nachweisen, das u. a. eine Mucuskomponente kodiert. In einer Kokultur der Probiotika (*Lb. rhamnosus* GG und *Lb. plantarum*) mit HT-29-Zellen wurde ebenfalls eine gesteigerte Expression von MUC2 und MUC3 *in-vitro* gemessen (Mack et al., 1999). Ein weiterer Effekt von Probiotika stellt ihr Einfluss auf die intestinale Permeabilität dar. Isolauri et al. (1993) zeigten eine Normalisierung der Darmpermeabilität bei mit Kuhmilch gefütterten neugeborenen Ratten durch die Gabe von *Lb. rhamnosus* GG. Ebenfalls eine Normalisierung der physiologischen Darmfunktion sowie eine Erhöhung der Integrität der Darmbarriere konnte Madsen et al. (2001) zeigen. Dabei wird angenommen, dass der Einfluss von Probiotika auf die Darmpermeabilität über eine Abmilderung der proinflammatorischen Immunantwort (Neish et al., 2000) und die Stimulation von sekretorischen IgA vermittelt ist (Kaila et al., 1992). Des Weiteren sind Probiotika in der Lage, über enzymatische Mechanismen Toxin-Rezeptoren zu blockieren und so die pathogene Wirkungen der Toxine zu verringern. Beispielsweise degradiert *Saccharomyces boulardii* den *Clostridium difficile* Toxin-Rezeptor im Ileum von Kaninchen (Pothoulakis et al., 1993). Probiotika verhindern darüber hinaus die Vermehrung von Pathogenen durch kompetitive Hemmung der Adhäsionspunkte an der Mucosa. *S. boulardii* führt *in-vitro* zur Verringerung der Adhäsion von *Entamoeba histolytica* trophozoites an Erythrozyten (Rigothier et al., 1994).

Der Effekt von Probiotika auf das Immunsystem war Thema zahlreicher Studien in den letzten Jahren. Übereinstimmung herrscht jedoch darüber, dass bestimmte Stämme von Lactobacillen in der Lage sind, stimulierend oder auch regulierend verschiedene Bereiche des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu beeinflussen. Bei der über Zytokine vermittelten Immunantwort zeigen diverse *in-vitro*-Studien Einflüsse durch Probiotika. *E. coli* Nissle bewirkt beispielsweise in CaCo-2-Zellen eine Steigerung der Expression der proinflammatorischen Zytokine monocyte chemoattractant protein 1 ligand 2 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-2 alpha (MIP-2 $\alpha$ ) und macrophage inflammatory protein-2 beta (MIP-2 $\beta$ ). Die Steigerung der MCP-1 Expression konnte auch im Mausmodell nachgewiesen werden (Ukena et al., 2005). Dagegen wurde durch *E. coli* Nissle eine Verringerung der proinflammatorischen Zytokine im Mausmodell bei akuter und chronischer Colitis für IFN- $\gamma$  und IL-6 von Schultz et al. (2004) nachgewiesen. Frick et al. (2006) konnte in dendritischen Zellen von IL-2 defizienten Mäusen zeigen, dass *B. vulgatus* MPK die IL-6 Sekretion erhöht und diese damit keine Reaktion mehr auf eine zusätzliche

Stimulation mit *E. coli* aufweisen. Des Weiteren konnte von den Autoren in durch *B. vulgatus* MPK stimulierten dendritischen Zellen keine Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-12 oder IL-10 gemessen werden. Dagegen konnten Mazmanian et al. (2005) eine dosisabhängige Steigerung von IFN- $\gamma$  bei dendritischen Zellen in Kokultur mit CD4+ T Zellen bei Stimulation mit *B. fragilis* Polysacchariden zeigen. Diese wird auf eine Steigerung der IL-12 Produktion von dendritischen Zellen zurückgeführt, die dann zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$  Sekretion führt. In einer *in-vitro*-Studie zeigten Tejada-Simon et al. (1999b) eine Erhöhung der Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 bei Stimulation der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit Zellwand- und Zytoplasmafaktoren von *Lb. acidophilus*. Allerdings konnten die Ergebnisse von Tejada-Simon et al. (1999a) im Tierversuch nicht bestätigt werden, denn die Expression der mRNA von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-6 zeigte weder in Milzzellen und mesenterischen Lymphknoten noch Peyerschen Plaques signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren. Ha, et al. (1999) konnten eine Abnahme der mRNA von TNF- $\alpha$  in Milzzellen, mesenterischen Lymphknoten sowie Peyer'schen Plaques bei mit *Lb. acidophilus* gefütterten Mäusen messen. In einer Doppelblind-Studie konnten Wheeler et al. (1997) in den Lymphozyten von Patienten mit chronischem Asthma eine Steigerung der IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentration nach der Einnahme von mit *Lb. acidophilus* versetztem Joghurt messen. Tejada-Simon et al. (1999b) zeigten wie bei *Lb. acidophilus* auch für *Lb. casei* shirota anhand der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 *in-vitro* eine Steigerung der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6, die aber *in-vivo* im Tierversuch nicht bestätigt werden konnten (Tejada-Simon et al., 1999a). Matsuzaki et al. (1998) belegen in mit Ovalalbumin stimulierten Mäusemilzzellen eine Steigerung von IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-2, nicht aber von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 nach Fütterung mit *Lb. casei* shirota. In einer *in-vitro*-Studie konnten Pena et al. (2003) in Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 bei Kostimulation von *Lb. rhamnosus* GG mit LPS eine Verringerung der TNF- $\alpha$  Ausschüttung messen, während die IL-10- und IL-12-Konzentration unverändert blieb. Eine Steigerung der Expression der mRNA von IFN- $\gamma$  durch *Lb. rhamnosus* GG zeigten Gill et al. (2000) im Tierversuch. Eine Verringerung der TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Fäzes von Kindern mit atopischem Ekzem und oder Kuhmilchallergie konnte Majamaa et al. (1997) durch *Lb. rhamnosus* GG Gaben messen. Rangavajhyala et al. (1997) zeigte *in-vitro* durch *Lb. johnsonii* LA1 eine Steigerung der TNF- $\alpha$ - sowie IL-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7. In einem Enterozyten, Leukozyten Kokulturmodell konnte Haller et al. (2000) durch *Lb. johnsonii* keine Induktion der Expression der mRNA von IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  messen. Auch die basolateralen Zytokinkonzentrationen

blieben bei Stimulation mit *Lb. johnsonii* LA1 unverändert (Haller et al., 2000). Im Gegensatz zu *Lb. johnsonii* LA1 konnten Haller et al. (2000) durch *Lb. sakei* in dem Enterozyten, Leukozyten Kokulturmodell eine Induktion der Expression der mRNA von IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  messen. Des weiteren konnten auch erhöhte TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-10-Konzentrationen in diesem Modell gemessen werden (Haller et al., 2000). Durch Kulturmedium von *B. bifidum* konnten Mènard et al. (2004) eine Verringerung der durch LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Produktion bei HT29-19A Zellen auf Transwell Filtern messen. Dagegen zeigten He et al. (2002), dass *B. bifidum* in Makrophagen der Zelllinie J777.1 zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 führt.

Auch eine Steigerung der angeborenen Immunantwort, deren Hauptkomponenten NK-Zellen und phagozytierende Zellen, wie Monocyten, Makrophagen und polymorphkernige Zellen sind, wird in verschiedenen Studien durch probiotische Bakterien gezeigt (Gill et al., 2001a; Gill et al., 2001b, Spanhaak et al., 1998; Schiffrin et al., 1995). Gill et al. (2000) wiesen im Tierversuch eine Steigerung der Phagozytoseaktivität in Leukozyten und Makrophagen durch *Lb. rhamnosus* GG nach. Des weiteren konnte er eine Erhöhung der T- und B-Lymphozytenproliferation, sowie eine Aktivitätssteigerung von NK-Zellen in der Milz der Versuchstiere messen. Schiffrin et al. (1995) zeigten, dass der Konsum von mit *Lb. johnsonii* LA1 fermentierter Milch die Phagozytose-Kapazität von Blut-PMN und Monocyten erhöhte. Bestätigt wurden die Ergebnisse von Schiffrin et al. (1995) durch Donnet-Hughes et al. (1999) an gesunden Erwachsenen Probanden. He et al. (2001) und Pelto et al. (1998) konnten darüber hinaus eine gesteigerte Freisetzung von in die Phagozytose involvierten Rezeptoren v. a. des Komplement-Rezeptors-3 (CDR3) in PBMC messen. Allerdings konnte Spanhaak et al. (1998) keinen Effekt von Probiotika auf die angeborene Immunantwort nachweisen.

Neben den Effekten auf die Zytokinantwort und die angeborene Immunantwort konnte auch eine Steigerung der humoralen Immunantwort durch Aufnahme spezifischer Lactobacillenstämme bei Infektionen, systemischer oder auch oraler Immunisierung in Humanstudien gemessen werden (Marteau et al., 1997, Kaila et al., 1992). Kaila et al. (1992) zeigten eine erhöhte Produktion spezifischer Antikörper (IgA und IgM) gegen Rotaviren bei Kindern, die während der Infektion mit *Lb. rhamnosus* GG substituiert wurden. Link-Amster et al. (1994) fanden eine signifikant erhöhte IgA-Antwort auf eine *S. Typhimurium* Ty21 Impfung bei Gabe von fermentierter Milch, die *B. bifidum*, sowie *Lb. johnsonii* LA1 enthielt. Ähnliches konnten He et al. (2001) aufgrund der Gabe von *Lb. rhamnosus* GG bei Probanden

messen, die mit Salmonella-Vaccinen immunisiert wurden. Im Tierversuch wiesen Perdigon et al. (1995) einen dosisabhängigen Anstieg von IgA-produzierenden Zellen und T-Lymphozyten durch *Lb. casei* shirota nach.

## 1.5 Bakterielle Zellwandbestandteile

### 1.5.1 Lipopolysaccharide (LPS)

Die Bakterienzellwand gram-negativer Bakterien weist im Gegensatz zu derjenigen von gram-positiven Spezies nur eine Peptidoglykanschicht auf. Zusätzlich zu ihrer Zytoplasmamembran und Peptidoglykanschicht besitzen sie eine weitere Membran, welche die äußere Begrenzung der Zellen darstellt. Sie ist asymmetrisch angeordnet. Ihre innere Schicht besteht aus Phospholipiden und Proteinen, in der äußeren Schicht, die ca. 75% der Bakterienoberfläche bedeckt, dominieren die so genannten Lipopolysaccharide (LPS). LPS sind amphiphile Moleküle, die auch als Endotoxine bezeichnet werden (Munk, 2000; Pfeiffer, 1892; Wilson et al., 2002). Sie gehören zu den aktivsten Stimulanzen des menschlichen Immunsystems (Wiese et al. 1999) und sind deshalb bei der Interaktion gram-negativer Bakterien mit höheren Organismen, z.B. bei einer Infektion, von großer Bedeutung.

#### 1.5.1.1 Wirkmechanismen von Endotoxinen

Der Mensch befindet sich in ständigem Kontakt mit gram-negativen Bakterien. Obwohl LPS normalerweise nicht von den Bakterienzellen sezerniert wird, werden kleine Mengen z. B. bei der Zellteilung an die Umgebung abgegeben. Größere Mengen werden durch absterbende Bakterien freigesetzt (Müller et al., 2004).

Zu den Wirkungen von Endotoxinen gehören verschiedene pathophysiologische Effekte wie Fieber, Leukopenie, Blutdruckabfall und Verbrauchskoagulopathie, die im Extremfall zu einem letalen septischen Schock führen können (Cohen, 2002; Waage et al., 1989). Sie wirken v. a. indirekt, indem sie mit Monozyten und Makrophagen, sowie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Neutrophilen etc. (Galanos et al., 1993; Vogel et al., 1990) interagieren und primär in diesen die Synthese und Ausschüttung von proinflammatorischen und regulatorischen Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 induzieren. (Männel et al., 1987; Rietschel et al., 1993a und 1996; Wiese et al., 1999).

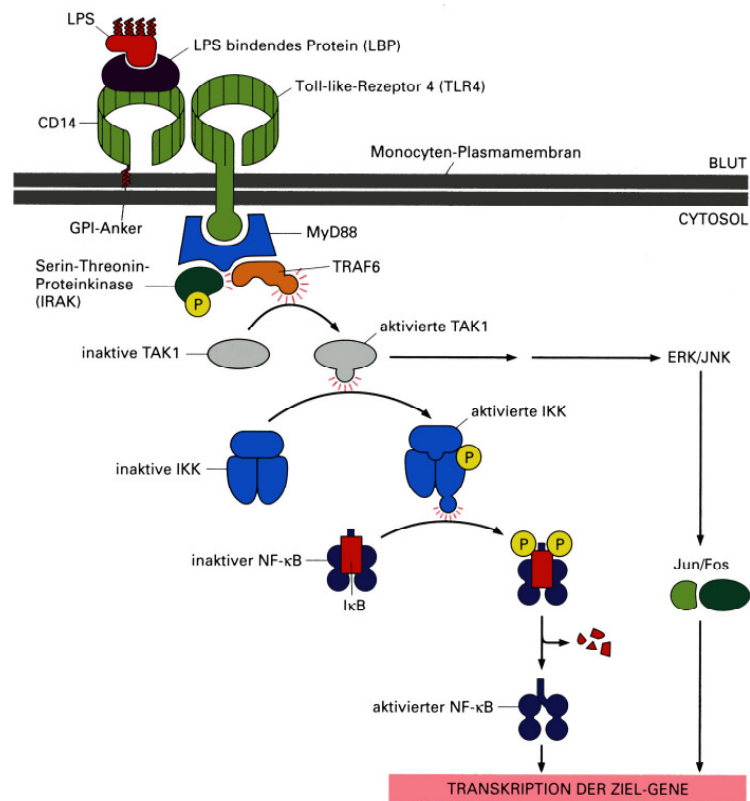


Abbildung 1: Aktivierung eines Monozyten durch LPS.

Das im Blut vorhandene LPS-bindende-Protein (LBP) heftet sich an LPS und bindet dann an den GPI-verankerten Rezeptor CD14 auf der Monozytenoberfläche. Dieser Komplex aktiviert den Toll-Like-Rezeptor (TLR)-4, welcher mit dem Hilfsmolekül MD-2 (nicht in der Abbildung dargestellt) assoziiert ist. Intrazellulär werden daraufhin verschiedene Adaptermoleküle (MyD88, IRAK, TRAF6, TAK1) aktiviert, bis es schließlich zur Aktivierung der IκB-Kinase (IKK) durch TAK1 kommt. IKK phosphoryliert den NFκB-Inhibitor IκB, induziert so seinen Abbau und infolgedessen die Freisetzung von NFκB. Über weitere MAP-Kinasen (ERK und JNK) aktiviert TAK1 außerdem Jun und Fos, Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie. Sie bewirken gemeinsam mit NFκB die Transkription von Genen, deren Translationsprodukte an Immun- und Entzündungsantworten beteiligt sind (Alberts et al., 2004).

An der Interaktion zwischen LPS und Zielzelle sind verschiedene, in Abbildung 1 genannte Moleküle beteiligt. CD14, wohl das bekannteste dieser Moleküle (Wright et al., 1990) kommt sowohl membrangebunden (mCD14) als auch in freier Form vor (sCD14) (Labeta et al., 1993). Exprimiert wird CD14 von Monozyten, Makrophagen, sowie deutlich schwächer auf polymorphkernigen Zellen (Haziot et al., 1993) und auf B-Lymphozyten (Ziegler-Heitbrock et al., 1994). Die Bindung von LPS an CD14 wird durch das Serumprotein LBP (LPS-bindendes-Protein) erleichtert (Schumann et al., 1990; Wright et al., 1990) und bindet

wahrscheinlich am Lipid A des LPS (Tobias et al., 1989). Dabei nimmt LBP die Rolle eines katalytischen Transferproteins ein und bringt LPS-Aggregate zur Zielzelle (Hailman et al., 1994; Yu et al., 1996). Da mCD14 jedoch nicht über eine Transmembrandomäne verfügt, ist es nicht in der Lage, das Zell-aktivierende Signal intrazellulär weiterzuleiten.

Bei den Toll-like-Rezeptoren (TLR) handelt es sich um integrale Membranglykoproteine vom Typ I (Akira et al., 2004). Sie leiten durch PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ausgelöste Signale ins Zellinnere (Anderson, 2000). Bisher wurden mindestens 10 TLR (TLR 1-10) identifiziert. TLR4 gilt als der für die Signalvermittlung durch Endotoxine verantwortliche Rezeptor (Beutler, 2000; Chow et al., 1999). TLR4 alleine ist jedoch nicht in der Lage, als LPS-Rezeptor zu fungieren. Er benötigt zusätzlich das Hilfsprotein MD2 (in Abbildung 1 nicht dargestellt), das mit der extrazellulären Domäne des TLR4 assoziiert ist (Shimazu et al., 1999).

Die Signaltransduktionskaskade beginnt mit der Interaktion von LPS mit dem mit MD-2 und CD14 konjugierten TLR4 und führt über die intrazelluläre Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Dieser ist normalerweise im Cytosol lokalisiert und bildet mit dem Inhibitormolekül I $\kappa$ B einen Komplex. Durch eine Stimulation, z. B. mit LPS, wird I $\kappa$ B phosphoryliert und abgebaut. Das freigesetzte NF $\kappa$ B wandert in den Zellkern und reguliert die Transkription von Genen, die für eine frühe Abwehr- und Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Auf diese Weise kommt es zur Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Hatada et al., 2000).

### 1.5.1.2 Struktur des LPS

Endotoxine bestehen aus einem hydrophilen Heteropolysaccharid, das kovalent an eine Lipidkomponente (Lipid A) gebunden ist (Lüderitz et al., 1982).

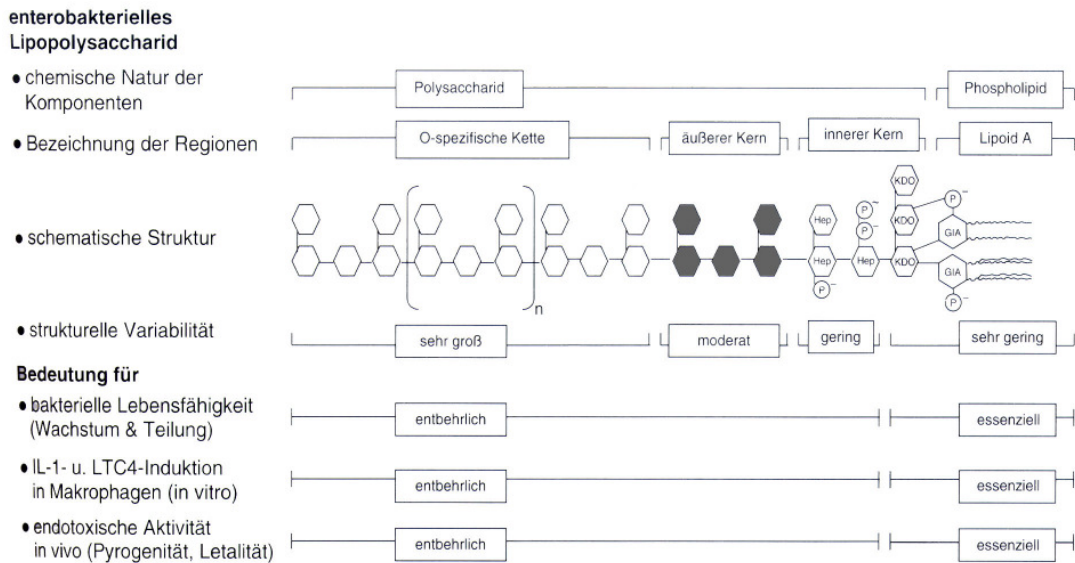


Abbildung 2: Beziehung zwischen chemischer Struktur, biologischer Funktion und endotoxischer Wirkung der Lipopolysaccharide (Rolle et al., 2002).

Die meisten Lipopolysaccharide setzen sich aus der O-spezifischen Kette (O-Antigen), dem Kernoligosaccharid und Lipid A (siehe Abbildung 2) zusammen (Osborn, 1963). Die O-spezifische Kette besteht aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, die so genannten „repeating units“, die wiederum aus bis zu acht verschiedenen Monosacchariden bzw. ihren Derivaten aufgebaut sind (Lüderitz et al., 1982). Aufgrund der vielen verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten hat diese Region eine enorme strukturelle Variabilität. Diese auch als O-Antigen bezeichnete Polysaccharidkette ist von großer Bedeutung für die Induktion und Bindung speziesspezifischer Antikörper und somit verantwortlich für die O-antigenen Eigenschaften der Lipopolysaccharide. Da die chemische Natur charakteristisch für das LPS eines bestimmten Bakteriums ist, stellt das O-Antigen eine Art Fingerprint dieser Spezies dar (Caroff et al., 2003; Rietschel et al., 1993a). Die zu verschiedenen langen Polymeren zusammengeführten Untereinheiten werden an das Kernoligosaccharid angehängt und sind verantwortlich für das charakteristische leiterartige Muster des jeweiligen Endotoxins im SDS-PAGE Gel (Palva et al., 1980). Allerdings verfügen nur die so genannten „Wildtyp-Endotoxine“ („smooth“ (S)) über diese O-spezifische Kette. Spezies, denen diese Komponente fehlt, werden als „rough (R)-Mutanten“ bezeichnet (Seydel et al., 2000a).

Das Kernoligosaccharid besteht aus dem inneren und dem äußeren Kern. (Holst et al., 1992). Der äußere Kern wird auch als Hexoseregion (Rietschel et al., 1993b) bezeichnet, verhält sich nur moderat variabel und setzt sich aus D-Glucose, D-Galactose, N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Galactosamin zusammen. Der innere Kernbereich besteht aus den äußerst seltenen Zuckern L-Glycero-D-Manno-Heptose (Hep) und 2-Keto-3-deoxyoctansäure (Kdo), das eine eher konservierte Struktur mit sich bringt (Brade et al., 1988; Holst et al., 1992). Kdo befindet sich stets am reduzierenden Ende und verbindet somit den Polysaccharidanteil kovalent mit dem Lipidanteil. Ein Heptoserest kann durch ein Phosphat, Pyrophosphat, eine Phosphorylethanolamingruppe oder einen anderen Zucker substituiert sein (Caroff et al., 2003). Bakterien mit einem Defekt in der Kdo-Biosynthese bzw. dem Kdo-Transfer sind nicht lebensfähig und unterstreichen die existentielle Bedeutung von LPS für Bakterien. (Rietschel et al., 1993a und 1994).

Westphal et al. (1954) bezeichneten die Lipidkomponente des LPS als Lipid A. Es ist kovalent mit dem Polysaccharidanteil verbunden und ist die am wenigsten variable Region des Endotoxins. Das Lipid A ist die Komponente des LPS, die es durch hydrophobe sowie elektrostatische Wechselwirkungen in der Außenmembran gram-negativer Bakterien verankert (Lüderitz et al., 1982). Außerdem ist es verantwortlich für die endotoxischen Effekte und wird deshalb auch als „endotoxic principle“ (Rietschel et al. 1987; Seydel et al., 2003; Zähringer et al., 1994) bezeichnet. Vergleicht man die Lipid-A-Komponenten verschiedener gram-negativer Bakterien, stellt man fest, dass sie nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sind und sich aus einem hydrophilen Rückgrat, einer polaren Kopfgruppe, sowie Acyl-Ketten zusammensetzen. Das Lipid A von *E. coli* K12 wird im folgenden beispielhaft zur Darstellung des chemischen Aufbaus verwendet. Das hydrophile Rückgrat von *E. coli* K12 besteht wie bei den meisten bisher untersuchten gram-negativen Bakterien aus einem  $\beta(1\rightarrow6)$  verbundenen D-Glucosamin-Disaccharid, bei dem man zwischen einem nicht-reduzierenden Glucosaminrest GlcN(II) ( $C1'\rightarrow6'$ ) und einem reduzierenden Glucosaminrest GlcN(I) ( $C1-6$ ) unterscheidet (Zähringer et al., 1994). Bei der polaren Kopfgruppe handelt es sich um zwei Phosphatreste an den Positionen  $C4'$  und  $C1$  des Rückgrats. In Lipid A Molekülen anderer Bakterien sind diese jedoch häufig substituiert (Zähringer et al., 1994). Deutliche Unterschiede in den Lipid A-Regionen verschiedener Endotoxine zeigen sich v. a. in den Acylierungsmustern im Bezug auf Länge, Sättigungsgrad, Anzahl und Verteilung. Im



Lipid A von *E. coli* K12 tragen die Positionen C3', C2', C3 und C2 des Diglucosamin-Rückgrats insgesamt vier 3-Hydroxymyristinsäurereste. Da diese direkt mit dem Disaccharid verbunden sind, werden sie als primäre Fettsäuren (Erwin et al., 1990) bezeichnet. Die Hydroxylgruppe der 3-OH-Myristinsäuren an Position C2' von GlcN(II) ist mit Laurinsäure acyliert, die 3-OH-Myristinsäure an Position C3' ist mit Myristinsäure acyliert (4+2-Konfiguration) (Zähringer et al., 1994).

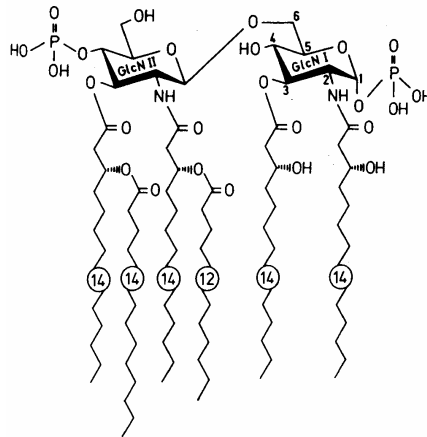


Abbildung 3: Lipid A von *E. coli* K12 (Müller-Loennies et al., 2003). GlcN(I): reduzierender Glucosaminrest, GlcN(II): nicht-reduzierender Glucosaminrest

Das Lipid A von *E. coli* Nissle entspricht, bezüglich seiner chemischen Zusammensetzung, dem Lipid A von *E. coli* K12 (Abbildung 4).

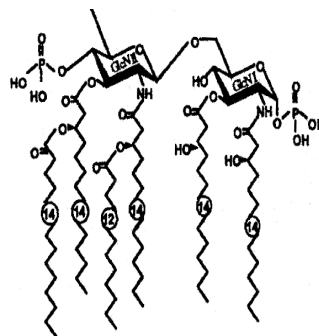


Abbildung 4: Lipid A von *E. coli* Nissle 1917 (Grozdanov et al., 2002).

Auch das Lipid A von *S. Typhimurium* ist größtenteils genauso zusammengesetzt wie das von *E. coli* K12. Darüber hinaus gibt es jedoch auch Lipid A Moleküle mit einem Phosphatrest an Position C4' (Abbildung 5) (Qureshi et al., 1983).

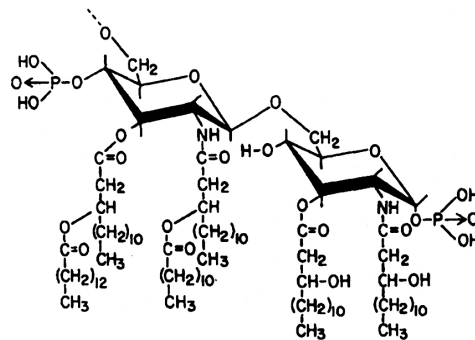


Abbildung 5: Lipid A des Hauptanteils von *S. Typhimurium* (Qureshi et al., 1983).

Im Unterschied zu *E. coli* K12, *E. coli* Nissle und *S. Typhimurium* ist das Lipid A von *B. fragilis* (siehe Abbildung 6) nur an Position C1 monophosphoryliert. Außerdem unterscheidet es sich hinsichtlich seines Acylierungsmusters deutlich, so dass insgesamt nur fünf Fettsäuren am Disaccharid-Rückgrat hängen. An den Positionen C2 und C3' befindet sich jeweils eine 3-OH-Palmitinsäure. Während sich an Position C3 eine 3-OH-Pentadecansäure und an Position C2' eine isoverzweigte 3-OH-Heptadecansäure befindet, ist diese die wiederum mit einer isoverzweigten Pentadecansäure acyliert. Das Lipid A-Muster des *B. fragilis* ähnelt dem des in der vorliegenden Arbeit verwendeten *B. vulgatus*. Einzig der relative Anteil an isoverzweigter 3-OH-Pentadecansäure ist beim Lipid A des *B. vulgatus* höher (Wollenweber et al., 1980, Zähringer et al., 1994).

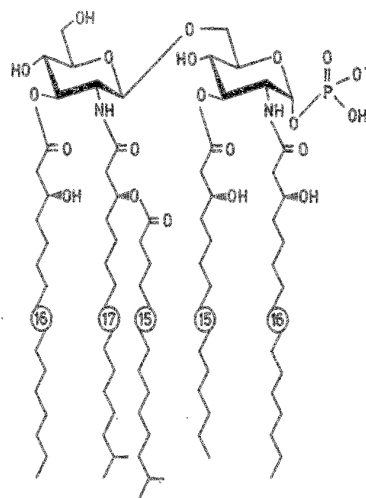


Abbildung 6: Chemische Struktur des Hauptanteils des Lipid A von *B. fragilis* NCTC 9434-LPS (Zähringer et al. 1994).

Müller et al. (2004) sehen in den Aggregaten aus mehreren Endotoxinen und nicht den Monomeren die biologisch aktiven Einheiten des Endotoxins. Diese entstehen ab einer bestimmten Konzentration, der so genannten CMC (Critical Micellar Concentration), welche sowohl für Lipid A als auch für LPS gilt. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters bilden Endotoxine dreidimensionale Aggregate, die sich in dynamischem Gleichgewicht mit den Monomeren befinden. Die Aggregat-Struktur ist abhängig von der Form der einzelnen Moleküle, die sich wiederum aus der chemischen Struktur ergibt. So bilden konische LPS-Moleküle kubische Aggregate, wohingegen lamelläre Aggregate von zylindrischen Molekülen geformt werden (Seydel et al., 1993; Wiese et al., 1999). Die Endotoxizität ist bei den hexagonalen Aggregaten, die aus hexaacylierten, assymetrischen Lipid A entstehen am höchsten (Seydel et al., 2000b; Brandenburg et al., 2004).

### 1.5.2 Lipoteichonsäure (LTA)

Im Gegensatz zu den gram-negativen Bakterien verfügen die gram-positiven Spezies nicht über eine äußere Membran. Ihre Peptidoglycanschicht ist um das bis zu 10fache dicker als die von gram-negativen Bakterien und oft sind anionische Polymere wie Teichuronsäuren und Teichonsäuren enthalten. Bei letzteren handelt es sich um saure Polysaccharide, die aus Glycero- oder Ribitolresten bestehen und über Phosphatester verknüpft sind. Nicht selten ist dieses Polyalkohol-Phosphat-Gerüst mit anderen Zuckern oder Aminosäuren bestückt.

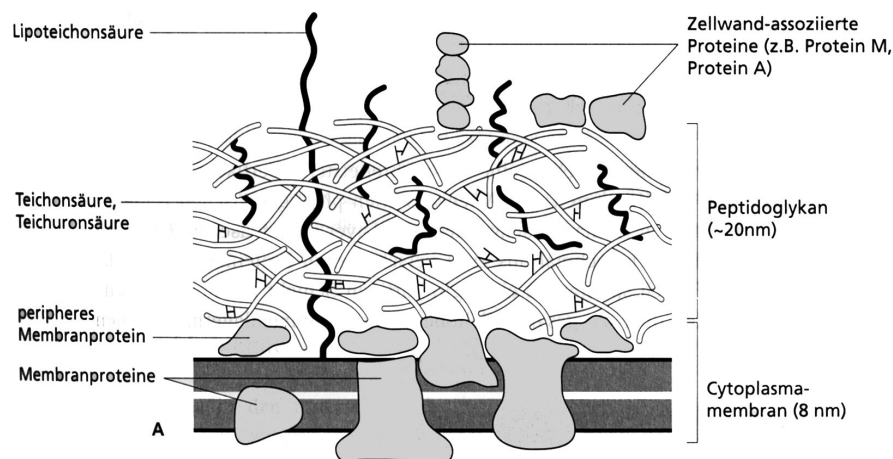


Abbildung 7: Aufbau der Zellwand gram-positiver Bakterien (Munk, 2001).

Lipoteichonsäuren bestehen aus mit Teichonsäuren verknüpften Phospholipiden, wobei der Lipidanteil in der Cytoplasmamembran verankert ist. Sowohl Teichonsäuren als auch Lipoteichonsäuren bewirken eine negative Oberflächenladung (Munk, 2000; Wilson et al., 2002).

Lipoteichonsäuren werden als das immunstimulatorische Pendant zum LPS der gramnegativen Bakterien betrachtet. Ähnlich wie LPS präsentieren sie dem Wirt Muster zur Immunerkennung (Deininger et al., 2003) und sind somit in der Lage, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu initiieren (Wilson et al., 2002). Die Erkennung der LTA durch die Zielzellen (z. B. Makrophagen) erfolgt hauptsächlich über den mit CD14 assoziierten TLR2. Das mit TLR2 konjugierte MD2 verstärkt die Antwort des Rezeptors. Im Gegensatz zu TLR4 ist TLR2 jedoch in der Lage, die Signaltransduktion auch ohne dieses Hilfsmolekül einzuleiten (Dziarski et al., 2000). Intrazellulär erfolgt die Aktivierung verschiedener Adaptermoleküle und schließlich die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern (Akira et al., 2004).

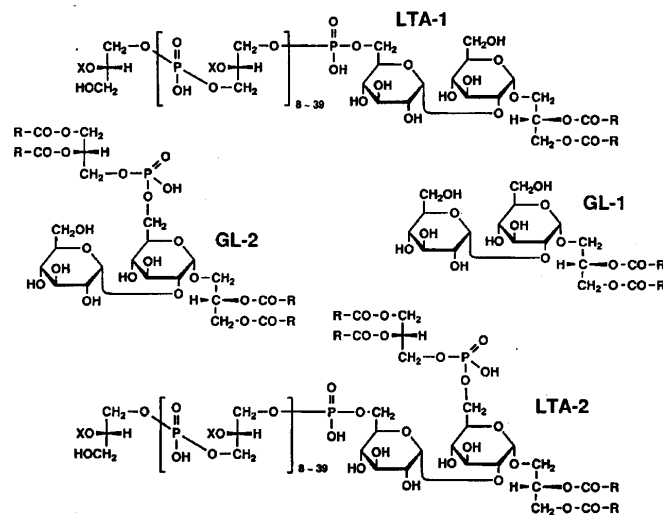


Abbildung 8: Chemische Strukturen der LTA-1 und LTA-2 und deren Glycolipid-Anteil von *Enterococcus hirae* (vorgeschlagen von Fischer, 1990). LTA: Lipoteichonsäure; GL: Glycolipid; X: Mono-, Di-, Tri- oder Tetra- $\alpha$ -Glycosyl-Rest; R: Acyl-Gruppe

## 1.6 Stimulationswege an der Mucosa

Unter den unzähligen Wirkungen von probiotischen und kommensalen Bakterien gibt es inzwischen auch verschiedenen Studien zur Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts. Dennoch ist bisher wenig über die molekularen Mechanismen, die diese Wechselwirkungen zwischen Wirt und Flora an der Mucosa vermitteln bekannt.

Um die darmassoziierte Immunantwort zu beeinflussen, bedarf es zunächst eines Kontakts zwischen Bakterien (probiotisch oder kommensal) bzw. bakteriellen Komponenten (z. B. Metaboliten, Zellwandkomponenten oder DNA) und den Immunzellen mit den entsprechenden Rezeptoren (vgl. Abbildung 9). Die Vielzahl der immunologischen Reaktionen des intestinalen Epithels zeigen, dass der Kontakt der Bakterien mit den Epithelzellen in der Lage ist, Signalkaskaden in Gang zu setzen und damit die darunter liegenden immunkompetenten Zellen der Lamina Propria zu stimulieren. Des weiteren sind auch von Bakterien abgegebene lösliche Faktoren in der Lage, diese Signalkaskaden im intestinalen Epithel oder dem assoziierten Immunsystem zu aktivieren (Madsen et al., 2001; Menard et al., 2004; Hoarau et al., 2006). Verschiedene *in-vitro-Studien* mit vereinfachten Modellen des Gastrointestinaltrakts dienen als Instrument zur Identifizierung möglicher Signalwege und molekularer Marker. Dabei konnte durch verschiedene probiotische Stämme eine Regulation der Sekretion verschiedener Zytokine (pro- und antiinflammatorisch) v. a. in Kokulturen aus intestinalen Zelllinien und Immunzellen gemessen werden (Haller et al., 2000).

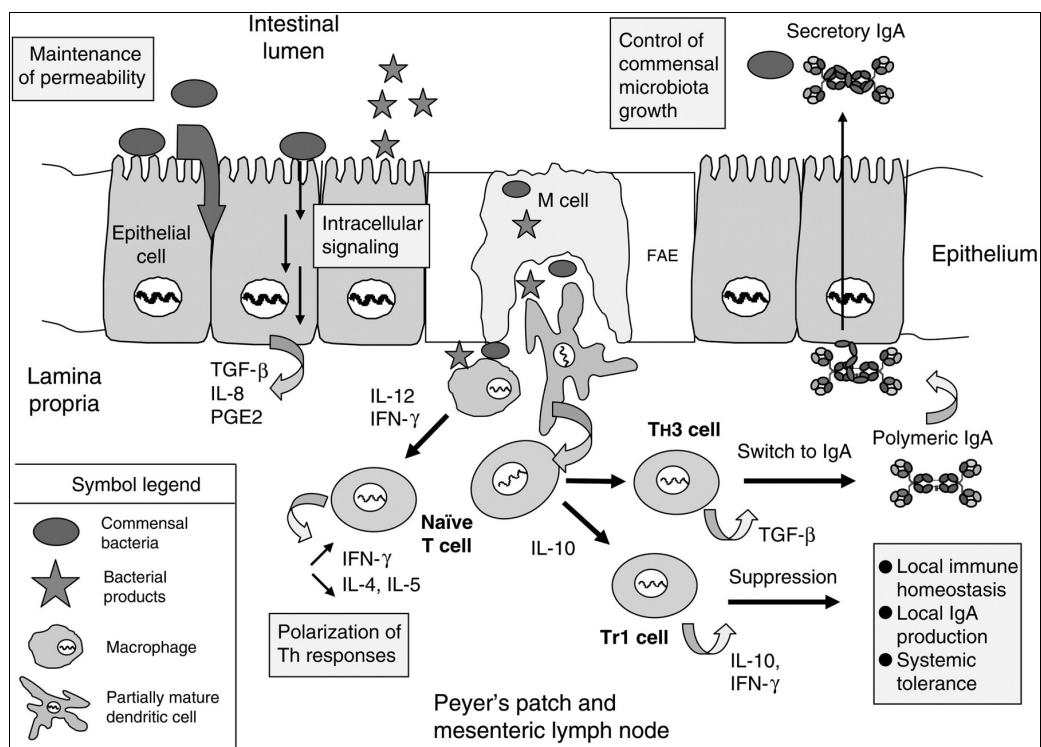


Abbildung 9: Schematische Darstellung der vielfältigen Wechselwirkungen und Folgen zwischen Bakterien und intestinaler Mucosa (Corthesy et al., 2007).

Beim Erwerb und der Aktivierung des intestinalen Immunsystems spielt die Translokation von Bakterien in die mesenterischen Lymphknoten eine zentrale Rolle (Berg et al., 1995; Berg et al., 1999; Gautereaux et al., 1994). Diese erfolgt über dendritische Zellen, die zum einen an den Epithelzellen vorbei, Bakterien aus dem Lumen sammeln (Rescigno et al., 2001) oder über dendritische Zellen, die Bakterien, die aufgrund verringerter Barriereintegrität durch die Epithelzellschicht in die Lamina Propria translociert sind, aufnehmen. Eine andere Möglichkeit, die epitheliale Barriere zu überwinden besteht in der Adhäsion an M-Zellen, die die Peyer'schen Plaques bedecken. Dort nehmen CD 11c<sup>+</sup> dendritische Zellen die Bakterien in der subepithelialen Domregion auf und aktivieren die IgA Antwort (MacPherson und Uhr, 2004). Da diese dendritischen Zellen in die mesenterialen Lymphknoten wandern ist gewährleistet, dass es zu einer lokalen Induktion der Immunantwort kommt, die die Penetration von Kommensalen eindämmt und eine systemische Immunreaktion unterbindet. Die immunkompetenten Zellen des Gastrointestinaltrakts sind zu einem großen Teil Subpopulationen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Davon wurden Th3, Tr1 und CD25<sup>+</sup> als an der Homöostase des GIT beteiligte CD4<sup>+</sup> T-Zellen genannt (Mowat et al., 2003). In Tierversuchen konnte ein prozentualer Anstieg CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria sowie eine Senkung der T-Zell-Reaktivität durch verschiedene Lactobacillen Stämme gezeigt werden (Herias et al., 1999; Kirkjavainen et al., 1999). Induziert wird diese T-Zell Reaktion durch lokale dendritische Zellen, die mit den entsprechenden T-Zellen interagieren (Kesall et al., 2002), wobei entgegengesetzt auch regulatorische T-Zellen mit dendritischen Zellen interagieren deren Reifung hemmen und so zu Toleranz führen (Veldhoen et al., 2006). Allerdings scheint die Regulation der oralen Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien über dendritischen Zellen und T-Zellen z. B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht zu funktionieren. Jedoch konnte mittels *in-vitro*-Versuchen gezeigt werden, dass dendritische Zellen bei Exposition mit probiotischen Bakterien regulatorische T-Zellen zur IL-10 Produktion anregen (Smits et al., 2005) und damit das Entzündungsgeschehen drosseln.

In diversen Experimenten mit gnotobiotischen Versuchstieren konnte die Relevanz von kommensalen Bakterien, auch einzelnen Bakterienspezies, für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems gezeigt werden (Cebra et al., 1999; Hooper et al., 2002; Yamanaka et al., 2003). Bekannt ist bisher, dass verschiedene PAMPs durch Rezeptoren der TLR-Familie erkannt werden und die entsprechende Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Beispielsweise ist die Lipoteichonsäure gram-positiver

Bakterien in der Lage via TLR2 eine zelluläre Immunantwort auszulösen (Schröder et al., 2003). Dagegen zeigte Travassos et al. (2004) dass das Peptidoglycan gram-positiver Bakterien nicht durch TLR2, TLR2/1 oder TLR2/6 erkannt wird, sondern diese Signalvermittlung für Peptidoglycan wahrscheinlich über intrazelluläre Rezeptoren der NOD-Familie erfolgt. Außerdem wurde von Mazmanian et al. (2005) eine Beeinflussung der Entwicklung des Immunsystems durch das zwitterionische Oberflächenpolysaccharid (PSA) des ubiquitär im Gastrointestinaltrakt vorkommenden *Bacteroides fragilis* gezeigt. Auch die DNA von Bakterien ist in der Lage, beispielweise die TNF- $\alpha$  Produktion in IL-10 Knock-out Mäusen zu reduzieren (Jion et al., 2004). Nicht bekannt ist jedoch, welche antigenen Komponenten der bakteriellen Zellwand und in welchem Ausmaß eine „physiologische Entzündung“ bewirken, die als stabiles Gleichgewicht zwischen Wirt und bakterieller Flora anzusehen ist.





## 2 Fragestellung der Arbeit

Die Mucosa des Gastrointestinaltrakts hat eine Schlüsselrolle im darmassoziierten Immunsystem inne. Dabei fungiert u. a. das Epithel als Barriere gegen ein Eindringen von Bakterien und gleichzeitig als Sensor des mucosalen Immunsystems, das selektiv auf pathogene bzw. kommensale Bakterien reagiert. Die physiologische Relevanz von kommensalen Bakterien in der Signalvermittlung des intestinalen Epithels zeigten Haller et al. (2002b und 2003) die eine, durch garm-negative, nichtpathogene Bakterien der Darmflora induzierte schnelle, temporäre Aktivierung sowohl der intestinalen Epithelzellen als auch der subepithelialen Leukozyten messen konnten. Demnach haben die vielfältigen Effekte von probiotischen und kommensalen Bakterien auf verschiedene gastrointestinale und extraintestinale Erkrankungen ihren Ursprung u. a. im Kontakt mit der Mucosa und der daraus resultierenden Signalweitergabe.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung probiotischer, kommensaler, pathogener und lebensmitteloriginärer Bakterien und deren Oberflächenbestandteile auf die Mucosa untersucht werden. Dabei wurde insbesondere die immunrelevante Wirkung von probiotischen, kommensalen, pathogenen und lebensmitteloriginären Bakterien auf die Aktivierung der Epithelzellen und der darunter lokalisierten Lymphozyten untersucht. Weitere Schwerpunkte der Arbeit waren die Ursachen und die Reihenfolge der Aktivierung. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich in einem Kokulturmodell durchgeführt, bei dem eine konfluente Schicht aus differenzierten intestinalen Epithelzellen das apikale (=Darmlumen) von einem basolateralen (=Blutseite) Kompartiment trennt.

Folgende Hypothesen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- Findet in dem verwendeten *in-vitro*-Kokulturmodell eine Adaptationsphase der Leukozyten an die Enterozyten statt?
- Haben probiotische Bakterien ein höheres Stimulationspotential auf Enterozyten-Leukozyten-Kokulturen als kommensale oder lebensmitteloriginäre Bakterien?
- Haben der gram-negative probiotische *E. coli* Nissle im Vergleich zum nichtpathogenen *E. coli* K12 und dem enteropathogenen *E. coli* EPEC unterschiedliche Stimulationspotentiale im Kokulturmodell?

## FRAGESTELLUNG

- Vermitteln Lipopolysaccharide (LPS) bzw. Lipoteichonsäuren (LTA) die immunstimulierenden Eigenschaften von *E. coli* und *B. vulgatus* bzw. *E. faecalis* in Kokulturen aus Enterozyten und Leukozyten?
- Ist die Stimulationsfähigkeit der verschiedenen Endotoxine im Kokulturmodell abhängig von der Struktur und von der mittleren Molmasse des Lipid A?
- Vermitteln Enterozyten die Aktivierung von kokultivierten PBMC?
- Lässt sich durch den parallelen Zusatz von nicht stimulierenden Bakterien bzw. LPS eine Immunstimulation inhibieren?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Im folgenden sind die verwendeten Chemikalien zusammengefasst.

##### Zellkultur Isolierung der PBMCs

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom, Berlin
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
DMEM High Glucose (1x)	PAA Laboratories, Pasching
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching
Dulbecco's PBS (10x) (Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, A
NEAS (10x) (Non Essential Amino Acids)	PAA Laboratories, Pasching
Gentamycin	Life Technologies, Paisley
Tetracyclin	Sigma, München
Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (M <sub>r</sub> 4400)	Sigma, München
Polymyxin B-Sulfat	Sigma, München
Colistin-Sulfat	Sigma, München
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma, München
Aqua Spüllösung (pyrogenfrei)	Deltaselect GmbH, Dreieich
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Buraton 10 F	Schülke & Mayr, Norderstedt
Antiendotoxin monoclonal Antibody E5 <sup>®</sup>	Xoma Corporation, Berkeley, CA
RPMI 1640 ohne Phenolrot, ohne Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
Biocoll (1.077g/mL)	Biochrom, Berlin
2-Propanol	Roth, Karlsruhe

##### Kultivierung von Bakterien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
BHI (Hirn-Herz-Bouillon)	Merck, Darmstadt
Anaerokult A	Merck, Darmstadt
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	Merck, Darmstadt
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
CMM (Difco Cooked Meat Medium)	Difco Laboratories, Detroit USA
Schaedler-Agar (+Vitamin K1 und 5% Schafsblut)	Becton & Dickinson, Sparcks
Hefe-Extrakt	Fluka, Buchs, CH
Anaerobic Indicator BR55	Oxoid United, Basingstoke,
Resazurin	Sigma, München

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
MRS Trockennährmedium	Merck, Darmstadt
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit USA
Cryobank	Mast Diagnostica, Bootle (Merseyside), GB

## LPS-Isolierung

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton (ROTISOLV, HPLC)	Roth, Karlsruhe
Diethylether (>99,8%)	Fluka, Buchs, CH
Phenol	Fluka, Buchs, CH
Flüssigstickstoff	

## SDS-PAGE Gelelektrophorese

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka, Buchs, CH
Sodium-Dodecylsulfat	Fluka, Buchs, CH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Fluka, Buchs, CH
Glycin	Fluka, Buchs, CH
HCl	Fluka, Buchs, CH
Essigsäure	Fluka, Buchs, CH
Periodsäure	Fluka, Buchs, CH
NaOH	Fluka, Buchs, CH
Butanol	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Ammoniak (25%)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37,5%	Merck, Darmstadt
Triethylamin	Riedel-de Haen, Seelze

## LPS-Messung (LAL)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
LAL-Kit (Endochrome K)	Charles River, Sulzfeld
LAL-Standard	
Wasser, endotoxinfrei	
LAL-Reagenz	

## ELISA

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 25% (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Fluka, Buchs, CH
Tween 20®	Fluka, Buchs, CH
HCl	Fluka, Buchs, CH
NaOH	Fluka, Buchs, CH
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching
OptEIA™ Set: Human TNFα	Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA™ Set: IL 8	Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA™ Set: IL 6	Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA™ Set: IL 10	Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA™ Set: INF γ	Pharmingen, San Diego, USA
TMB Substrate Reagent Set	BD/Pharmingen, Heidelberg

## HPLC

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril (getrocknet)	Merck, Darmstadt
Acetonitril für die HPLC	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	Roth, Karlsruhe
Methanol Rotisolv HPLC	Roth, Karlsruhe
9-Anthroylchlorid	PD Dr. A. Parlesak
3-Hydroxymyristinsäureethylester	PD Dr. A. Parlesak
3-Hydroxypentadecensäureethylester	PD Dr. A. Parlesak
3-9(anthroyl)-myristinsäureethylester	PD Dr. A. Parlesak
Triethylamin	Riedel-de Haen, Seelze
Methanolische HCl	Katja Hübner

## mRNA-Isolierung

Chemikalien	Hersteller
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform (99%, reinst)	Roth, Berlin
Ethanol (99,8%)	Roth, Berlin
2-Propanol (99,7%)	Roth, Berlin

## cDNA-Synthese

Chemikalien	Hersteller
Random Primer (3µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)	Invitrogen, Karlsruhe
5 x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase (200U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleotidtriphosphat dNTP Mix (10 mM)	Eppendorf, Hamburg

## PCR-Analyse und Gelelektrophorese

Chemikalien	Hersteller
Hot-Master-Taq-Polymerase (5U/µl)	Eppendorf, Hamburg
10 x Hot-Master™-PCR-Buffer (pH 8,5; 25mM Mg <sup>2+</sup> )	
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules California, USA
QuantumRNA™ Classic 18S Internal Standard	Ambion, Huntingdon
Primer der Ziel-DNA (forward, reverse)	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Standard-Ladder (100 bp)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Fluka, Buchs, CH
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Agarose	SeaKem, Rockland
Tris	ICN Biomedicals, Aurora
Borsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe

## 3.1.2 Biologische Materialien

Im folgenden sind die verwendeten biologische Materialien zusammengefasst.

Biologisches Material	Herkunft
Buffy Coats (heparinisiert, zellangereichertes Blutplasma)	Blutzentrale Katharinenhospital, Stuttgart
Kolorektale Adenokarzinom Zelllinie CaCo-2 (ACC 169)	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
<i>B. vulgatus</i> MPK	Prof. Dr. Autenrieth, Tübingen
<i>B. vulgatus</i>	Prof. Dr. Autenrieth, Tübingen
<i>Lb. acidophilus</i> LTH 479	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>Lb. rhamnosus</i> GG LTH 5275	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>Lb. casei</i> shirota	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>Lb. sakei</i>	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	Nestlé, Lousanne, CH
<i>B. bifidum</i> LTH 4675	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>E. faecalis</i>	Prof. Haller, TUM Weihenstephan
<i>E. coli</i> K12	Stammsammlung Prof. Dr. Hammes, Uni-Hohenheim
<i>E. coli</i> Nissle	
<i>E. coli</i> EPEC	
LPS <i>E. coli</i> K12	Eigenisolat

<b>Biologisches Material</b>	<b>Herkunft</b>
LPS <i>B. vulgatus</i>	Eigenisolat
LPS <i>E. coli</i> Nissle	Eigenisolat v. PD Dr. A. Parlesak
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	Eigenisolat v. S. Ackermann
LPS <i>S. Typhimurium</i>	Sigma, München
LPS <i>E. coli</i> 0111 B4	Sigma, München
LTA von <i>Str. faecalis</i>	Sigma, München

### 3.1.3 Geräte

Im folgenden sind die verwendeten Geräte zusammengefasst.

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugvorrichtung (Vakuumpumpe)	Vacuubrand, Wertheim
Analysenwaage ( $\pm 0,01\text{mg}$ )	Sartorius, Göttingen
Autoklav, SANOclav	Wolf, Bad Überkingen- Hausen
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Bunsenbrenner „Fireboy plus“	Intagra Biosciences
Cary UV-Visible Spectrophotometer	Varian
Digitale Kamera E.A.S.Y. 440K	Herolab
Digitalwaage ( $\pm 10\text{mg}$ )	Kern, Albstadt
Elektrophorese Power Supply, EPS 600	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Elektrophoresekammer Desaphor VA	Desaga GmbH, Heidelberg
Elektrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Extinktions-Mikrotiterplattenreader „16 940“	Tecan SLT- Labinstruments, Crailsheim
FLUOstar	BMG Labtech GmbH,Offenburg
Gelkammern	Peqlab
Geltrockner „Drystar“	Hölzel GmbH, Würth
Heizpilz	Heraeus-Wittmann, Heidelberg
Hitzesterilisationsofen	Memmert, Schwabach
HPLC-Pumpe L 6200 A Intelligent pump i-Cycler	Merck Hitachi
Lyophilisator „Freezemobile 25 EL“	Bio-Rad Laboratories, Hercules California, USA
pH-Meter	Virtis, New York
Pipettus	Beckman, IL, USA
THERMOstar	Hirschmann, Eberstadt
RF 1002 Fluoreszenz Spektralphotometer	BMG Labtech GmbH,Offenburg
Schüttelwasserbad	Gynkotek GmbH, Germering
Schüttler IKA Vibrax VXR	Memmert, Schwabach
Shimadzu Autosampler mit SCL-6B System Controller	IKA Labortechnik, Janke&Kunkel GmbH, Staufen
Sterilbank Biosafe 2	Shimadzu, Darmstadt
Stoppuhr	Ehret, Emmendingen
	Junghans

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Thermocycler: Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler: Robocycler® 40 Accessoires	Stratgene
Tischzentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sanorex Super RK 510H	Bandelin
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, Staufen
Ultrazentrifuge L7	Beckman, IL, USA
Unterlichtmikroskop	Olympus, Japan
Vortexer	Scientific Industries
Wärmeblock	Gebr. Liebisch, Bielefeld
Washer "Columbus"	Tecan SLT- Labinstruments, Crailsheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Widerstandsmessgerät Millicell-ERS (Voltmeter/Ohmmeter)	Millipore, Eschborn
Zentrifuge GS-6R	Beckman, IL, USA

### 3.1.4 Software

Im folgenden ist die verwendete Software zusammengefasst.

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
MS-Office-Paket (Word; Excel; Power Point)	Microsoft GmbH
Statistica Version 6.0	StatSoft, Inc., Tulsa
Slide Write V6 32 Bit-Version	Advanced Graphics Software, CA
Photometer Software (easykin)	SLT, Crailsheim
Chromatographie Datensystem Gynko Soft (Version 5.21)	Gynotek GmbH, Germering
i-Cycler™ iQ Version 3.0a	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California USA
TINA 2.09g	raytest Isotopenmessgeräte GmbH



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterien

Nachfolgend werden die Zusammensetzung der Medien, die Bedingungen zur Anzucht und Lagerung, sowie die Ermittlung und Einstellung der Keimzahl dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Medien zur Anzucht von verschiedenen Bakterien.

BHI-Medium			MRS Medium		
	Bouillon	Agar		Bouillon	Agar
BHI-Broth	37 g		MRS-Broth	55 g	
HCl-Cystein	0,5 g		HCl-Cystein	0,5 g	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	
Agar-Agar	-	15 g	Agar-Agar	-	18 g
pH	7,4 ± 0,2		pH	6,5	

CMM-Bouillon			LB-Medium		
	Bouillon			Bouillon	Agar
CMM-Medium	12,5 g		Trypton	37 g	
Hefe-Extrakt	0,5 g		Hefeextrakt	5 g	
HCl-Cystein	0,05 g		NaCl	5 g	
Resazurin	0,1 mg		ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g		Agar-Agar	-	15 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml		pH	7.0 +/- 0,2	

#### 3.2.1.1 Anzucht und Lagerung

##### Anzucht

*E. coli* und *E. faecalis*

Je eine Perle mit anhaftenden kryokonservierten Bakterien wurde steril in 10 ml LB-Bouillon überführt und gut suspendiert. Davon wurden aus 0,1 ml auf LB-Agar und Schädler Blutagar ein Reinigungsausstrich angefertigt und aerob bei 37 °C bebrütet. Die *E. coli* Bakteriensuspension wurde über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37 °C, die *E. faecalis* Suspension im Brutschrank aerob bei 37 °C bebrütet. Alle zwei bis vier Wochen wurden die zwischenzeitlich im Kühlschrank aufbewahrten Stämme auf neue LB-Agar-Platten subkultiviert.

### Lactobazillen und Bifidobakterium

Die kryokonservierten Lactobacillen und Bifidobakterien wurden in je 10 ml MRS-Bouillon suspendiert. Von den Suspensionen wurden ebenfalls Reinigungsausstriche auf MRS Agar angefertigt. Sowohl die Reinigungsausstriche als auch die Bakteriensuspensionen wurden 24 bis 48 h bei 37 °C anaerob bebrütet. Alle zwei bis vier Wochen wurden die Stämme subkultiviert.

### *Bacteroides* spp.

Die kryokonservierten *Bacteroides* spp. wurden zunächst in anaerobes CMM-Medium überführt und anschließend 48 h anaerob bei 37 °C bebrütet. Dann wurde das bewachsene CMM-Medium aufgeschüttelt und 0,1 ml davon in zuvor anaerob inkubierte (12 h, Raumtemperatur) BHI-Bouillon überimpft. Darüber hinaus wurden auf je 2 Platten BHI-Agar und 2 Platten Schädler-Blutagar Reinigungsausstriche mit 0,1 ml bewachsenem CMM-Medium durchgeführt und erneut 48 h anaerob bei 37 °C bebrütet. Die *Bacteroides* spp. wurden einmal pro Woche auf Schädler Blutagar und BHI Agarplatten subkultiviert und 48 h bei 37 °C anaerob bebrütet.

### **Lagerung**

Zur dauerhaften Lagerung wurde je eine Kolonie mit Hilfe des Cryobanksystems von Mast Diagnostica in einem Kryoröhrchen mit Gefriermedium und bakterienbindenden Perlen suspendiert. Das Gefriermedium wurde anschließend abpipettiert und die Kugeln mit den anhaftenden Bakterien in einer Kryogefrierbox bei – 80 °C gelagert.

#### **3.2.1.2 Ermittlung der Keimzahl bei entsprechender optischer Dichte**

Zur Ermittlung der optischen Dichte ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) bei einer Keimzahl von  $1 \times 10^8$  KBE nach definierten Anzuchtbedingungen wurden verschiedene optische Dichten sowohl in Verdünnungsreihen ausplattiert, bei entsprechenden oben beschriebenen Anzuchtbedingungen kultiviert und nach 24 bis 48 h Inkubationszeit ausgezählt, als auch die Keimzahl in der Thomae Zählkammer ermittelt. Die dadurch für jeden Stamm ermittelte optische Dichte für  $1 \times 10^8$  KBE wurde durch mehrmaliges Einstellen auf die entsprechende optische Dichte und ausplattieren validiert.

Dabei ergaben sich für  $1 \times 10^8$  KBE die in Tabelle 3 aufgeführten optischen Dichten für die entsprechenden Bakterien.

Tabelle 3: Optische Dichten der verschiedenen zur Stimulation eingesetzten Bakterien bei einer Keimzahl von  $1 \times 10^8$  KBE.

Bakterium	Optische Dichte ( $\lambda = 600$ nm)	
	bei $1 \times 10^8$ KBE	bei $1 \times 10^9$ KBE
<i>E. coli</i> K12	0,150	n.a.
<i>E.coli</i> Nissle	0,150	n.a.
EPEC	0,150	n.a.
<i>E. faecalis</i>	0,040	n.a.
<i>Lb. acidophilus</i>	0,400	n.a.
<i>Lb. casei</i> shirota	0,300	n.a.
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	0,350	3,500
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	0,500	n.a.
<i>Lb. sakei</i>	2,300	n.a.
<i>B. bifidum</i>	0,030	n.a.
<i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	0,040	n.a.
<i>B. vulgatus</i> MPK	0,010	n.a.

Anmerkung: n.a. = nicht anwendbar

### 3.2.1.3 Einstellen der Keimzahl auf $1 \times 10^8$ KBE zur Stimulation im Kokulturmodell

Alle Bakterien wurden je nach nötiger Inkubationszeit zwei bis vier Tage vor dem Versuchstag auf dem jeweils geeigneten Agar (vgl. 3.2.1.1) neu angesetzt und bei entsprechenden Anzuchtbedingungen inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Anzuchtschritt in Flüssigmedium und die eigentliche Anzucht in Flüssigmedium für den Versuch an. Zur Voranzucht wurde eine Kolonie von der Platte in jeweils 10 ml Flüssigmedium überimpft. Aus der Voranreicherung wurden dann 100  $\mu$ l Bakteriensuspension in wiederum je 10 ml Flüssigmedium überimpft. Die genauen Bedingungen für diese beiden Anzuchtschritte für die jeweiligen Bakterien sind Tabelle 4 zu entnehmen. EPEC und *E. coli* Nissle wurden am Versuchstag frisch angezchtet und in PBS gelöst von Dr. Wehkamp (Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart) bezogen.

Tabelle 4: Voranzuchts- und Anzuchtsbedingungen der Bakterien zur Stimulation im Kokulturmodell

	Voranzucht		Anzucht für den Versuch	
	Medium	Kulturbedingung	Medium	Kulturbedingung
<i>E. coli</i> K12	LB-Bouillon	37 °C, aerob, ÜN <sup>1)</sup>	LB-Bouillon	37 °C, aerob, 5 h
<i>E. faecalis</i>	LB-Bouillon	37 °C, aerob, ÜN <sup>1)</sup>	LB-Bouillon	37 °C, aerob, 24h
<i>Lb. acidophilus</i>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, ÜN <sup>1)</sup>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>Lb. casei</i> shirota	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 48 h	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, ÜN <sup>1)</sup>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, ÜN <sup>1)</sup>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, ÜN <sup>1)</sup>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>Lb. sakei</i>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, ÜN <sup>1)</sup>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>B. bifidum</i>	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 48 h	MRS-Bouillon	37 °C, anaerob, 24h
<i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	BHI-Medium	37 °C anaerob, 48 h	BHI-Medium	37 °C anaerob, 24h
<i>B. vulgatus</i> MPK	BHI-Medium	37 °C anaerob, 48 h	BHI-Medium	37 °C anaerob, 24h

<sup>1)</sup> = über Nacht

Nach der Anzucht wurden die Bakteriensuspensionen bei 3500 rpm zentrifugiert und zwei mal mit 20 ml sterilem PBS gewaschen. Die Bakterienpellets wurden in 10 ml antibiotikumfreiem Medium aufgenommen und die optische Dichte eingestellt.

### 3.2.2 LPS

Zur Isolation von LPS wurden Übernachtskulturen hergestellt.

#### 3.2.2.1 Isolation

##### Gewinnung der Bakterientrockenmasse

Zunächst wurden die Bakterien bei 3.500 rpm, (Bremse „low“) 30 min lang abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets zweimal mit je 20 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss daran folgten zwei Waschgänge mit je 20 ml Aceton und schließlich einer mit 20 ml Diethylether (Westphal O. et al., 1954). Nach jedem Waschschrift wurde die Bakterienmasse mit 3.500 rpm, 30 min, Bremse „low“ herunterzentrifugiert. Die so gewonnenen Pellets wurden zerkleinert und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

##### LPS-Extraktion aus der Bakterientrockenmasse

Die Extraktion der Endotoxine erfolgte nach Westphal et al. (1954) modifiziert durch Parlesak. Zur Extraktion des LPS aus der Bakterientrockenmasse wurden je 20 ml auf 67 °C im Wasserbad

vorgewärmtes Phenol und ddH<sub>2</sub>O zu den getrockneten, fein zerkleinerten Bakterienpellets hinzugefügt und diese Mischung 5 min bei 67 °C im Ultraschallbad geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch im Eisbad auf 12 °C abgekühlt und in der auf 12 °C vorgekühlten Zentrifuge 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abpipettiert und gesammelt. Die Phenol-Bakterien Mischung wurde erneut mit 20 ml (67 °C) warmem ddH<sub>2</sub>O versetzt, fünf Minuten im Ultraschallbad bei 67 °C geschüttelt, im Eisbad auf 12 °C abgekühlt und bei 12 °C, 20 min. mit 4000 rpm zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden vereinigt. Um die Schwebstoffen zu entfernen wurde erneut 20 min. bei 3500 rpm zentrifugiert.

### **Dialyse**

In einen, 30 min. in ddH<sub>2</sub>O vorgequollenen, dicht verschlossenen Dialyseschlauch mit einem Porendurchmesser von 24 Å wurden die bei der LPS-Extraktion gewonnenen Überstände überführt und über Nacht solange dialysiert, bis kein phenolischer Geruch mehr wahrzunehmen war.

### **Ultrazentrifugation und Trocknung des LPS**

Die dialysierte LPS-Lösung wurden in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 42000 x g (4°C) im vorgekühlten Rotor 6,5 h ultrazentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in einer möglichst geringen ddH<sub>2</sub>O Menge gelöst und lyophilisiert.

#### **3.2.2.2 Lösen und Einsetzen im Versuch**

Alle Endotoxine wurden in 0,15%-iger wässriger Triethylaminlösung zu Stocklösungen mit einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Diese wurden bei -20 °C in endotoxinfreien Reaktionsgefäßen gelagert. Für den Versuch wurden die gefrorenen Endotoxinlösungen aufgetaut und mit Versuchstagsmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt, so dass sie in Mengen von 200 µl im Kokulturmodell und 20 µl in der Direktstimulation eingesetzt werden konnten. Die Endkonzentrationen in den Versuchen sind unter 3.2.4.1.1 und 3.2.4.2.1 angegeben.

#### **3.2.2.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese**

Alle Endotoxine wurden zur Überprüfung ihrer Reinheit einer eindimensionalen SDS-PAGE Gelelektrophorese nach Laemmli (1970), modifiziert durch Tsai et al. (1982) unterzogen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen, für die Herstellung eines SDS-Page-Gels.

<b>Acrylamid Stammlösung</b>		<b>APS</b>	
Acrylamid	150 g	Ammoniumpersulfat	10 % (w/v)
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	4 g	frisch angesetzt	
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml		
Lagerung 4°C			
<b>Trenngelpuffer</b>		<b>Anodenpuffer</b>	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	60,6 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	21 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	Glycin	100,8 g
mit HCl <sub>conz</sub> auf pH 8,8 eingestellt		Sodium-Dodecyl-Sulfat	7 g
Lagerung 4°C		ddH <sub>2</sub> O	ad 7 L
		Lagerung 4°C	
<b>Sammelgelpuffer einfach konzentriert</b>		<b>Kathodenpuffer</b>	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	15,14 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	8 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	Glycin	19 g
mit HCl <sub>conc</sub> auf pH 6,8 eingestellt		Sodium-Dodecyl-Sulfat	1,5 g
Lagerung 4°C		ddH <sub>2</sub> O	ad 1,5 L
		frisch angesetzt	
<b>Sammelgelpuffer doppelt konzentriert</b>		<b>Probenpuffer einfach konzentriert</b>	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	30,28 g	Sammelgelpuffer, 1fach konz.	25 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	Sodium-Dodecyl-Sulfat	2 g
mit HCl <sub>conc</sub> auf pH 6,8 eingestellt		Glycerin	5 ml
Lagerung 4°C		Bromphenolblau	5 mg
		ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
		Lagerung bei -20°C	
<b>Glycerin</b>		<b>Probenpuffer doppelt konzentriert</b>	
Glycerin	14,5 % (w/v)	Sammelgelpuffer, 2fach konz.	25 ml
Lagerung 4°C		Sodium-Dodecyl-Sulfat	4 g
		Glycerin	10 ml
<b>SDS</b>		Bromphenolblau	10 mg
Sodium-Dodecyl-Sulfat	10 % (w/v)	ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
Lagerung 4°C		Lagerung bei -20°C	

### Herstellung des Gels

Zur Herstellung des Trenngels wurden Trenngelpuffer, Acrylamid und Glycerin in den der Tabelle 6 zu entnehmenden Mengen unter Rühren (1 min.) gemischt und durch Anlegen eines Unterdrucks entgast. Um die Polymerisation zu starten, wurden SDS, TMED und APS zugegeben und die Lösung für eine halbe Minute weitergerührt. Das Trenngel wurde dann zügig zwischen zwei gut abgedichtete Glasplatten (Höhe: 132 mm, Breite: 225 mm) gegossen, (1,5 cm Abstand zum oberen Rand) und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Der Abstand zwischen den beiden Glasplatten betrug 1,5 mm. Die Polymerisationszeit für das Trenngel betrug 90 bis 120 Minuten.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungsgemische für das Trenn- und Sammelgel.

Lösungen	Trenngel (12,9 % T / 2,67 % C)	Sammelgel (5% T / 2,67% C)
Acrylamid	50 ml	4,2 ml
Trenngelpuffer	48,2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	12,5 ml
Glycerin	21,2 ml	-
ddH <sub>2</sub> O	-	8,1 ml
SDS	2,5 ml	0,5 ml
TMED	0,25 ml	0,05 ml
APS	0,316 ml	0,075 ml

Das Sammelgel wurde, wie oben für das Trenngel beschrieben, hergestellt. Bevor es jedoch auf das Trenngel gegossen wurde, musste das Butanol-Wasser-Gemisch durch dreimaliges Waschen mit Trenngelpuffer entfernt werden. Unmittelbar nach dem Gießen wurden die Kämme für die Probenaschen angebracht. Nach weiteren 120 min. Polymerisationszeit konnte das Gel zur Gelelektrophorese verwendet werden.

### Vorbereitung der Proben

Die Endotoxine wurden mit wässriger 0,15%-iger Triethylaminlösung aufgenommen und mit Probenpuffer (doppelt konzentriert) verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: In der SDS-PAGE Gelelektrophorese eingesetzte Endotoxin-Konzentrationen.

<b>Endotoxin</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>
<i>E. coli</i> Nissle	0,1 0,5
<i>E. coli</i> K12	0,1 0,5
<i>E. coli</i> 0111 B4	1,0 5,0
<i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	1,0 5,0
<i>B. vulgatus</i> MPK	1,0 5,0
<i>S. Typhimurium</i>	1,0 5,0

### **SDS-PAGE Gelelektrophorese**

Je 10 µl der in Tabelle 7 angegebenen Konzentrationen wurden im Doppelansatz unter den Kathodenpuffer in die Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese lief zunächst 30 min. bei 50 mA und anschließend bei einer Stromstärke von 180 mA, solange bis die Bromphenolblaubande bis ca. 1 cm vor das Ende des Trenngels gewandert ist.

### **Silbernitratfärbung**

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele zwei Stunden oder über Nacht in der Fixierungslösung bei 4 °C belassen. Angefärbt wurden die aufgetrennten Endotoxine mittels Silbernitratfärbung nach Tsai und Frasch (1982), modifiziert nach Fomsgaard et al. (1990), wie in Tabelle 9 aufgeführt.



Tabelle 8: Zusammensetzung der Lösungen zur Silberfärbung der SDS-Page-Gele.

<b>Fixierungslösung</b>		<b>Entwickler</b>	
Isopropanol	400 ml	Citronensäure	12,5 mg
Essigsäure	50 ml	Formaldehyd 37,5 %	0,92 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml

<b>Markierungslösung</b>		<b>Stop-Lösung</b>	
Silbernitrat	1,47 g	Essigsäure	3,75 ml
Ammoniak (25%)	2,9 ml	ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml
NaOH 0,1n	41 ml		
ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml		

<b>Oxidationslösung</b>	
Periodsäure	1,65 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml

Tabelle 9: Ablauf der Silbernitratfärbung.

<b>Arbeitsvorgang</b>	<b>Gebrauchslösung</b>	<b>Zeit</b>
Fixieren	Fixierungslösung	2 h oder über Nacht
Oxidieren	Oxidationslösung	10 min.
Waschen	dest. H <sub>2</sub> O	3 x 10 min.
Markieren	Markierungslösung	20 min.
Waschen	dest. H <sub>2</sub> O	1 x 5 min. 2 x 10 min.
Entwickeln	Entwickler	2-4 min., abhängig von der Farbintensität
Stoppen	Stop-Lösung	2-4 min.

### Geltrocknung

Die Trocknung der Gele erfolgte in einem Geltrockner bei 80 °C bei Unterdruck

#### 3.2.2.4 Endotoxinmessung im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)

Standards und Konzentrationen der Standards im LAL-Test

Zur Messung der Permeabilität des jeweiligen apikal im Kokulturmodell eingesetzten Endotoxins wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Endotoxine und Standardverdünnungen verwendet. Die Verdünnung der Standards erfolgte mit Versuchstagsmedium.

Tabelle 10: Konzentrationen der im LAL-Test eingesetzten Endotoxin-Standards.

Endotoxin	Konzentrationen der Endotoxinlösungen in pg/ ml					
	625	125	25	5	1	0,2
LAL-Standard	625	125	25	5	1	0,2
<i>E. coli</i> K12	625	125	25	5	1	0,2
<i>E. coli</i> Nissle	625	125	25	5	1	0,2
<i>S. Typhimurium</i>	625	125	25	5	1	0,2
<i>B. vulgatus</i>	15625	3125	625	125	25	5
<i>B. vulgatus</i> MPK	15625	3125	625	125	25	5

Zum Vergleich der unterschiedlichen Reaktionsintensitäten der verschiedenen Standards wurde ein LAL-Test mit sämtlichen Standard-Endotoxinen durchgeführt. Darüber hinaus wurden bei jedem LAL Test zwei Wasserwerte (Negativkontrolle) und zwei Medienkontrollwerte mitgeführt.

### Probenvorbereitung

Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten basolateralen Medienproben wurden aufgetaut und vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte 15 min. geschüttelt.

### Durchführung des LAL-Tests

Der LAL Test wurde nach den Vorschriften des Herstellers Charles River durchgeführt. Abweichend davon wurden jeweils 70  $\mu\text{l}$  Kontrolle, Standard oder Probe in die jeweiligen Kavitäten einer endotoxinfreien 96-well-Platte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann 10 min. im SLT Reader auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert. Anschließend wurden möglichst zügig je 70  $\mu\text{l}$  des LAL-Reagenzes (Endochrome K) in jede Kavität hinzupipettiert. Jede Kavität der Mikrotiterplatte wurde einmal pro Minute in einem Zeitraum von 45 min. bei 405 nm photometrisch im SLT Mikrotiterplatten Reader gemessen.

### Auswertung der LAL-Tests

Die Auswertung des LAL-Test erfolgte mit Hilfe der Software Slide Write. Dabei wurde für jede Kavität die Sigmoidale des jeweiligen Extinktionsverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Nach Nivellierung der Nullwerte wurde der Schnittpunkt mit einer Parallelen zur x-Achse bei  $y=0,05$  errechnet. Aus den Schnittpunkten der unterschiedlichen

Standardkonzentrationen wurde dann mittels einer Exponentialfunktion eine Standardkurve berechnet (Abszisse:  $c(\text{LPS})$ ; Ordinate  $t$  (min.) des Schnittpunktes), mit deren Hilfe dann die Endotoxinkonzentrationen der Kontrollen und Proben berechnet werden konnten.

### 3.2.2.5 Die Quantifizierung des Lipid A-Gehaltes verschiedener Endotoxine

Zur Quantifizierung wurden die 3-Hydroxyfettsäuren verwendet. Die 3-Hydroxymyristinsäure (HMS), ist ein Lipid A-Bestandteil von *E. coli* Nissle, *E. coli* K12 und *S. Typhimurium*. Dagegen ist die 3-Hydroxypentadecansäure Lipid A - Bestandteil von *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK. Mit dieser Methode wurde die Konzentration des entsprechenden Markers durch ein chemisch-chromatographisches Nachweisverfahren nach Parlesak und Bode (1995) bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde die jeweilige 3-Hydroxyfettsäure durch säurekatalysierte Umesterung in einen Methyl ester überführt, mit dem fluoreszierenden Derivatisierungsreagenz 9-Anthroylchlorid (ACOCl) derivatisiert und mit Hilfe der HPLC fluorimetrisch nachgewiesen. Es wurden Pipettenspitzen verwendet, aus denen zuvor mit Hilfe einer 8 stündigen Acetonitril Behandlung in einer Soxhlett-Extraktionsapparatur alle interferierenden Störsubstanzen entfernt worden waren.

#### 3.2.2.5.1 Ummethylierung

Zunächst wurden die im Lipid A kovalent gebundene 3-Hydroxymyristinsäure bzw. 3-Hydroxypentadecansäure durch säurekatalysierte Ummethylierung mittels methanolischer HCl (3M) in den 3-Hydroxymyristinsäuremethyl ester bzw. 3-Hydroxypentadecansäuremethyl ester überführt, (vgl. Abbildung 10).

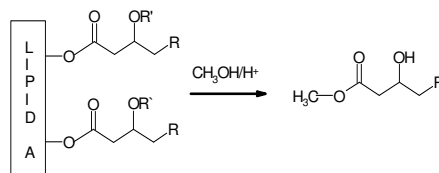


Abbildung 10: Säurekatalysierte Ummethylierung zur Überführung von 3-Hydroxymyristinsäure (HMS) bzw. 3-Hydroxypentadecansäure (HPS).  $R=C_{10}H_{23}$  bzw.  $C_{11}H_{25}$ ;  $R'$  = H oder Acylrest; (nach Parlesak und Bode, 1995)

Durch Verdünnung mit wässriger Triethylaminlösung (0,15%-ig) wurden hierfür LPS-Lösungen mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml bei *E. coli* K12 und *E. coli* Nissle Endotoxin und 0,5 mg/ml für *S. Typhimurium*, *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK Endotoxin. Des weiteren wurden als interner Standard 3-Hydroxymyristinsäureethylester (für *Bacteroides*-LPS) bzw. 3-Hydroxypentadecansäureethylester (für LPS von *Salmonella* und *E. coli*) eingesetzt. Der 3-Hydroxymyristinsäureethylester (3-OH-C14-EE) bzw. 3-Hydroxypentadecansäureethylester (3-OH-C15-EE) wurde hierfür eingewogen und nach sequentieller Verdünnung mit Methanol auf eine Konzentration von 1 µg/ml bzw. 1,5 µg/ml eingestellt. Für den Vorgang der Ummethylierung wurden je 100 µl der in Tabelle 11 aufgeführten Lösungen in fest verschließbare Glasröhrchen pipettiert.

Tabelle 11: Proben für die Ummethylierung: je 100 µl der Lösungen wurden eingesetzt. **3-OH-FS-EE**: 3-Hydroxy-Fettsäure-Ethylester.

<b>Glasröhrchen-Inhalt</b>	<b>LPS</b>	<b>3-OH-FS-EE</b>	<b>Bestimmungsumfang</b>
Methanol			einfach
0,15%-ige Triethylaminlösung			einfach
		3-OH-C14-EE	doppelt
		3-OH-C15-EE	doppelt
	<i>E. coli</i> Nissle		einfach
	<i>E. coli</i> K12		einfach
	<i>S. Typhimurium</i>		einfach
	<i>B. vulgatus</i>		einfach
	<i>B. vulgatus</i> MPK		einfach
	<i>E. coli</i> Nissle	3-OH-C15-EE	doppelt
	<i>E. coli</i> K12	3-OH-C15-EE	doppelt
	<i>S. Typhimurium</i>	3-OH-C15-EE	doppelt
	<i>B. vulgatus</i>	3-OH-C14-EE	doppelt
	<i>B. vulgatus</i> MPK	3-OH-C14-EE	doppelt

In jedes Röhrchen wurden zusätzlich 3 ml MeOH/HCl zugegeben, mit einem Schraubdeckel fest verschlossen und für 4 h im 110 °C heißen Wärmeblock inkubiert. Danach wurden die Röhrchen herausgenommen, auf Eis abgekühlt und vorsichtig jeweils 2 ml H<sub>2</sub>O und 1,2 ml Hexan zugefügt. Durch Schütteln gingen die gebildeten unpolaren Methylester in die ebenfalls unpolare Hexanphase über. Anschließend wurde die Hexanphase abpipettiert, in HPLC-Spitzgläschen überführt und über Nacht zum abdampfen des Hexans offen unter den

Abzug gestellt. Die verbliebenen Reste wurden am nächsten Tag manuell mit Argon eliminiert. Der jeweils zurückgebliebene Methyl ester wurde mit je 200 µl getrocknetem Acetonitril aufgenommen.

### 3.2.2.5.2 Derivatisierung

Bei der Derivatisierung (Abbildung 11) wurden die Methyl ester mit 9-Anthroylchlorid (ACl) zu 3-9(anthroyl) myristinsäuremethyl ester bzw. 3-9(anthroyl)-pentadecansäuremethyl ester umgesetzt. Da die anhängige Anthroylgruppe einen fluoreszierenden Charakter besitzt, ist es möglich, das Derivatisierungsprodukt mittels Fluoreszenz in der HPLC zu detektieren.

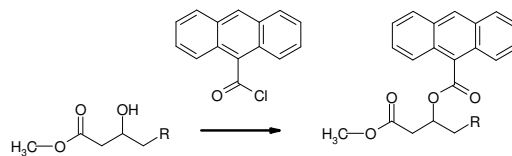


Abbildung 11: Derivatisierung der gebildeten Methyl ester (s. Abb. 2.2.7) mit 9-Anthroylchlorid; R= C<sub>10</sub>H<sub>23</sub> bzw. C<sub>11</sub>H<sub>25</sub>; (PD Dr. A. Parlesak, Hohenheim)

Eine gesättigte Lösung des Derivatisierungsreagenz 9-Anthroylchlorid wurde mit getrocknetem Acetonitril hergestellt (8,0 mg/ml). Von den zuvor in 200 µl Acetonitril (getrocknet) aufgenommenen Methyl estern wurden je 100 µl mit 50 µl des Derivatisierungsreagenzes in HPLC-Gläschen vereint. Nachdem die Gläschen verschlossen waren, erfolgte in einem 60 °C warmen Wärmeblock 20 min lang die Derivatisierung. Anschließend wurden je 10 µl H<sub>2</sub>O und 40 µl Acetonitril (getrocknet) zugegeben. Die Trennung und Quantifizierung der Derivatisierungsprodukte wurde mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt.

Zunächst wurde die Säule mit Fließmittel (90:10 Acetonitril/Wasser-Gemisch) konditioniert. Die Proben wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC (Säule: LiChrospher 100 RP 18-5µEC 125x4 mm, Flow: 1 ml; Anregungswellenlänge: 360 nm; Emissionswellenlänge: 462 nm) gemessen, wobei zusätzlich als Anthroylderivat des 3-Hydroxymyristinsäureethylesters

100 %- Standard eingesetzt wurde. Die zu detektierenden Anthroylderivate fluoreszieren bei einer Anregung durch die Wellenlängen 250 nm und 360 nm und hatten dabei jeweils eine

Emission von 462 nm zur Folge. Für die Messungen wurde eine Anregungswellenlänge von 360 nm verwendet. Am Fluoreszenzdetektor wurden folgende Einstellungen gewählt: sensitivity: high; gain: 1,0 bzw. 4,0; response: 0,5 sec.

### 3.2.3 Zellkultur

#### 3.2.3.1 Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

Im folgenden wird die Zusammensetzung der Zellkulturmedien und der zugesetzten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Lösungen

<b>Anzuchtmedium</b>	<b>Menge in ml</b>	<b>Anteil (%)</b>
DMEM-Medium	500	82,7
Fötale Kälberserum von PAA dekomplementiert (FCS)	100	16,3
Aminosäuren-Stamm (NEAS)	6	1,0

<b>Versuchstagsbasismedium</b>	<b>Menge in ml</b>	<b>Anteil in Prozent</b>
DMEM-Medium von Biochrom	500	82,7
Fötale Kälberserum von Biochrom dekomplementiert (FCS)	100	16,3
Aminosäuren-Stamm (NEAS)	6	1,0

<b>Antibiotikamischung</b>	<b>Gentamycin</b>	<b>Tetracyclin</b>
Einwaage	6 ml	122,9 mg
Endkonzentration des Antibiotikums im Medium bei Zusatz von 0,5 ml pro 100 ml Versuchstagsbasismedium	50 µg/ml	100 µg/ml

<b>Fluorescein-Dextran Stocklösung</b>		
Fluorescein-Dextran		2 mg
Aqua Spüllösung		1 ml
Die Fluorescein-Dextran Stocklösung wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porenweite: 0,2 µm) sterilfiltriert.		

### 3.2.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mikroskopisch im Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer) nach der Methode von Neubauer bestimmt. Die Zellen wurden zur lebend/tot-Unterscheidung mit Trypanblau auf eine Zellzahl von 50 bis 150 Zellen pro Großquadrat verdünnt und angefärbt. In der Neubauer-Zählkammer entspricht die Fläche eines Grossquadrats 1 mm<sup>2</sup>, so dass sich die Zellzahl pro ml wie folgt berechnen lässt.

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{mL}} = \text{MW}_{\text{Zellzahl}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.2.3.3 CaCo-2-Zellen

#### 3.2.3.3.1 Kultivieren und Passagieren von CaCo-2-Zellen

Die CaCo-2-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Fliltergewebekulturflaschen bis zur Konfluenz in 10 ml Anzuchtmedium (wie unter 3.2.3.1 beschrieben) bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt und nach ca. einer Woche passagiert. Dabei wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA Lösung zugegeben, welche ca. 10 Minuten im Brutschrank auf die Zellen einwirkte, bis sich die Zellen von der Flaschenwand abzulösen begannen. Durch Zugabe von 10 ml Anzuchtmedium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt. Die Zellen wurden sodann bei 400 rpm abzentrifugiert, in neuem Kulturmedium aufgenommen, suspendiert und in entsprechender Zellzahl im Versuch oder zur Stammhaltung wieder ausgesät. Für die Versuche wurden CaCo-2-Zellen von Passage 10 bis 80 verwendet.

#### 3.2.3.3.2 Kultivieren von CaCo-2-Zellen auf Inserts

Für Versuche mit dem Kokulturmodell wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen pro Insert in 2 ml Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Gentamycin pro Insert ausgesät. Außerdem wurden 2 ml Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Gentamycin basolateral in jede Kavität pipettiert. Die Zellen wurden nach dem Aussäen auf die Inserts im Brutschrank bei 37 °C, H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> 13 Tage kultiviert, wobei eine Konfluenz nach ca. sechs bis acht Tagen erreicht war, und anschliessend die Ausdifferenzierung begann. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage mit je 2 ml Zellkulturmedium apikal und basolateral.

### **3.2.3.4 Isolation peripher-venöser mononukleärer Leukozyten aus Buffy Coats mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Die Buffy Coats (zellangereichertes Blutplasma) wurden zunächst 1:2 mit RPMI (1640) verdünnt. Sodann wurden 14 ml Biocoll in einem 50 ml Reaktionsgefäß vorsichtig mit dem verdünnten Buffy Coat überschichtet und dann 30 min. lang bei 1400 rpm (ausgeschalteter Bremse) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMCs wurden nach der Zentrifugation an der Phasengrenze zwischen der Biocoll-Lösung und dem Blutplasma abpipettiert. Anschließend wurde zweimal mit je 20 ml RPMI (1640) gewaschen und die Zellen bei 1400 rpm (Bremse „low“) und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Waschmedium wurde nach jedem Waschschrift verworfen. Das gewaschene Zellpellet wurde in 30 ml Versuchstagsmedium mit Antibiotikamischung (Antibiotikaendkonzentration von 50 µg/ml Gentamycin und 100 µg/ml Tetrazyklin) aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde dann am Versuchstag in das basolaterale Kompartiment der 6-well Platten im Kokulturmodell oder in Platten ohne Inserts eingesetzt.

## **3.2.4 Stimulationsversuche**

### **3.2.4.1 Kokulturmodell**

Das Kokulturmodell wurde in Anlehnung an Haller et al. (2000) aufgebaut und durchgeführt.

#### ***3.2.4.1.1 Stimulantien und Endotoxinbindende Substanzen im Kokulturmodell***

Zur Stimulation im Kokulturmodell wurden verschiedene Bakterien sowie verschiedene Oberflächenbestandteile gram-positiver und gram-negativer Bakterien und LPS-bindende Proteine eingesetzt.

#### **Bakterien im Kokulturmodell**

Die Stimulationen mit Bakterien wurden sowohl mit nur einem Bakterium apikal zugesetzt, als auch mit *E. coli* K12 und einem weiteren Bakterium apikal zugesetzt, als Kostimulation durchgeführt. *E. coli* K12 wurde stets zuletzt zugesetzt. Für die Einfachstimulation wurden die Spezies *E. coli* K12, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* shirota, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. johnsonii* LA1, *Lb. sakei*, *B. vulgatus* Patientenstamm, *B. vulgatus* MPK, *E. faecalis* und *B. bifidum* verwendet.



Mit *E. coli* K12 wurden *E. faecalis*, *B. vulgatus* Patientenstamm und *Lb. rhamnosus* GG in zwei verschiedenen Konzentrationen kokultiviert. Die zur Stimulation verwendeten Bakterien und Konzentrationen können den Tabelle 13 und Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 13: Endkonzentration im apikalen Medium des Versuchsansatzes bei Einfachstimulation im Kokulturmodell mit verschiedenen Bakterien.

Stimulans	Endkonzentration
<i>E. coli</i> K12	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>Lb. acidophilus</i>	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>Lb. casei</i> shirota	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>Lb. sakei</i>	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>B. vulgatus</i> MPK	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>E. faecalis</i>	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>B. bifidum</i>	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml

Tabelle 14: Endkonzentration im apikalen Medium des Versuchsansatzes bei Kostimulation im Kokulturmodell mit verschiedenen Bakterien.

Stimulans	Endkonzentration
<i>E. coli</i> K12 mit <i>E. faecalis</i>	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>E. coli</i> K12 mit <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>E. coli</i> K12 mit <i>Lb. rhamnosus</i> GG 1:1	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
<i>E. coli</i> K12 mit <i>Lb. rhamnosus</i> GG 1:10	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml
	1 x 10 <sup>8</sup> KBE/ml

### Membranbestandteile von Bakterien im Kokulturmodell

An Oberflächenbestandteilen wurden von dem gram-positiven Bakterium *E. faecalis* eine Lipoteichonsäure LTA und von den gram-negativen Bakterien *E. coli* K12, *B. vulgatus* Patientenstamm, *B. vulgatus* MPK und *S. Typhimurium* die Lipopolysaccharide LPS in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen apikal zugesetzt (vgl. Tabelle 15). Des weiteren wurden Kostimulationen mit *E. coli* K12 LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml und den LPS von *B. vulgatus* Patientenstamm und *B. vulgatus* MPK, wie aus Tabelle 16 zu entnehmen ist, durchgeführt.

Alle Endotoxine lagen in Stocklösungen mit einer Konzentration von 2 mg/ml in 0.15 % wässriger Triethylaminlösung bei -20 ° C vor. Die Lipoteichonsäure von *E. faecalis* wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und ebenfalls bei -20 ° C gelagert.

Tabelle 15: Endkonzentration im apikalen Medium des Versuchsansatzes bei Einfachstimulation im Kokulturmodell mit verschiedenen Membranbestandteilen.

Stimulans	Endkonzentration im Kokulturmodell
LPS <i>E. coli</i> K12	1 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	1 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	10 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	100 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	1 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	10 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	100 µg/ml
Lipoteichonsäure von <i>E. faecalis</i>	1 µg/ml
Lipoteichonsäure von <i>E. faecalis</i>	10 µg/ml
Lipoteichonsäure von <i>E. faecalis</i>	100 µg/ml

Tabelle 16: Endkonzentration im apikalen Medium des Versuchsansatzes bei Kostimulation im Kokulturmodell mit verschiedenen Membranbestandteilen.

Stimulans	Endkonzentration im Kokulturmodell
LPS <i>E. coli</i> K12 mit	1 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	1 µg/ml
	10 µg/ml
	100 µg/ml
LPS <i>E. coli</i> K12 mit	1 µg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	1 µg/ml
	10 µg/ml
	100 µg/ml

### LPS-bindende Proteine

Zur Hemmung der durch LPS ausgelösten Stimulation wurden die beiden LPS-bindenden Stoffe Polymyxin und Colistin in einer Konzentration von 10 µg/ml im Versuchsansatz sowohl apikal als auch basolateral zugesetzt und mit LPS von *E. coli* K12 stimuliert (Tabelle 17).

Polymyxin und Colistin wurden in sterilem Wasser bei einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 17: Apikaler und basolateraler Zusatz der LPS-bindenden Proteine jeweils mit und ohne apikale Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS im Kokulturmodell

Stimulans	Zugabeort	Endkonzentration im Kokulturmodell
Polymyxin	apikal	10 µg/ml
	basolateral	10 µg/ml
Colistin	apikal	10 µg/ml
	basolateral	10 µg/ml

### 3.2.4.1.2 Durchführung des Kokulturmodells

#### Vorbereitung

CaCo-2-Zellen wurden (wie unter 3.2.3.3.2 beschrieben) 13 Tage vor dem Versuchstag ausgesät und angezchtet. Nach jedem Mediumwechsel wurde in einer Referenzplatte zur Kontrolle des Wachstums und des Differenzierungsgrades der CaCo-2-Zellen der TEER Wert (wie unter 3.2.5.1 beschrieben) gemessen. Am Tag 12 nach Aussaat der CaCo-2-Zellen wurde in allen Platten der TEER-Wert gemessen und Inserts mit beschädigter Monolayer eliminiert.

#### Ansetzten der Zellkultur

Am Tag 13 nach der Aussaat der CaCo-2-Zellen wurden PBMCs aus Buffy Coats männlicher Blutspender (wie unter 3.2.3.4 beschrieben) isoliert und in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml basolateral in die 6 well Platten eingesetzt. Apikal wurde das Anzuchtmedium durch das Versuchstagsmedium ausgetauscht. In allen Ansätzen inklusive Stimulans befand sich am Versuchstag eine Antibiotikaendkonzentration von 50 µg/ml Gentamycin und 100 µg/ml Tetrazyklin. Zur Kontrolle der Integrität der Zellschicht wurde allen Versuchsansätzen apikal 20 µl der Fluorescein-Dextran Stammlösung zugesetzt. Zur Stimulation wurden apikal oder basolateral die verschiedenen Bakterien, Oberflächenbestandteile von Bakterien und Hemmstoffe eingesetzt. Sie wurden in 200 µl oder 20 µl Portionen apikal bzw. basolateral den mit den entsprechenden Versuchstagsmedienmengen vorbereiteten Kokulturansätzen zugesetzt. Die passende Verdünnung aus der jeweiligen Stocklösung, die zur Stimulation benötigt wurde, erfolgte mit antibiotikafreiem Versuchstagsmedium. Den Zugabeort und die entsprechende Endkonzentrationen der Stimulantien sind unter 3.2.4.1.1 beschrieben. Bei den Kostimulationen mit *E. coli* K12 und verschiedenen anderen Bakterien wurde immer die *E. coli* K12-Suspension zuletzt zugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne jegliche Stimulation mitgeführt. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* K12 bzw. eine Stimulation mit dessen LPS. Anschließend wurden die Platten 4 h, 12 h, bzw. 72 h bei 37 °C, H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

## Probenahme

Versuchsabbrüche erfolgten nach 4 h, 12 h und 72 h. Dabei wurde das apikale sowie das basolaterale Medium aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Außerdem wurden die CaCo-2-Zellen und PBMCs in Trizol aufgenommen und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zusätzlich zu den Versuchsabbrüchen wurden je 3 mal 60  $\mu\text{l}$  basolaterales Medium aus den nach 72 h abgebrochenen Platten nach 12 h und 24 h steril entnommen.

### 3.2.4.2 Direktstimulation

#### 3.2.4.2.1 Stimulantien der Direktstimulation

In den Direktstimulationsversuchen wurde LPS von *E. coli* K12, *B. vulgatus* Patientenstamm und *B. vulgatus* MPK, LTA von *E. faecalis* in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt vgl. Tabelle 18.

Tabelle 18: Endkonzentrationen der verschiedenen Membranbestandteilen von Bakterien bei der Direktstimulation

Stimulans	Endkonzentration in der Direktstimulation
LPS <i>E. coli</i> K12	2 pg/ml
LPS <i>E. coli</i> K12	20 pg/ml
LPS <i>E. coli</i> K12	200 pg/ml
LPS <i>E. coli</i> K12	2000 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	2 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	20 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	200 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> Patientenstamm	2000 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	2 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	20 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	200 pg/ml
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK	2000 pg/ml
LTA <i>E. faecalis</i>	2 pg/ml
LTA <i>E. faecalis</i>	20 pg/ml
LTA <i>E. faecalis</i>	200 pg/ml
LTA <i>E. faecalis</i>	2000 pg/ml

#### 3.2.4.2.2 Durchführung der Direktstimulation

Bei der Direktstimulation wurden PBMCs, die denen der Stimulationen im Kokulturmodell entsprachen, ohne die Anwesenheit von CaCo-2-Zellen mit verschiedenen Stimulantien versetzt. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs (Isolation peripher-venöser mononukleärer Leukozyten aus Buffy Coats mittels Dichtegradientenzentrifugation) mit Versuchstagsmedium mit Antibiotikum (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tetrazyklin) auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Hiervon wurden 2 ml in jede

Kavität der 6-well-Gewebekulturplatten (ohne Inserts) pipettiert. Die Stimulation erfolgte mit den in Tabelle 18 angegebenen Zellwandbestandteilen. Anschließend wurden die stimulierten Zellen 12 h lang bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 12 h wurde der Versuch abgebrochen, die PBMCs in Trizol aufgenommen, sowie das Medium aliquotiert und beides bei –80 °C gelagert.

Diese Versuche wurden parallel zu den Kokulturversuchen mit gleichen Buffy Coats und Stimulantien durchgeführt, wobei die Konzentrationen zur Stimulation in der Direktstimulation, basierend auf Messungen der LPS-Konzentrationen im basolateralen Kompartiment, erheblich niedriger gewählt wurden als die apikal im Kokulturmodell eingesetzten.

### 3.2.5 Methoden zur Integritätskontrolle der CaCo-2-Zellschicht

Zur Kontrolle der Integrität der CaCo-2-Zellschicht wurden die TEER Werte vor und nach dem Versuch bestimmt, und das vor dem Versuch apikal zugegebene Fluorescein-Dextran nach dem Versuch im basolateralen Kompartiment gemessen.

#### 3.2.5.1 Bestimmung des Transepithelialen Widerstands TEER

Der TEER Wert wird mit Hilfe des Widerstandsmessgerätes (Volt-Ohmmeter) gemessen. Dabei wird die längere Elektrode möglichst senkrecht in das basolaterale und die kürzere in das apikale Kompartiment gehalten. Nach jedem Mediumwechsel wurde in einer Referenzplatte und am Tag vor dem Versuch sowie zum Zeitpunkt des Abbruchs in allen Kavitäten die elektrischen Widerstände gemessen. Mit Hilfe folgender Formel wurde aus den einzelnen elektrischen Widerständen der TEER-Wert ermittelt.

$$\text{TEER} \left( \Omega \times \text{cm}^2 \right) = \left( R_{\text{Probe}} - R_{\text{Nullwert}} \right) \times A$$

$R_{\text{Probe}}$  gemessener Widerstand in Inserts mit CaCo-2-Zellen

$R_{\text{Nullwert}}$  gemessener Widerstand in Inserts ohne CaCo-2-Zellen (157  $\Omega$ )

A Fläche der Insert-Membran (4,3 cm<sup>2</sup>)

#### 3.2.5.2 Messung der Fluorescein-Dextran Permeabilität

Zur Ermittlung der Dichtigkeit der CaCo-2-Zellschicht wurde der Anteil des vor dem Versuch apikal zugegebenen Fluorescein-Dextrans im basolateralen Medium fluorometrisch gemessen. Dazu wurden in einer Doppelbestimmung je 100  $\mu\text{l}$  des unverdünnten

basolateralen Mediums zusammen mit einer Standardkurve gemessen. Die höchste Konzentration der Standardkurve enthielt 10 µl der im jeweiligen Versuch eingesetzten Fluorescein-Dextran Lösung, gelöst in 1 ml Versuchstagsmedium und entsprach damit einer Permeabilität für Fluorescein-Dextran von 200%. Als Nullwert diente das Versuchstagsmedium. Die Quantifizierung der Permeabilität erfolgte anhand der aus den Standardkurven berechneten Kalibriergerade und wird in Prozent angegeben. Eine Permeabilität von 100 % entsprach der halben initialen Fluorescein-Dextran-Konzentration im apikalen Medium.

### 3.2.6 Methoden zur Zytokinmessung

#### 3.2.6.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurden ELISA Kits von BD verwendet. Zum Einsatz kamen Kits für TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$ .

Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösungen für die Durchführung eines ELISAs.

<b>Coating-Puffer</b>		<b>Waschpuffer</b>	
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 g	1 x PBS Puffer	900 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,78 g	Tween 0,05%	450 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml	frisch hergestellt	
pH auf 9,5 eingestellt bei -20°C (aliquotiert à 10,5 ml)			
<b>40 x PBS-Puffer</b>		<b>Assaydiluent</b>	
NaCl	200 g	FCS	16,6 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	29 g	1 x PBS Puffer	ad 100 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g	frisch hergestellt	
KCl	5 g		
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	<b>Stopp-Lösung</b>	
pH auf 7 eingestellt bei -20°C (aliquotiert à 40ml)		25%ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 ml
		ddH <sub>2</sub> O	50 ml
		Lagerung bei Raumtemperatur	

Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden am Vortag des Tests, spätestens jedoch 4 h vor Beginn die Maxisorpt-96-well-Platten mit je 100  $\mu$ l Coating-Reagenz /Kavität, bestehend aus 10,5 ml Coating-Puffer und der vom Hersteller vorgegebenen Menge an Capture Antikörper, beschichtet und bei 4 °C inkubiert. Nach mindestens vier Stunden wurde das Coating-Reagenz verworfen und die Platte dreimal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Anschließend wurden zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 200  $\mu$ l „Assay diluent“ in jede Kavität pipettiert und abgedeckt für eine Stunde im Platteninkubator bei Raumtemperatur und 500 rpm inkubiert. Ein erneuter Waschschrift mit dreimal je 300  $\mu$ l Waschpuffer folgte im Anschluss. Daraufhin wurden je 100  $\mu$ l der Proben und der jeweiligen Standardverdünnungsreihen im Doppelansatz aufgetragen und zwei Stunden auf dem Platteninkubator unter gleichen Bedingungen wie oben inkubiert. Als Verdünnungsmedium für die Proben und die binär-logarithmische Verdünnungsreihe des Standards diente Assay Diluent. Der nächste Schritt war dann wieder ein Waschschrift, bei dem die Platte fünfmal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer pro Kavität gewaschen wurde. Daraufhin wurden je Kavität 100  $\mu$ l „Working detector“, anteilig bestehend aus 10,5 ml Assay diluent und der entsprechenden vom Hersteller vorgegebenen Menge Detection Antikörper und Enzym, aufgetragen und 1 h unter oben genannten Inkubationsbedingungen auf dem Tumbler geschüttelt, bevor die Kavitäten erneut siebenmal mit 300  $\mu$ l mit Waschpuffer gewaschen wurden. Dann wurden je 100  $\mu$ l Substratreagenz/Kavität, das sich aus jeweils gleichen Teilen an Substrat A und B zusammensetzt und erst kurz vor Verwendung hergestellt wurde, im 10-Sekundentakt in jede Spalte der Mikrotiterplatte aufgetragen und für ca. 8-25 min., je nach Färbungsintensität der Standardkurven, inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden wiederum im 10 – Sekundentakt je 50  $\mu$ l Stopreagenz/Kavität hinzupipettiert und die Farbtintensitäten photometrisch bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

Die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgte über die Kalibrierkurven mittels Slide Write Plus Software. Hierbei wurde die unten aufgeführte Gleichung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus an die gemessenen Extinktionen der Mittelwerte der Eichwerte über Iteration angepasst. Die Zytokinkonzentrationen in den der einzelnen Kavitäten wurden dann aus dieser nach x aufgelösten Gleichung berechnet. Um die Zytokinkonzentration der jeweiligen Probe zu erhalten, wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmung berechnet und die Verdünnungsfaktoren der Proben einbezogen.

$$y = a_0 + (a_1 * x) / (a_2 + x)$$

y gemessene Extinktion

x Konzentration

Bei  $a_0$ ,  $a_1$  und  $a_2$  handelt es sich um Koeffizienten mit folgenden Startwerten:

$a_0$  0,05

$a_1$  1

$a_2$  100

### 3.2.6.2 RT-Polymerase Chain Reaktion (RT-PCR)

Nachfolgend werden die Puffer und Lösungen für die PCR und die Gelelektrophorese zusammengefasst.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die PCR und die Gelelektrophorese

<b>Blaupuffer</b>		<b>10 x TBE-Puffer</b>		<b>TE-Puffer</b>	
Bromphenolblau	0,25 %	Tris	900 mM	Tris	10 mM
Xylencyanol	0,25 %	Borsäure	900 mM	EDTA	1 mM
Saccharose	40 %	EDTA	2,5 mM		

#### Standard

Der Positivstandard für die IL-8-PCR wurde aus den PBMC ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) isoliert, die 4 h lang mit  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS direkt stimuliert wurden. Je 1,5 ml der stimulierten Zellsuspension wurden in Reaktionsgefäße pipettiert, das Medium abzentrifugiert und in  $500 \mu\text{l}$  Trizol resuspendiert. Mittels RNA Isolation, photometrischer Konzentrationsbestimmung und cDNA Synthese wurde dann der Positivstandard synthetisiert und sämtliche cDNA zu einem Stockstandard gepoolt, der in sämtlichen PCR-Reaktionen mitgeführt wurde.

#### Isolation der RNA

Die Isolierung der gesamt RNA erfolgte nach Anweisung der des Herstellers. Die in  $500 \mu\text{l}$  Trizol® aufgenommenen Proben wurden aufgetaut und wenn nötig, mit Hilfe einer Pistille und Wärmebehandlung bei  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  und zwei Minuten im Wasserbad, aufgelöst. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde zur Isolation verwendet. Danach wurden den gelösten Proben  $100 \mu\text{l}$  Chloroform zugesetzt, von Hand geschüttelt



und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde 15 min. bei 11500xg und einer Temperatur von 2 bis 8 °C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen, wobei die farblose, wässrige Phase die RNA enthielt. Diese farblose Phase wurde abgenommen und in ein neues RNase-DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde die RNA mit 250 µl kaltem Isopropanol und 10 min. Inkubationszeit ausgefällt und bei 11500xg für 10 min. bei 2 bis 8 °C zu einem gelartige RNA-Pellet zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 75%-igem Ethanol gewaschen und erneut bei 7500xg 5 min. bei 2 bis 8 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Ethanolreste wurden ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur abgedampft. Danach wurde das getrocknete Zellpellet in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 10 min. bei 55 °C im Wasserbad und durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Die so aufbereiteten RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **Photometrische Bestimmung der Konzentration an isolierter RNA**

Die Konzentration der isolierten RNA wurden photometrisch bei 260 nm in UV-Quarzküvetten (Volumen 100 µl) bestimmt. Als Nullabgleich wurde das RNase-freie Wasser verwendet, in dem die isolierte RNA aufgenommen worden war. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurde zusätzlich noch eine Messung bei 280 nm durchgeführt.

Um im Eichbereich des Photometers zu bleiben, war für CaCo-2 Zellproben eine 1:100 Verdünnung mit RNase-freiem Wasser nötig und für PBMC Proben eine 1:60 Verdünnung.

Die RNA-Konzentration (µg/ml) berechnet sich dann wie folgt:

$$c(\text{RNA}) [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} (\text{PROBE}) \times \text{VF} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

OD<sub>260</sub>(PROBE)      Optische Dichte bei 260 nm

VF                      Verdünnungsfaktor

### **cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt, wobei die Konzentration der isolierten RNA wie oben beschrieben bestimmt wurde. Die 1 µg wurden dann mit RNase- DNase-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt und 1 µl einer Random-Primer-Lösung der Konzentration 150 ng/µl zugegeben, gemischt und in einem Thermocycler bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix, wie aus Tabelle 21 zu entnehmen ist, hergestellt.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Menge ( $\mu$ l/Probe)
First-Strand-Buffer	4
DDT	2
dNTP	1
Reverse Transkriptase	1

Nach Ablauf der Inkubation bei 70 °C wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Zu jeder Probe wurden je 8  $\mu$ l Mastermix pipettiert und diese daraufhin 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte eine 50-minütige Inkubation bei 42 °C und darauf folgend 10 Minuten bei 70 °C, beides im Robocycler der Firma Stratagen. Die so entstandenen cDNA-Proben mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l wurden bis zum weiteren Einsatz in der PCR bei – 20 °C gelagert.

### Primer

**Interleukin 8** (Krüger et al., 2003)

forward: 5'-TCTTGGCAGCCTTCCTGATT -3'

reverse: 5'- TCCAGACAGAGCTCTCTTCCATC -3'

### 18 S

Die für die semiquantitative Multiplex bzw. vollquantitative Real-Time PCR verwendeten Primer und Competimer wurden bei der Firma Ambion als QuantumRNA™ Classic II 18S Internal Standard bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt, wobei die Primer in einer Konzentration von 10  $\mu$ M vorlagen. Die Sequenzen der Primer sowie der eingesetzten Kompetimer wurden vom Hersteller nicht bekanntgegeben.

Die lyophilisierten Primer wurden in einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M in TE Puffer (vgl. Tabelle 20) gelöst und bei –20 °C in 50  $\mu$ l Aliquoten gelagert.

### RT-PCR-Proben

Die Proben aus denen die RNA isoliert wurde, stammten aus den Versuchsabbrüchen nach 4 h und 12 h im Kokulturmodell und wurden wie oben beschrieben zu cDNA umgeschrieben. In der PCR wurden sie stets als Doppelbestimmungen geführt.

## PCR

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die semiquantitative Multiplex PCR ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermixes der semiquantitativen Multiplex PCR

Reagenzien	Menge (µl/Probe)
ddH <sub>2</sub> O	13,77
10 x PCR Puffer	2
10 nM dNTP	0,4
12,5 µM IL-8-Primer forward	0,64
12,5 µM IL-8-Primer reverse	0,64
18s-Primer:Competimer: 3:7	1,6
Taq Polymerase	0,15

In die Reaktionsgefäße wurden je 19,8 µl Mastermix vorgelegt, zu dem je 0,8 µl (40 ng cDNA) Probe pipettiert wurden.

## PCR-Programm

Der Eppendorf Gradient Cycler wurde für die semiquantitative IL-8 Multiplex PCR, wie in Tabelle 23 angegeben, programmiert. Die optimale Annealingtemperatur wurde zuvor mittels eines Temperaturgradienten von 10 °C im Bereich der erwarteten Annealingtemperatur ermittelt.

Tabelle 23: PCR-Programm zur Durchführung der semiquantitativen IL-8 Multiplex PCR

	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	15	
Annealing	61	15	28
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	30	1

## Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Amplifikate wurde ein 1.5 %-iges Agarosegel gegossen. Als Puffer diente 1 x TBE (vgl. Tabelle 20).

8 µl des Amplifikats wurden mit je 2 µl Blaupuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. An jedem rechten und linken Rand des Gels wurde je ein 100 bp-DNA Längenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 145 V, 300 mA für eine Stunde. Anschließend wurde

das Gel für 30 Minuten in 400 ml Färbelösung (10 µg Ethidiumbromid/100 ml TBE-Puffer) im Dunkeln angefärbt, dann kurz in 1xTBE-Puffer entfärbt und die mittels UV-Licht sichtbaren Banden fotografiert.

Die Auswertung der Leuchtintensität der Banden auf den Gelbildern erfolgte mit Hilfe der Software: TINA 2.0g.

### Quantitative PCR

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die IL-8 und die 18S-Real-Time-PCR ist Tabelle 24 und Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 24 : Zusammensetzung eines Mastermixes für einen Ansatz von 25 µl zur Messung der mittels Reverser-Transkription umgeschriebenen IL-8 cDNA in der Real-Time-PCR

Reagenzien	Menge (µl/Probe)
Mastermix iQ Supermix von biorad	12,5
Forward Primer	0,8
Reverse Primer	0,8
PCR Wasser	5,9

Tabelle 25: Zusammensetzung eines Mastermixes für einen Ansatz von 25 µl zur Messung der mittels Reverser-Transkription umgeschriebenen 18 S cDNA in der Real-Time-PCR

Reagenzien	Menge (µl/Probe)
Mastermix iQ Supermix von biorad	12,5
Ambion QuantumRNA™ Classic II 18S Internal Standard Primermischung	1
PCR Wasser	6,5

In die beiden Real-Time PCRs wurden je 5 µl cDNA mit einer Konzentration von 10 ng/µl eingesetzt.

### PCR-Programm

Der i-Cycler wurde sowohl für die IL-8- als auch für die 18S-PCR, wie inTabelle 26, angegeben programmiert.

Tabelle 26: PCR Protokoll für IL-8- und 18S-PCR

	Temperatur (°C)	Dauer (min.)	Zyklenzahl
Preheating	95	3:00	1
Denaturation	95	0:30	
Annealing	61	0:30	40
Elongation	72	0:30	
Melting curve	65	0:10	60

Die Temperatur steigt um je 0,5 °C.

Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgte anhand der in jeder PCR im Doppelansatz mitgeführten dekadischen Verdünnungsreihe. Die daraus berechneten Konzentrationen an IL-8 RNA wurden auf die aus der Standardverdünnungsreihe berechneten Konzentrationen für 18S RNA bezogen, so dass das Verhältnis von IL-8 zu 18S korrigiert durch die Konzentrationsberechnung über den Standard als Vergleichsgrundlage diente.

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) von n Stichproben mit der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, USA) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

Der Vergleich unabhängiger Stichproben in Gruppen erfolgte mit Hilfe des student's t-test. Zur Auswertung von drei oder mehr Gruppen wurde eine ANOVA-Varianzanalyse durchgeführt. Zur Überprüfung der Voraussetzungen wurden die Daten mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests auf Normalverteilung und mit dem Bartlett-Test auf die Homogenität der Varianzen überprüft. Daten die diese Voraussetzungen nicht erfüllten wurden transformiert. Ergaben sich in der Varianzanalyse signifikante Unterschiede wurde anschliessend ein Post hoc Test Verfahren durchgeführt und mit dem Tukeys Honest-Significant-Difference-Test ein multiper Mittelwertsvergleich durchgeführt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Adaptation der Enterozyten und Leukozyten in Kokultur vor der Stimulation

Zur Optimierung der Methode der Kokultivierung von Enterozyten (CaCo-2-Zellen) und Leukozyten wurde eine 24-stündige Adaptationsphase der Leukozyten an die Gegenwart der Enterozyten, vor der Stimulation, im Vergleich zu einer Stimulation sofort nach der basolateralen Zugabe der PBMCs erprobt.

#### 4.1.1 Kontrolle der Integrität der Zellschicht im Verlauf des Versuchs

Zur Kontrolle der Integrität der Zellschicht wurde die Differenz der TEER-Werte, sowie die Permeabilität von Fluorescein-Dextran durch die CaCo-2-Zellschicht herangezogen.

Die unstimulierten Kontrollen wiesen dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede in den TEER-Differenzen auf, während die mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätze signifikant höhere TEER-Differenzen (vor und nach der Stimulation) bei 24 h verzögerter Stimulation zeigen (vgl. Tabelle 27, Abbildung 12).

Tabelle 27: TEER-Differenzen (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) zwischen den TEER-Werten vor und nach 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 sowie ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs.

	ohne Stimulans		<i>E. coli</i> K12	
	MW ± SD (N)	P students t-Test	MW ± SD (N)	P students t-Test
sofort	-72 ± 167 (12)	0,0997	-121 ± 177 (18)	<b>0,017</b>
24h verzögert	36 ± 142 (12)		-0 ± 115 (18)	

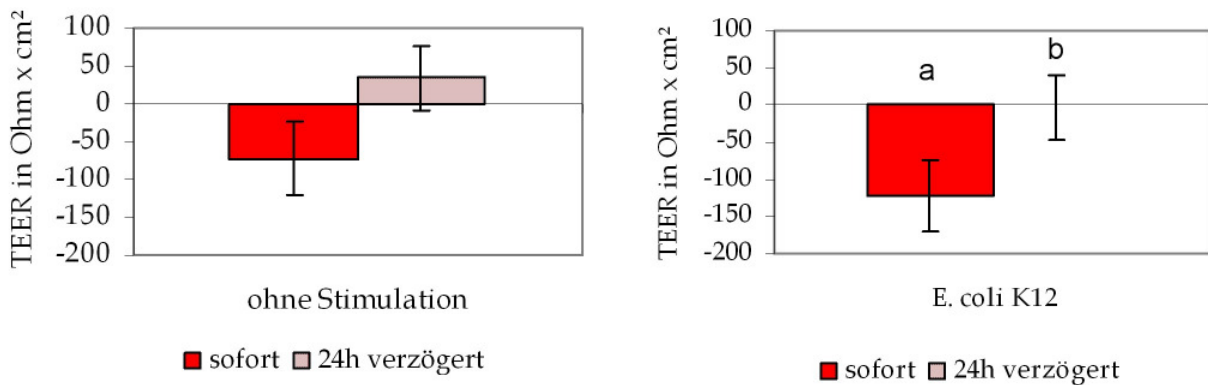


Abbildung 12: TEER-Differenzen (Mittelwerte und Standardfehler) zwischen den TEER-Werten vor und nach 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 sowie ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

Die Messung der Permeabilität des Fluorescein-markierten Dextrans im basolateralen Medium bestehen weder bei den Kontrollen noch bei den mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätzen signifikante Unterschiede zwischen sofort und verzögert stimulierten Zellen (vgl. Tabelle 27).

Tabelle 28: Prozentuale Permeabilität (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) von Fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2 -Monolayer nach 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 sowie ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs.

	ohne Stimulans		<i>E. coli</i> K12	
	MW $\pm$ SD (N)	p students t-Test	MW $\pm$ SD (N)	p students t-Test
sofort	1,91 $\pm$ 0,35 (12)	0,507	2,97 $\pm$ 0,56 (18)	0,323
24h verzögert	2,01 $\pm$ 0,37 (12)		2,88 $\pm$ 0,69 (18)	

#### 4.1.2 Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment

Zum Vergleich der durch das Stimulans ausgelösten Zytokinantwort wurden nach 12 h TNF- $\alpha$ , nach 24 h IL-8 und IL-6, sowie nach 72 h IL-10 und IFN- $\gamma$  mittels ELISA im basolateralen Medium gemessen. Die Zeitpunkte der Probenahme basierten auf der zuvor im Kokultur-Modell erfassten Kinetik der Zytokinkonzentrationen (Parlesak et al., 2004)



### TNF- $\alpha$

Die basolateralen TNF- $\alpha$  Konzentrationen sind nach 12 h Inkubation sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätzen bei sofortiger Stimulation signifikant höher als bei verzögerter Stimulation. Die 24 h verzögert stimulierten Versuchsansätze (vgl. Tabelle 29, Abbildung 13) weisen damit eine signifikante Verringerung ihrer Stimulationsfähigkeit zur Produktion von TNF- $\alpha$  auf.

Tabelle 29: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs; gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	ohne Stimulans		<i>E. coli</i> K12	
	MW $\pm$ SD (N)	p students t-Test	MW $\pm$ SD (N)	p students t-Test
sofort	33 $\pm$ 20 (12)	<b>0,009</b>	1166 $\pm$ 832 (18)	<b>0,042</b>
24h verzögert	15 $\pm$ 11 (12)		590 $\pm$ 503 (18)	

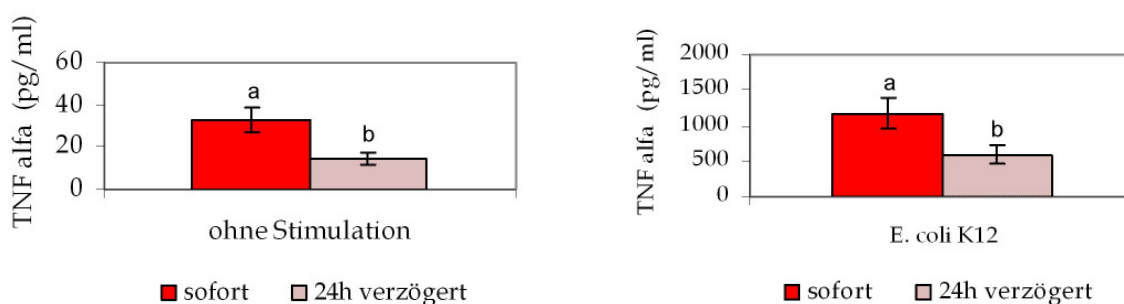


Abbildung 13: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs; gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### IL-8 und IL-6

Nach 24 h Stimulation bestehen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IL-8-Konzentration bei den Kontrollansätzen. Dagegen haben die sofort mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätze signifikant höherer IL-8-Konzentrationen zur Folge (vgl. Tabelle 30, Abbildung 14), als die verzögert stimulierten Kokulturmodellansätze. Signifikant niedrigere IL-6-Konzentrationen nach 24 h Inkubation waren auch bei den 24 h verzögert mit

*E. coli* K12 (vgl. Tabelle 30, Abbildung 14) stimulierten Versuchsbedingungen zu messen. Die Kontrollansätze unterscheiden sich jedoch im Bezug auf die IL-6-Konzentrationen nach 24 h Inkubation nicht.

Tabelle 30: IL-8- und IL-6-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 24-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs; gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

		ohne Stimulans		<i>E. coli</i> K12	
		MW ± SD (N)	p students t-test	MW ± SD (N)	p students t-test
IL-8 in ng/ml	Sofort	28 ± 29 (12)	0,676	100 ± 79 (18)	<b>0,050</b>
	24h verzögert	33 ± 34 (12)		47 ± 43 (18)	
IL-6 in pg/ml	Sofort	63 ± 56 (12)	0,896	15055 ± 7288 (18)	<b>0,005</b>
	24h verzögert	66 ± 42 (12)		4035 ± 3476 (18)	

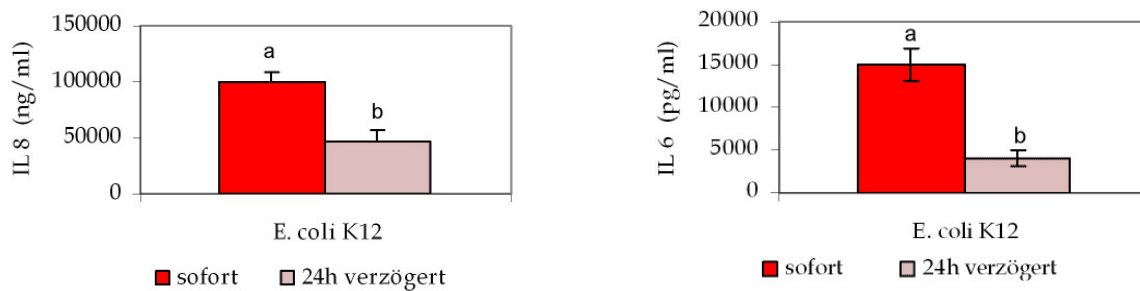


Abbildung 14: IL-8- und IL-6-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 24-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs; gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### IL-10 und IFN- $\gamma$

IL-10 und IFN- $\gamma$  wurden nach einer Inkubationszeit von 72 h gemessen. Dabei war zwar für IL-10 wie bei den anderen Zytokinen ein Trend bei den mit *E. coli* K12 stimulierten Kokulturmodellansätzen zu einer geringeren Zytokinsekretion bei verzögerter Stimulation erkennbar, jedoch waren die gemessenen Unterschiede im student's t-test nicht signifikant (vgl. Tabelle 31). Ohne Stimulation war kein Unterschied sowohl in den IL-10-, als auch den IFN- $\gamma$ -Konzentration zu messen. Auch die mit *E. coli* K12 stimulierten Ansätze unterschieden sich nicht signifikant in ihren basolateralen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen.

Tabelle 31: IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) nach 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. ohne Stimulans bei **sofortiger** bzw. **24 h verzögerter** Stimulation nach basolateraler Zugabe der PBMCs; gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmolell.

		ohne Stimulans		<i>E. coli</i> K12	
		MW $\pm$ SD (N)	p students t-test	MW $\pm$ SD (N)	p students t-test
IL 10 in pg/ml	Sofort	4 $\pm$ 2 (12)	0,735	176 $\pm$ 159 (18)	0,058
	24h verzögert	4 $\pm$ 2 (12)		72 $\pm$ 92 (18)	
IFN $\gamma$ in pg/ml	sofort	5 $\pm$ 2 (12)	0,995	594 $\pm$ 857 (18)	0,589
	24h verzögert	5 $\pm$ 3 (12)		337 $\pm$ 434 (18)	

## 4.2 Stimulationspotentiale probiotischer und kommensaler Bakterien in Enterozyten-Leukozyten-Kokulturen

### 4.2.1 Integrität der CaCo-2-Zellmonolayer

Zur Kontrolle der Integrität der CaCo-2 Zellmonolayer wurden die TEER-Werte bei Inkubationsbeginn und -ende gemessen und daraus die TEER-Differenz errechnet. Des Weiteren wurde die Konzentration des apikal zugesetzten Fluorescein-markierten Dextrans im basolateralen Medium gemessen.

Die TEER-Differenzen nach 4 h Versuchsdauer unterscheiden sich nicht signifikant. Nach 12 h sowie 72 h Versuchsdauer sind Unterschiede messbar (vgl. Tabelle 32). Jedoch sind die mittels Tukey's Post hoc Test ermittelten Signifikanzniveaus statistisch inhomogen (vgl. Tabelle 33).

Tabelle 32: TEER-Differenzen (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) zwischen den TEER-Werten vor und nach 4-, 12- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie der Kontrolle (ohne Stimulation).

	4 h		12 h		72 h	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	15 ± 27 (42)	0,068	27 ± 29 (42)	<0,001	37 ± 32 (42)	0,001
<i>Lb. c. shirota</i>	14 ± 17 (18)		16 ± 21 (18)		39 ± 41 (18)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	13 ± 40 (18)		26 ± 36 (18)		48 ± 37 (18)	
<i>Lb. johnsonii</i>	30 ± 36 (18)		28 ± 25 (18)		59 ± 31 (18)	
<i>Lb. acidophilus</i>	21 ± 32 (18)		44 ± 40 (18)		44 ± 39 (18)	
<i>Lb. sakei</i>	25 ± 14 (12)		8 ± 15 (12)		32 ± 45 (12)	
<i>B. bifidum</i>	-3 ± 11 (12)		-8 ± 6 (12)		4 ± 16 (12)	
<i>E. coli</i> K12	22 ± 47 (42)		1 ± 30 (42)		11 ± 37 (42)	
<i>B. vulgatus</i>	20 ± 16 (12)		24 ± 20 (12)		65 ± 27 (12)	
<i>B. v.</i> MPK	34 ± 19 (12)		17 ± 15 (12)		58 ± 53 (12)	
<i>E. faecalis</i>	0 ± 22 (12)		-10 ± 11 (12)		13 ± 13 (12)	

Tabelle 33: Signifikanzniveaus (Tukey’s Honest-Significant-Difference-Test (HSD-post-hoc-Test)) der TEER-Differenzen zwischen den TEER-Werten vor und nach 12- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie der Kontrolle (ohne Stimulation).

	p Tukey’s (12 h)				p Tukey’s (72 h)						
	<i>E. coli</i> K12	<i>Lb. sakei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i> MPK	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>
Kontrolle	<b>0.001</b>	0.563	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	<b>0.032</b>	0.989	0.501	0.367	0.751	0.133	0.664
<i>Lb. c. shirota</i>	0.696	1.000	0.439	0.305	0.158	0.999	0.837	0.677	0.928	0.215	0.727
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	<b>0.035</b>	0.763	<b>0.033</b>	<b>0.016</b>	<b>0.009</b>	-	0.998	0.977	1.000	<b>0.030</b>	0.251
<i>Lb. johnsonii</i>	<b>0.017</b>	0.654	<b>0.019</b>	<b>0.009</b>	<b>&lt;0,001</b>	0.998		1.000	1.000	<b>0.001</b>	<b>0.028</b>
<i>Lb. acidophilus</i>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0.015</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0.044</b>	1.000	0.968	0.878	0.989	0.090	0.480
<i>Lb. sakei</i>	0.999		0.951	0.892	0.778	0.978	0.612	0.451	0.761	0.685	0.979
<i>B. bifidum</i>	0.997	0.951		1.000	1.000	0.030	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>	-	1.000
<i>E. coli</i> K12		0.999	0.997	0.985	-	<b>0.009</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0.002</b>	1.000	1.000
<i>B. vulgatus</i>	0.255	0.937	0.145	0.089	<b>&lt;0,001</b>	0.977	1.000		1.000	<b>0.001</b>	<b>0.019</b>
<i>B. vulgatus</i> MPK	0.769	0.999	0.492	0.363	<b>0.002</b>	1.000	1.000	1.000	-	<b>0.007</b>	0.078
<i>E. faecalis</i>	0.985	0.892	1.000		1.000	0.251	<b>0.028</b>	<b>0.019</b>	0.078	1.000	-

Fluorescein-markiertes Dextran permeierte nach 4 h in kaum messbaren Mengen durch die Zellmonolayer (Tabelle 34). Nach einer Inkubationszeit von 12 h waren die Permeabilitäten bei beiden *Bacteroides spp.* und *Lb. sakei* im Tukey’s Posthoc Test im Vergleich zu allen anderen Bakterien und der Kontrolle signifikant erhöht. Ebenfalls signifikant erhöht waren nach 72 h die beiden *Bacteroides spp.* und *Lb. sakei* gegenüber den Stimulationen mit allen andern verwendeten Bakterien mit Ausnahme des *E. coli* K12 (vgl. Tabelle 35, Abbildung 15).

Tabelle 34: Prozentuale Permeabilität (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) von Fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2 -Monolayer nach 4-, 12- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie der Kontrolle (ohne Stimulation).

	4 h		12 h		72 h	
	MW + SD (N)	P ANOVA	MW + SD (N)	P ANOVA	MW + SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	0,03 ± 0,12 (42)		0,07 ± 0,33 (54)		3,70 ± 7,42 (42)	
<i>Lb. c. shirota</i>	0,00 ± 0,00 (18)		0,00 ± 0,00 (26)		0,77 ± 0,75 (18)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	0,00 ± 0,00 (18)		0,00 ± 0,00 (29)		0,85 ± 0,74 (18)	
<i>Lb. johnsonii</i>	0,00 ± 0,00 (18)		0,00 ± 0,00 (29)		0,92 ± 0,79 (18)	
<i>Lb. acidophilus</i>	0,00 ± 0,00 (18)		0,00 ± 0,00 (27)		0,60 ± 0,62 (18)	
<i>Lb. sakei</i>	0,00 ± 0,01 (12)	0,375	1,03 ± 1,00 (12)	<b>&lt;0,001</b>	7,75 ± 1,90 (12)	<b>&lt;0,001</b>
<i>B. bifidum</i>	0,00 ± 0,00 (12)		0,00 ± 0,00 (12)		2,35 ± 6,22 (12)	
<i>E. coli</i> K12	0,01 ± 0,05 (42)		0,05 ± 0,28 (55)		4,24 ± 4,13 (42)	
<i>B. vulgatus</i>	0,00 ± 0,00 (12)		0,97 ± 0,83 (12)		8,45 ± 3,50 (12)	
<i>B. v.</i> MPK	0,00 ± 0,00 (12)		0,99 ± 0,83 (12)		7,13 ± 1,35 (12)	
<i>E. faecalis</i>	0,00 ± 0,00 (12)		0,00 ± 0,00 (12)		0,49 ± 1,34 (12)	

ERGEBNISSE

Tabelle 35: Signifikanzniveaus (Tukey's Honest-Significant-Difference-Test (HSD-post-hoc-Test) der prozentualen Permeabilität von Fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2 -Monolayer nach 4-, 12- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie die Kontrolle (ohne Stimulation).

	p Tukey (12 h)			p Tukey (72 h)		
	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i> MPK	<i>Lb. sakei</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i> MPK	<i>Lb. sakei</i>
Kontrolle	<0,001	<0,001	<0,001	0,024	0,311	0,111
<i>Lb. acidophilus</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
<i>Lb. c. shirota</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	<0,001
<i>Lb. rhamnosus. GG</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,001
<i>Lb. johnsonii</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	0,001
<i>Lb. sakei</i>	1,000	1,000	-	1,000	1,000	-
<i>B. bifidum</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	0,164	0,062
<i>E. coli</i> K12	<0,001	<0,001	<0,001	0,081	0,581	0,277
<i>B. vulgatus</i>	-	1,000	1,000	-	1,000	1,000
<i>B. v. MPK</i>	1,000	-	1,000	1,000	-	1,000
<i>E. faecalis</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	0,001

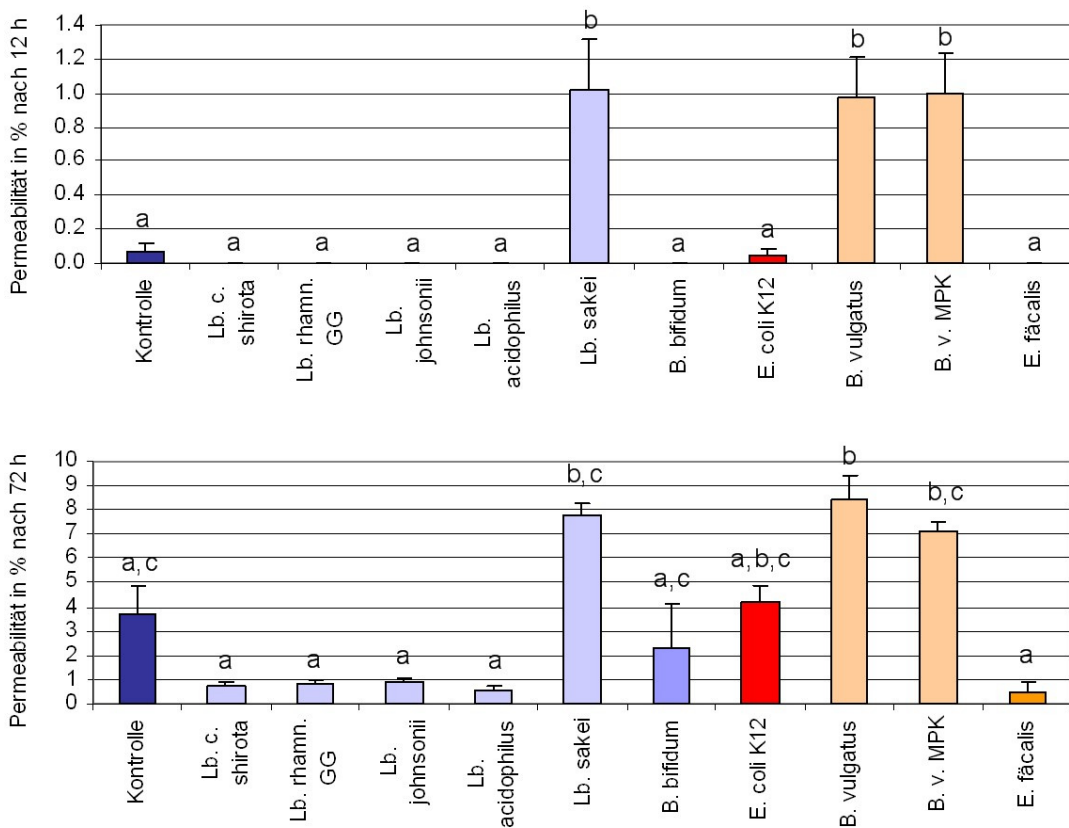


Abbildung 15: Prozentuale Permeabilität (Mittelwerte und Standardfehler) von Fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2 -Monolayer nach 12- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie der Kontrolle (ohne Stimulation). Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

Trotz der erhöhten Permeabilität von Fluorescein-Dextran bei Stimulation mit *Lb. sakei*, *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK waren die Unterschiede in den TEER-Differenzen bei diesen Versuchsbedingungen nicht signifikant erhöht.

#### 4.2.2 Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment

Zur Beurteilung des probiotischen Potentials der verschiedenen eingesetzten Bakterien werden die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 sowie IFN- $\gamma$  mittels ELISA gemessen.

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

Die Konzentration von TNF- $\alpha$  war nach einem Stimulationszeitraum von 4 h, genauso wie 12 h, nach Zusatz von  $1 \times 10^7$  KBE *E. coli* K12 ( $p < 0,001$ ) hoch signifikant zu allen anderen Versuchsbedingungen erhöht. Nach einer Inkubationszeit von 12 h waren die TNF- $\alpha$  - Konzentrationen der mit *Lb. johnsonii* stimulierten Versuchsansätze im Vergleich zu den mit *Lb. acidophilus* und *B. vulgatus* MPK stimulierten Versuchsbedingungen hoch signifikant geringer. Im Vergleich zur Kontrolle und dem mit *B. vulgatus* stimulierten Versuchsansätzen wurde eine signifikant geringere TNF- $\alpha$  Konzentration im basolateralen Kompartiment als bei den mit *Lb. johnsonii* stimulierten Versuchsansätzen gemessen. Außerdem war die TNF- $\alpha$ -Konzentration im basolateralen Kompartiment bei Stimulation mit *Lb. johnsonii* signifikant geringer als bei der Kontrolle. Ebenfalls niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen hat eine Stimulation mit *B. bifidum* im Vergleich zu einer Stimulation mit *B. vulgatus* MPK zur Folge. Darüber hinaus führt die Stimulation mit *E. faecalis* zu hoch signifikant geringeren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen gegenüber *Lb. acidophilus*, sowie *B. vulgatus* MPK und signifikant geringeren Konzentrationen durch Stimulation mit *B. vulgatus* (vgl. Tabelle 36 und Tabelle 37, Abbildung 16).

ERGEBNISSE

Tabelle 36: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4- und 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmmodells.

	TNF- $\alpha$ (4 h)		TNF- $\alpha$ (12 h)	
	MW $\pm$ SD (N) in pg/ml	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N) in pg/ml	p ANOVA
Kontrolle	11 $\pm$ 8 (42)		20 $\pm$ 17 (84)	
<i>Lb. c. shirota</i>	12 $\pm$ 9 (18)		21 $\pm$ 20 (36)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	23 $\pm$ 42 (18)		22 $\pm$ 22 (36)	
<i>Lb. johnsonii</i>	10 $\pm$ 8 (18)		11 $\pm$ 11 (36)	
<i>Lb. acidophilus</i>	11 $\pm$ 6 (18)		59 $\pm$ 208 (36)	
<i>Lb. sakei</i>	7 $\pm$ 5 (12)	<b>&lt;0,001</b>	20 $\pm$ 26 (24)	<b>&lt;0,001</b>
<i>B. bifidum</i>	9 $\pm$ 5 (12)		19 $\pm$ 39 (24)	
<i>E. coli</i> K12	186 $\pm$ 285 (42)		3491 $\pm$ 3445 (84)	
<i>B. vulgatus</i>	9 $\pm$ 5 (12)		27 $\pm$ 17 (24)	
<i>B. v.</i> MPK	9 $\pm$ 5 (12)		28 $\pm$ 13 (24)	
<i>E. faecalis</i>	12 $\pm$ 7 (12)		10 $\pm$ 9 (24)	

Tabelle 37: Signifikanzniveaus (Tukey's Honest-Significant-Difference-Test (HSD-post-hoc-Test) der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im basolateralen Medium nach 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien sowie die Kontrolle (ohne Stimulation).

p (Tukey) 12 h	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. c. shirota</i>	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	<i>E. coli</i> K12	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. v.</i> MPK	<i>E. faecalis</i>
Kontrolle	<b>0,002</b>	0,416	0,554	<b>&lt;0,001</b>	0,643	0,722	0,111
<i>Lb. c. shirota</i>	0,931		1,000	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,019</b>	<b>0,026</b>	<b>0,001</b>
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	0,871	1,000		<b>&lt;0,001</b>	<b>0,030</b>	<b>0,042</b>	<b>0,001</b>
<i>Lb. johnsonii</i>	<b>0,002</b>	0,197	0,280	<b>&lt;0,001</b>	0,991	0,996	0,705
<i>Lb. acidophilus</i>		0,931	0,871	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Lb. sakei</i>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,000	0,999	
<i>B. bifidum</i>	<b>0,001</b>	0,068	0,102	<b>&lt;0,001</b>	1,000	1,000	0,990
<i>E. coli</i> K12	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>B. vulgatus</i>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,019</b>	0,030	<b>&lt;0,001</b>		1,000	1,000
<i>B. v.</i> MPK	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,026</b>	<b>0,042</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,000		0,999
<i>E. faecalis</i>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,015</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,000	1,000	1,000



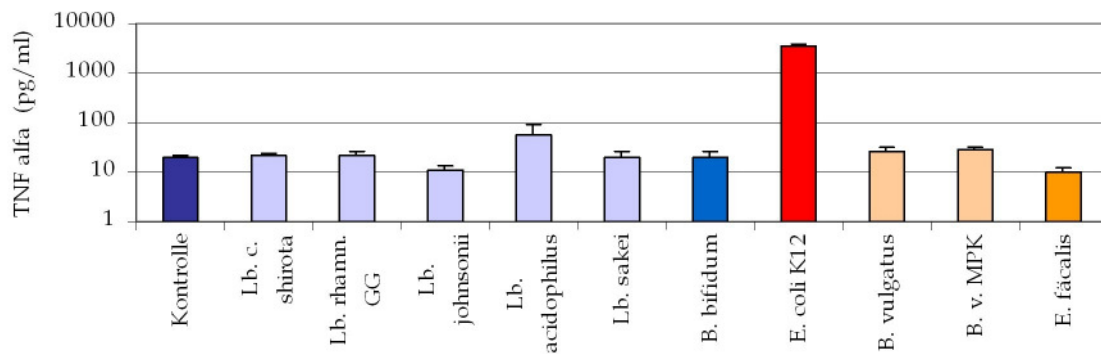


Abbildung 16: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien, gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell

### IL-8

Die Messung von IL-8 in basolateralen Medienproben aus dem, mit verschiedenen Bakterien stimulierten Kokulturmodell, ergab nach einer 4-stündigen Inkubationszeit einen Unterschied in der ANOVA Varianzanalyse. Beim multiplen Mittelwertvergleich konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen mit kommensalen und probiotischen Bakterien stimulierten Kokulturansätzen ermittelt werden. Einzig zu den mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätzen unterscheiden sich die mit allen anderen Bakterien stimulierten Versuchsansätze bzw. die Negativkontrolle sowohl nach 12 h, wie auch nach 24 h Inkubation hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Dabei sind die Versuchsansätze, die mit *E. coli* K12 stimuliert wurden gegenüber den anderen Versuchsbedingungen deutlich erhöht (vgl. Tabelle 38, Abbildung 17). Des weiteren waren nach 12 h im Einzelgruppenvergleich mit Tukey's die IL-8-Konzentrationen der mit *Lb. acidophilus* stimulierten Versuchsansätze gegenüber den mit *B. vulgatus* MPK, *B. bifidum*, sowie *E. faecalis* stimulierten Versuchsansätzen hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht. Signifikant niedriger als bei Stimulation mit *Lb. acidophilus* sind die mit *B. vulgatus* ( $p = 0,003$ ) stimulierten Kokulturmodellansätzen bzw. die Kontrolle ( $p = 0,010$ ). Des weiteren ist die IL-8-Konzentration im basolateralen Medium bei Stimulation mit *Lb. c. shirota* signifikant bzw. hoch signifikant höher als bei Stimulation mit *B. vulgatus* MPK ( $p = 0,030$ ), *E. faecalis* ( $p = 0,026$ ) bzw. *B. bifidum* ( $p = 0,001$ ). Ebenfalls signifikant höher ist die IL-8-Konzentration bei Stimulation mit *Lb. rhamnosus* GG als mit *B. bifidum* ( $p = 0,003$ ).

Tabelle 38: IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 24-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	4 h		12 h		24 h	
	MW $\pm$ SD (N) in ng/ml	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N) in ng/ml	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N) in ng/ml	p ANOVA
Kontrolle	6 $\pm$ 5 (42)	<b>0,046</b>	31 $\pm$ 27 (76)	<b>&lt;0,001</b>	30 $\pm$ 34 (42)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Lb. c. shirota</i>	8 $\pm$ 7 (18)		42 $\pm$ 33 (30)		31 $\pm$ 32 (18)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9 $\pm$ 7 (18)		38 $\pm$ 27 (30)		34 $\pm$ 35 (18)	
<i>Lb. johnsonii</i>	7 $\pm$ 6 (18)		32 $\pm$ 24 (30)		30 $\pm$ 34 (18)	
<i>Lb. acidophilus</i>	7 $\pm$ 5 (18)		55 $\pm$ 40 (29)		46 $\pm$ 51 (18)	
<i>Lb. sakei</i>	4 $\pm$ 3 (12)		24 $\pm$ 16 (24)		26 $\pm$ 21 (12)	
<i>B. bifidum</i>	4 $\pm$ 3 (12)		14 $\pm$ 9 (24)		16 $\pm$ 6 (12)	
<i>E. coli</i> K12	10 $\pm$ 11 (42)		225 $\pm$ 249 (78)		259 $\pm$ 158 (42)	
<i>B. vulgatus</i>	4 $\pm$ 3 (12)		22 $\pm$ 16 (24)		24 $\pm$ 14 (12)	
<i>B. v. MPK</i>	4 $\pm$ 2 (12)		19 $\pm$ 16 (24)		21 $\pm$ 8 (12)	
<i>E. faecalis</i>	5 $\pm$ 4 (12)	18 $\pm$ 17 (24)	16 $\pm$ 8 (12)			

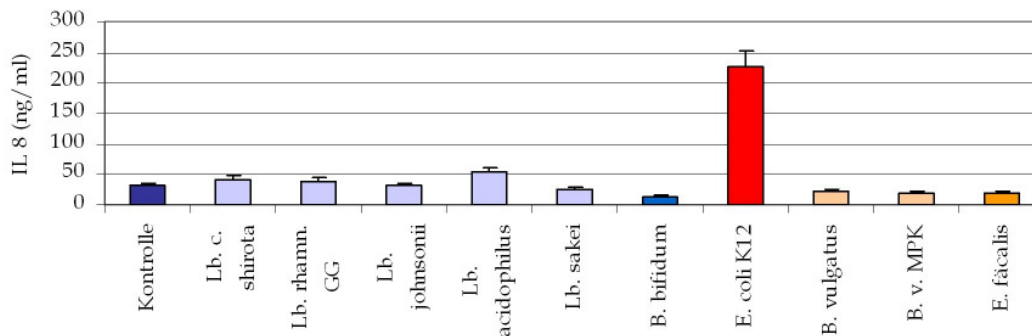


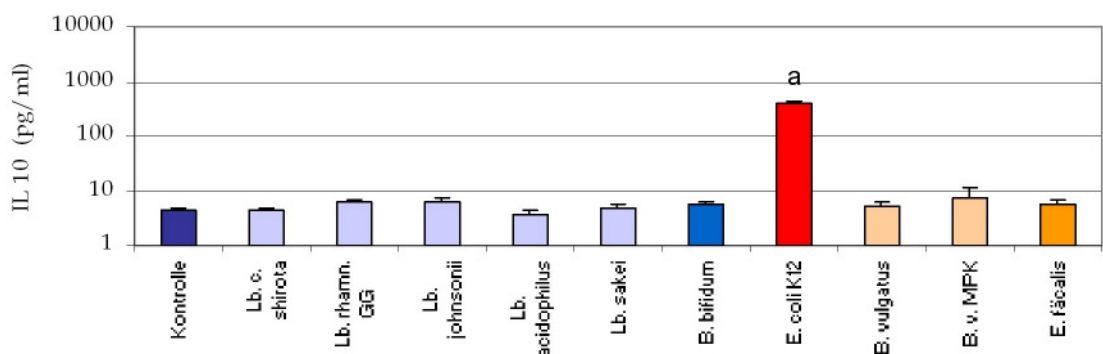
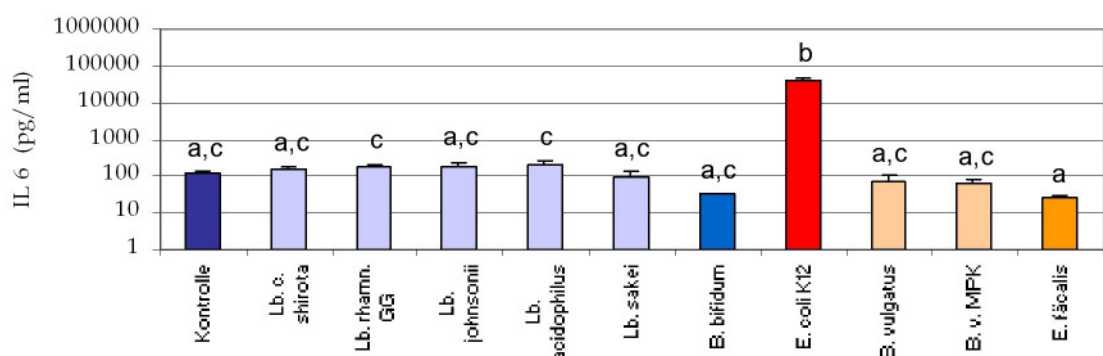
Abbildung 17: IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

### IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$

Auch bei der Messung von IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  sind die jeweiligen Zytokinkonzentrationen der mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätze im Vergleich zu allen anderen Versuchsbedingungen hoch signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) (vgl. Tabelle 39, Abbildung 18). Signifikant erhöht war die basolaterale IL-6-Konzentration ausserdem bei Stimulation mit *Lb. acidophilus* ( $p = 0,018$ ) bzw. *Lb. rhamnosus* GG ( $p = 0,021$ ) im Vergleich zu *E. faecalis*. Ebenfalls signifikant höher als bei Stimulation mit *B. bifidum* war die basolaterale IFN- $\gamma$ -Konzentration bei Stimulation mit *Lb. rhamnosus* GG ( $p = 0,032$ ) im Kokulturmodell.

Tabelle 39: IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12- (IL-6) und 24-stündiger (IL-10, IFN- $\gamma$ ) Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	IL-6 (24 h)		IL-10 (72 h)		IFN- $\gamma$ (72 h)	
	MW $\pm$ SD (N) in pg/ml	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N) in pg/ml	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N) in pg/ml	p ANOVA
Kontrolle	119 $\pm$ 143 (40)		4 $\pm$ 3 (42)		5 $\pm$ 4 (42)	
<i>Lb. c. shirota</i>	147 $\pm$ 128 (18)		4 $\pm$ 3 (18)		7 $\pm$ 3 (18)	
<i>Lb. rhamn. GG</i>	178 $\pm$ 140 (18)		6 $\pm$ 3 (18)		8 $\pm$ 4 (18)	
<i>Lb. johnsonii</i>	173 $\pm$ 260 (18)		6 $\pm$ 6 (18)		4 $\pm$ 2 (18)	
<i>Lb. acidophilus</i>	205 $\pm$ 247 (18)		4 $\pm$ 3 (18)		6 $\pm$ 2 (18)	
<i>Lb. sakei</i>	978 $\pm$ 106 (12)	<b>&lt;0,001</b>	5 $\pm$ 3 (12)	<b>&lt;0,001</b>	6 $\pm$ 2 (12)	<b>&lt;0,001</b>
<i>B. bifidum</i>	31 $\pm$ 8 (10)		6 $\pm$ 3 (12)		2 $\pm$ 1 (12)	
<i>E. coli</i> K12	41109 $\pm$ 26350 (42)		414 $\pm$ 235 (42)		228 $\pm$ 8 (41)	
<i>B. vulgatus</i>	74 $\pm$ 94 (12)		5 $\pm$ 4 (12)		4 $\pm$ 3 (12)	
<i>B.vulgatus</i> MPK	59 $\pm$ 62 (12)		7 $\pm$ 13 (12)		4 $\pm$ 2 (12)	
<i>E. faecalis</i>	27 $\pm$ 118 (12)		6 $\pm$ 3 (12)		3 $\pm$ 1 (12)	



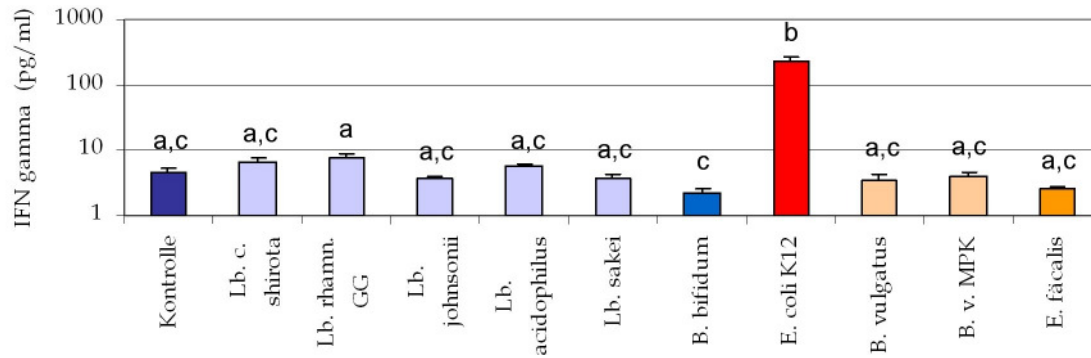


Abbildung 18: IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12- (IL-6) und 24-stündiger (IL-10, IFN- $\gamma$ ) Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmolell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### IL-8-mRNA Expression

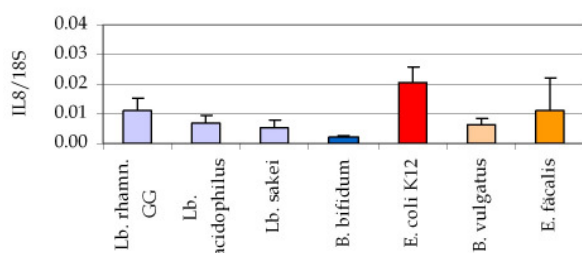
Um festzustellen, ob die von den Bakterien ausgehende Aktivierung primär von den Enterozyten oder den Leukozyten ausgeht, wurde eine quantitative RT real-time-PCR für die Expression von IL-8 RNA durchgeführt. Als Housekeeping Gen diente 18S-RNA.

In der RNA von CaCo-2-Zellen konnten nach 4 h Inkubationszeit keine Veränderungen in der Expression von IL-8/18S in den mit verschiedenen Bakterien stimulierten Kokultursversuchsansätzen gemessen werden. Jedoch war in der RNA der PBMCs bereits eine verstärkte Expression von IL-8/18S in den mit *E. coli* K12 und *Lb. acidophilus* stimulierten Kokulturmolellansätzen zu messen. Im multiplen Mittelwertsvergleich mittels Tukey's Honest-Significant-Difference-Test konnte die hoch signifikant verstärkte IL-8/18S mRNA Expression durch Stimulation mit *E. coli* K12 ( $p=0,002$ ) und *Lb. acidophilus* ( $p=0,001$ ) gegenüber den mit *B. vulgatus* stimulierten Versuchsansätzen bestätigt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass die IL-8/18S mRNA Expression in PBMC' im Vergleich zu CaCo-2-Zellen im unstimulierten Kokulturmolell um das ca. 5-fache erhöht ist. Je nach Versuchsbedingung ist die IL-8/18S mRNA Expression dann um das bis zu 2000-fache in PBMC' höher als in CaCo-2-Zellen.

Tabelle 40: Quotient der IL-8/18S-mRNA in CaCo-2-Zellen und PBMC' (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien im Kokulturmodell. Die Messung erfolgte mittels RT-real-time-PCR.

	CaCo-2 IL-8/18S mRNA		PBMC IL-8/18S mRNA	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	1,631 $\pm$ 6,085 (14)		8,601 $\pm$ 9,149 (14)	
<i>Lb. rhamnosus GG</i>	0,011 $\pm$ 0,011 (6)	0,123	10,043 $\pm$ 5,076 (6)	0,001
<i>Lb. acidophilus</i>	0,007 $\pm$ 0,006 (6)		18,947 $\pm$ 6,965 (5)	
<i>Lb. sakei</i>	0,005 $\pm$ 0,008 (8)		5,993 $\pm$ 2,509 (8)	
<i>B. bifidum</i>	0,002 $\pm$ 0,002 (8)		7,943 $\pm$ 3,793 (7)	
<i>E. coli K12</i>	0,021 $\pm$ 0,019 (14)		17,587 $\pm$ 17,220 (14)	
<i>B. vulgatus</i>	0,006 $\pm$ 0,006 (8)		2,874 $\pm$ 1,996 (8)	
<i>E. faecalis</i>	0,011 $\pm$ 0,030 (8)		8,851 $\pm$ 8,014 (8)	

A



B

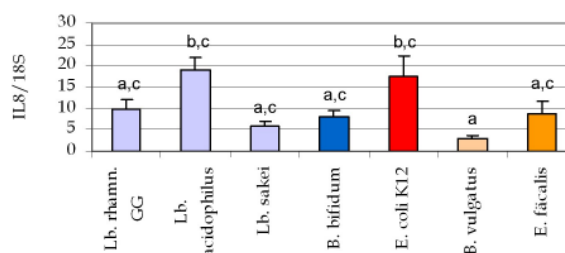


Abbildung 19: Quotient der IL-8/18S-mRNA in (A) CaCo-2-Zellen und (B) PBMC' (Mittelwerte und Standardfehler) nach 4-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien im Kokulturmodell. Die Messung erfolgte mittels RT-real-time-PCR. Der Einzelgruppenvergleich erfolgte mittels Tukey's Significant-Difference-Test an den logarithmierten Werten. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

Nach einer Inkubationszeit von 12 h war die Expression der IL-8/18S mRNA in den mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsbedingungen sowohl in der RNA der CaCo-2-Zellen, als auch in der RNA der PBMC erhöht. Im multiplen Mittelwertvergleich zeigen sich in der mRNA aus CaCo-2-Zellen, eine hoch signifikante Erhöhung der IL-8/18S mRNA Expression in den mit *E. coli* K12 ( $p \leq 0,001$ ) stimulierten Versuchsansätzen im Vergleich zu sämtlichen anderen Versuchsbedingungen. Dagegen ist IL-8/18S mRNA aus den PBMC' in den mit *E. coli* K12 im Vergleich zu den mit *Lb. sakei* ( $p=0,021$ ) stimulierten Versuchsansätzen nur signifikant erhöht und im Vergleich zu den mit *B. vulgatus* ( $p=0,007$ ), *B. bifidum* ( $p < 0,001$ ) und *E. faecalis* ( $p < 0,001$ ) stimulierten Versuchsansätzen hoch signifikant erhöht. Des weiteren

führt die Stimulation mit *B. bifidum* im Vergleich zu einer Stimulation mit *Lb. acidophilus* ( $p=0,026$ ) aber auch *Lb. rhamnosus* GG ( $p=0,008$ ) zu einer geringeren IL-8/18S mRNA Expression. Auch die IL-8/18S mRNA Expression induziert durch *E. faecalis* ist signifikant niedriger als die durch Stimulation mit *Lb. rhamnosus* GG ( $p=0,024$ ) induzierte Expression. Auch nach 12 h Inkubation fällt auf, dass die IL-8/18S mRNA Expression der Kontrolle in PBMCs um das 700-fache höher ist, als in den CaCo-2-Zellen. In den verschiedenen Versuchsbedingungen ist die IL-8/18S mRNA Expression in PBMCs im Vergleich zu der Expression in CaCo-2-Zellen ebenfalls wesentlich höher.

Tabelle 41: Quotient der IL-8/18S-mRNA in CaCo-2-Zellen und PBMC' (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien im Kokulturmodell. Die Messung erfolgte mittels RT-real-time-PCR.

	CaCo-2 IL-8/18S mRNA		PBMC IL-8/18S mRNA	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	0,038 $\pm$ 0,102 (18)		21,401 $\pm$ 26,422 (18)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	0,011 $\pm$ 0,007 (9)	<b>&lt;0,001</b>	18,738 $\pm$ 10,193 (9)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Lb. acidophilus</i>	0,010 $\pm$ 0,006 (9)		15,196 $\pm$ 4,488 (8)	
<i>Lb. sakei</i>	0,004 $\pm$ 0,003 (12)		30,379 $\pm$ 56,786 (12)	
<i>B. bifidum</i>	0,002 $\pm$ 0,005 (12)		3,660 $\pm$ 3,299 (12)	
<i>E. coli</i> K12	1,496 $\pm$ 3,174 (17)		113,097 $\pm$ 285,478 (16)	
<i>B. vulgatus</i>	0,005 $\pm$ 0,004 (12)		20,198 $\pm$ 39,049 (12)	
<i>E. faecalis</i>	0,002 $\pm$ 0,002 (12)		4,362 $\pm$ 4,069 (12)	

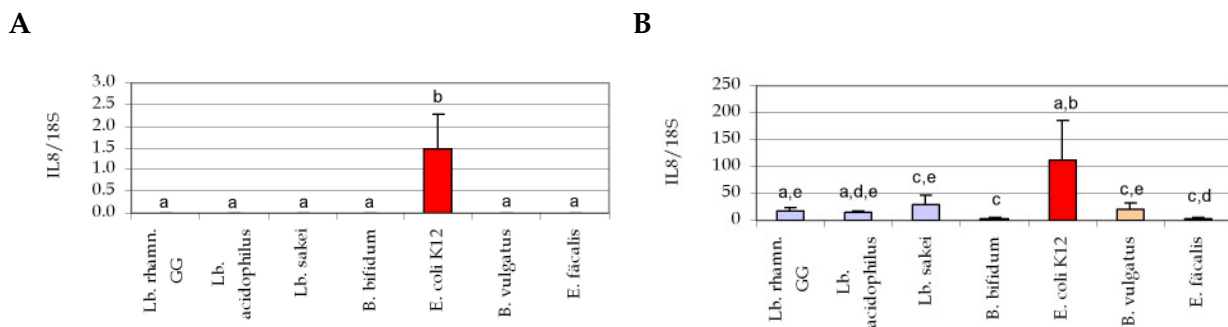


Abbildung 20: Quotient der IL-8/18S-mRNA in (A) CaCo-2-Zellen und (B) PBMC' (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener probiotischer, kommensaler oder lebensmitteloriginärer Bakterien im Kokulturmodell. Die Messung erfolgte mittels RT-real-time-PCR. Der Einzelgruppenvergleich erfolgte mittels Tukey's Significant-Difference-Test an den logarithmierten Werten. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### 4.3 Der Einfluss des gram-negativen probiotischen *E. coli* Nissle im Kokulturmodell im Vergleich zum nichtpathogenen *E. coli* K12 und dem enteropathogenen *E. coli* EPEC

#### 4.3.1 Integrität der CaCo-2-Zellschicht

Zur Kontrolle der Integrität der CaCo-2-Zellschicht wurden auch hier Messungen der Veränderung des TEER im Verlauf des Versuchs, sowie Messungen der Permeabilität von fluorescein-markiertem Dextran im basolateralen Kompartiment durchgeführt.

Nach 6 h Inkubationszeit konnten signifikant erhöhte TEER-Differenzen aufgrund der Stimulation mit *E. coli* Nissle im Vergleich zur Kontrolle und den mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätzen gemessen werden. Bei einer Inkubationszeit von 12 h waren die TEER-Differenzen des Kontrollansatzes und des mit *E. coli* K12 versetzten Versuchsansätze signifikant niedriger als bei Stimulation mit EPEC. 72 h nach Versuchsbeginn waren die TEER-Differenzen der mit *E. coli* Nissle (p=0,032) bzw. *E. coli* K12 (p=0,029) stimulierten Versuchsansätze signifikant niedriger als die der mit EPEC stimulierten Versuchsansätze bzw. hochsignifikant niedriger als die Kontrollansätze (p=0,004).

Tabelle 42: TEER-Differenzen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) zwischen den TEER-Werten vor und nach 6-, 12-, 24- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp.sowie der Kontrolle (ohne Stimulation).

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
6 h	Kontrolle	4	104	16	<b>0,014</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	205	243	16	
	<i>E. coli</i> K12	13	231	16	
	EPEC	1206	172	16	
12 h	Kontrolle	-27	160	16	<b>0,007</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	551	112	16	
	<i>E. coli</i> K12	-242	142	16	
	EPEC	136	165	16	
24 h	Kontrolle	77	140	16	0,142
	<i>E. coli</i> Nissle	62	140	16	
	<i>E. coli</i> K12	-8	208	16	
	EPEC	131	173	16	

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
72 h	Kontrolle	189	142	16	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	22	105	16	
	<i>E. coli</i> K12	42	144	37	
	EPEC	155	129	16	

Die Permeabilität von fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2-Zellmonolayer schwankte je nach Zeitpunkt und Stimulationsbedingungen zwischen 0,9 und knapp 6 %. Die mittels ANOVA errechneten Unterschiede beruhten beim Einzelgruppenvergleich der Versuchsbedingungen mit Tukey's Post hoc Test bei 6 h, 12 h und 24 h auf Unterschieden zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen und dem Kontrollansatz. Nach 72 h Inkubation war die Permeabilität des Fluorescein markierten Dextrans bei Stimulation mit *E. coli* K12 hoch signifikant höher als bei den mit EPEC (p=0,008) stimulierten Versuchsansatz bzw. den Negativkontrollen (p<0,001).

Tabelle 43: Prozentuale Permeabilität (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) von Fluorescein-markiertem Dextran durch die CaCo-2 -Monolayer nach 6-, 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp. sowie der Kontrolle (ohne Stimulation).

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
6 h	Kontrolle	1,94	1,05	8	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	0,9	0,43	8	
	<i>E. coli</i> K12	0,9	0,2	8	
	EPEC	0,9	0,15	8	
12 h	Kontrolle	1,93	0,18	8	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	1,2	0,35	8	
	<i>E. coli</i> K12	1,0	0,3	8	
	EPEC	1,2	0,46	8	
24 h	Kontrolle	2,71	0,81	8	0,024
	<i>E. coli</i> Nissle	1,6	0,91	8	
	<i>E. coli</i> K12	1,4	0,9	8	
	EPEC	1,4	0,95	8	
72 h	Kontrolle	2,53	1,11	8	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	4,3	1,08	8	
	<i>E. coli</i> K12	5,9	1,9	24	
	EPEC	3,6	1,57	8	



### 4.3.2 Zytokinkonzentrationen im basolateralen Kompartiment

An Zytokinen wurden zum Vergleich der drei *E. coli* spp. TNF- $\alpha$ , nach 6 h, 12 h und 24 h sowie IL-6, IL-8 und IL-10 nach 12 h, 24 h und 72 h basolateral mittels ELISA gemessen, Darüber hinaus wurde die Konzentration von IFN- $\gamma$  nach 72 h im basolateralen Medium ebenfalls mittels ELISA bestimmt.

#### TNF- $\alpha$

Im Einzelgruppenvergleich der *E. coli* mit Hilfe des Tukey's Honest-Significant-Difference-Test waren bei Stimulation mit EPEC hoch signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen gegenüber den beiden anderen *E. coli* spp. (*E. coli* K12 (p(6h, 12h)<0,001) und dem probiotischen *E. coli* Nissle (p(6h)=0,007, p(12h)<0,001)) zu messen.

Tabelle 44: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4- und 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp. gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmolell.

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
6 h	Kontrolle	16	12	19	<b>0,001</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	131	185	20	
	<i>E. coli</i> K12	156	311	42	
	EPEC	88	227	20	
12 h	Kontrolle	22	18	20	<b>&lt;0,001</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	447	208	20	
	<i>E. coli</i> K12	507	515	42	
	EPEC	161	247	20	
24 h	Kontrolle	12	9	20	<b>&lt;0,001</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	157	176	20	
	<i>E. coli</i> K12	293	406	42	
	EPEC	72	105	20	

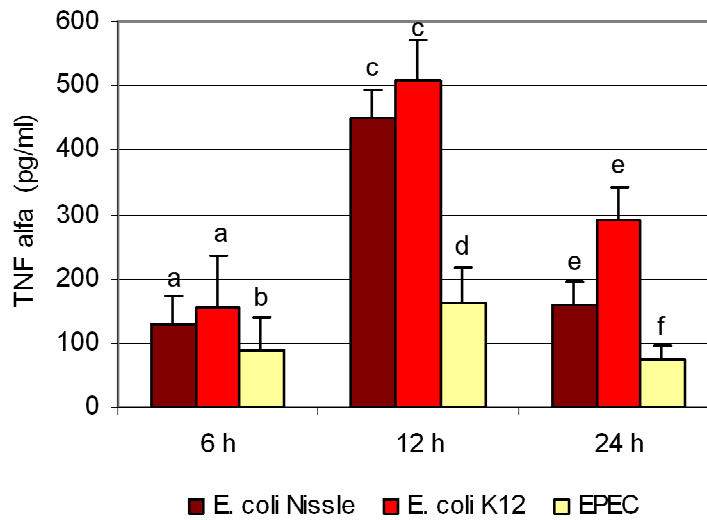


Abbildung 21: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp., gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### IL-8

Nach 12 h Inkubationszeit konnten in den mit *E. coli* Nissle stimulierten Versuchsansätzen hoch signifikant höhere IL-8-Konzentrationen gemessen werden als bei Stimulation mit EPEC ( $p=0,002$ ). Dagegen war die IL-8-Konzentration im basolateralen Medium bei Stimulation mit *E. coli* K12 nur signifikant höher als bei Stimulation mit EPEC ( $p=0,047$ ). 24 h und 72 h nach Stimulation waren die durch EPEC Zugabe induzierten basolateralen IL-8-Konzentrationen ebenfalls geringer als die durch die beiden anderen *E. coli* spp. (*E. coli* K12 ( $p(6h, 12h)<0,001$ ) und dem probiotischen *E. coli* Nissle ( $p(24h)=0,004$ ,  $p(72h)<0,001$ )) induzierte IL-8 Ausschüttung.

Tabelle 45: IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp., gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
12 h	Kontrolle	23,9	24,4	20	<b>0,002</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	100,0	40,1	20	
	<i>E. coli</i> K12	80,3	42,6	42	
	EPEC	53,4	38,2	20	

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
24 h	Kontrolle	46,5	57,7	20	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	248,1	85,4	20	
	<i>E. coli</i> K12	272,0	122,9	42	
	EPEC	133,9	93,7	20	
72 h	Kontrolle	38,8	49,82	20	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	318,1	70,5	20	
	<i>E. coli</i> K12	325,3	140,3	41	
	EPEC	131,2	79,5	20	

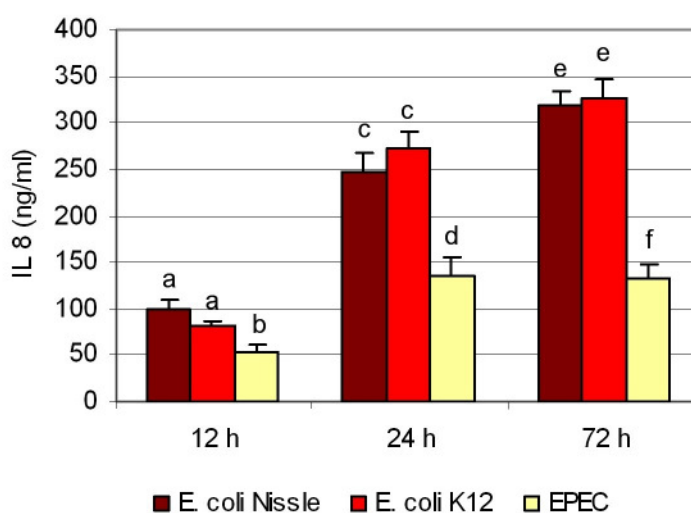


Abbildung 22: IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* spp. gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### IL-6

Nach 12 h Inkubationszeit waren keine signifikanten Unterschiede in den induzierten basolateralen IL-6-Konzentrationen messbar. Erst nach 24 h konnte ein signifikanter Unterschied in den gemessenen IL-6-Konzentrationen werden. Dabei beträgt die basolaterale IL-6-Konzentration der mit *E. coli* Nissle stimulierten Versuchsansätze das dreifache der durch EPEC ( $p=0,031$ ) induzierten IL-6-Konzentration. Nach 72 h ist dann wie bei den Messungen von IL-8 und TNF- $\alpha$  die durch EPEC induzierte Zytokinsekretion hoch signifikant niedriger als die durch die Stimulation mit den beiden anderen *E. coli* spp. (*E. coli* K12 ( $p<0,001$ ) und dem probiotischen *E. coli* Nissle ( $p<0,001$ )) im Kokulturmodell ausgelöste IL-6-Konzentration im basolateralen Medium.

Tabelle 46: IL-6-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp., gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
12 h	Kontrolle	297	399	20	0,605
	<i>E. coli</i> Nissle	22589	30672	20	
	<i>E. coli</i> K12	15885	25820	42	
	EPEC	13733	35751	20	
24 h	Kontrolle	1056	2082	20	0,033
	<i>E. coli</i> Nissle	39102	35139	20	
	<i>E. coli</i> K12	31391	31472	42	
	EPEC	13839	24967	20	
72 h	Kontrolle	454	1110	20	<0,001
	<i>E. coli</i> Nissle	26038	13916	20	
	<i>E. coli</i> K12	26175	16494	41	
	EPEC	8050	9016	20	

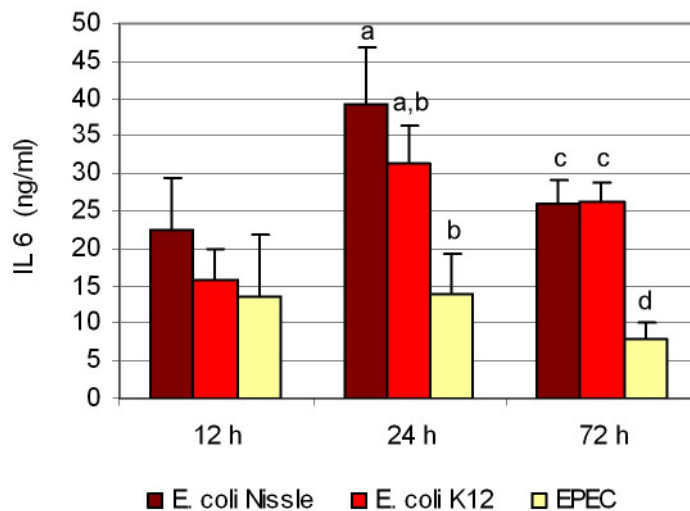


Abbildung 23: IL-6-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* spp. gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

**IL-10**

Auch bei IL-10 können nach 12 h signifikante ( $p=0,002$ ) und nach 24 h und 72 h hoch signifikante Unterschiede ( $p(24h)<0,001$ ;  $p(72h)=0,001$ ) zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen gemessen werden. Mit Hilfe von Tukey's kommt man zu dem Ergebnis, dass die Unterschiede der ANOVA auf den Differenzen zwischen den mit EPEC stimulierten und den mit *E. coli* Nissle ( $p(12h)=0,022$ ;  $p(24h)=0,002$ ;  $p(72h)<0,001$ ) bzw. *E. coli* K12 ( $p(12h)=0,001$ ;  $p(24h) <0,001$ ;  $p(72h)=0,016$ ) stimulierten Versuchsansätzen beruhen.

Tabelle 47: IL-10-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp., gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
12 h	Kontrolle	27	20	20	<b>0,002</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	65	39	20	
	<i>E. coli</i> K12	84	66	42	
	EPEC	55	117	20	
24 h	Kontrolle	18	13	20	<b>&lt;0,001</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	212	125	20	
	<i>E. coli</i> K12	216	109	42	
	EPEC	92	85	20	
72 h	Kontrolle	18	9	20	<b>0,001</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	142	80	20	
	<i>E. coli</i> K12	106	68	41	
	EPEC	48	80	20	

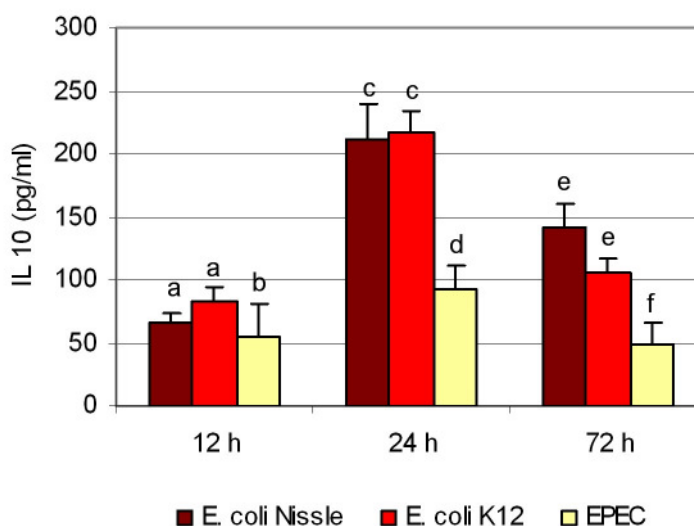


Abbildung 24: IL-10-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* spp. gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

**IFN- $\gamma$**

Genauso wie bei den anderen Zytokinen ergab die Messung von IFN- $\gamma$  bei den verschiedenen stimulierten Versuchsansätzen einen signifikanten Unterschied in der ANOVA. Auch hier waren im Post hoc Test nach Tukey die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im basolateralen Medium bei Stimulation mit EPEC deutlich geringer als bei Stimulation mit *E. coli* K12 (p=0,012) bzw. *E. coli* Nissle (p=0,029).

Tabelle 48: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml verschiedener *E. coli* spp., gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

Zeitpunkt	Stimulans	MW	SD	N	P ANOVA
72 h	Kontrolle	11	5	20	<b>0,010</b>
	<i>E. coli</i> Nissle	96	99	20	
	<i>E. coli</i> K12	108	124	41	
	EPEC	34	53	20	

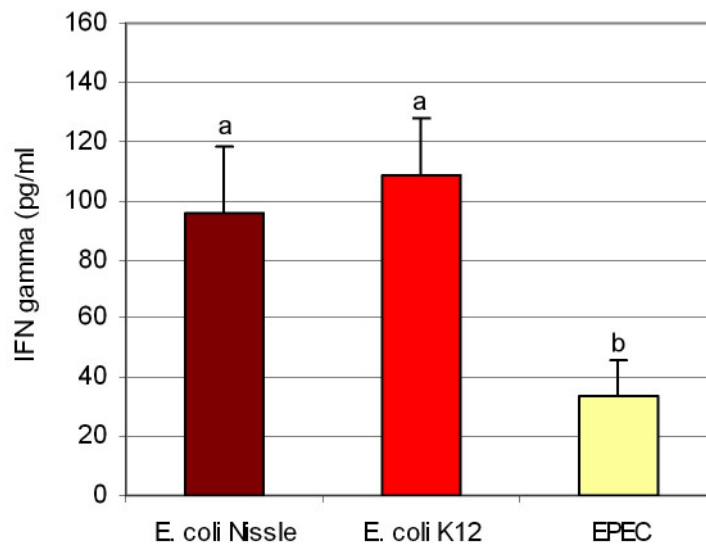


Abbildung 25: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 72-stündiger Inkubation bei apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* spp. gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.4 Sind die immunstimulierenden Eigenschaften von Bakterien im Kokulturmodell auf definierte Membranbestandteile zurückzuführen?

##### 4.4.1 Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von Bakterien und deren Membranbestandteilen

Um die Frage zu beantworten, ob die Membranbestandteile der jeweiligen Bakterien für die Zytokinantwort im Kokulturmodell verantwortlich sind, wurden parallele Stimulationsversuche mit je  $1 \times 10^7$  KBE/ml Bakterien und  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS durchgeführt; für die *Bacteroides* sp. und *E. faecalis* wurden zusätzlich  $10 \mu\text{g/ml}$  sowie  $100 \mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK LPS sowie *E. faecalis* LTA eingesetzt.  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS wurde gewählt, da in Vorversuchen ermittelt wurde, dass  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 unter den angewendeten Versuchsbedingungen im Mittel  $1 \mu\text{g/ml}$  entspricht.

##### 4.4.1.1 Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von *E. coli* K12 und dessen LPS

###### Durchlässigkeit der CaCo-2 Zellmonolayer

Zur Messung der Integrität der CaCo-2 Monolayer wurden die TEER-Differenzen und die Permeabilitäten gemessen. Dabei ergaben sich mit Ausnahme der Permeabilität nach 12 h, die bei Stimulation mit *E. coli* K12 etwas geringer war, als bei Stimulation mit dessen LPS, keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 49). Die Permeabilität des fluoresceinmarkierten Dextrans ist in beiden Gruppen sowohl bei den mit *E. coli* K12 stimulierten als auch den mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS stimulierten Versuchsansätzen so gering, dass von einer dichten CaCo-2-Zellschicht ausgegangen werden kann.

Tabelle 49: TEER-Differenzen zwischen den TEER-Werten vor und nach 4-, 12- und 72-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 4-, 12- und 72- Stunden apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. 1 µg/ml dessen LPS (Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Anzahl der Versuche (N)).

	Zeitpunkt	MW ± SD (N)		p student's t-Test
		<i>E. coli</i> K12 1x10 <sup>7</sup> /ml	LPS von <i>E. coli</i> K12 1 µg/ml	
TEER-Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>	4 h	13 ± 19 (12)	24 ± 25 (12)	0,245
	12 h	0 ± 24 (12)	-6 ± 30 (12)	0,623
	72 h	20 ± 20 (12)	-13 ± 110 (31)	0,311
Permeabilität in %	4 h	0,02 ± 0,05 (12)	0,00 ± 0,00 (12)	0,177
	12 h	0,18 ± 0,56 (14)	0,71 ± 0,66 (32)	<b>0,013</b>
	72 h	10,32 ± 1,05 (12)	9,85 ± 2,38 (12)	0,398

Auch die Durchlässigkeit der CaCo-2-Zellschicht für LPS war in beiden Versuchsansätzen nach sämtlichen Zeitpunkten vergleichbar (vgl. Tabelle 49). Damit war gewährleistet, dass Unterschiede in den immunstimulierenden Eigenschaften nicht auf unterschiedliche basolaterale Endotoxinkonzentrationen zurückzuführen waren.

Tabelle 50: Basolaterale LPS Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS.

	Zeitpunkt	MW ±SD (N)		p student's t Test
		<i>E. coli</i> K12 1x10 <sup>7</sup> /ml	LPS von <i>E. coli</i> K12 1 µg/ml	
LPS im basolateralen Medium in pg/ml	4 h	23 ± 25 (6)	82 ± 160 (6)	0,977
	12 h	155 ± 134 (6)	118 ± 134 (25)	0,546
	72 h	255 ± 146 (6)	170 ± 47 (6)	0,358

#### Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Als Parameter für die immunstimulierenden Eigenschaften werden TNF-α, IL-6, IL-8 und IL-10 sowie IFN-γ nach verschiedenen Zeitpunkten herangezogen (vgl. Tabelle 51). Dabei zeigen sich mit Ausnahme von IL-8 nach 12-stündiger Inkubation keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Bakterien und den mit deren LPS stimulierten Versuchsansätzen (vgl. Abbildung 26).



Tabelle 51: TNF- $\alpha$ -, IL-8-, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	Zeitpunkt	MW $\pm$ SD (N)		p student's t Test	
		Kontrolle	<i>E. coli</i> K12 $1 \times 10^7/\text{ml}$		LPS von <i>E. coli</i> K12 $1 \mu\text{g/ml}$
TNF- $\alpha$ pg/ml	4 h	11 $\pm$ 9 (24)	339 $\pm$ 427 (12)	162 $\pm$ 140 (12)	0,673
	12 h	15 $\pm$ 14 (65)	6632 $\pm$ 4546 (24)	6237 $\pm$ 4112 (43)	0,718
IL-8 ng/ml	4 h	5 $\pm$ 3 (24)	17 $\pm$ 16 (12)	15 $\pm$ 9 (12)	0,829
	12 h	19 $\pm$ 16 (65)	468 $\pm$ 321 (24)	325 $\pm$ 259 (43)	<b>0,050</b>
	24 h	18 $\pm$ 9 (24)	332 $\pm$ 188 (12)	428 $\pm$ 179 (12)	0,214
IL-6 ng/ml	24 h	0,06 $\pm$ 0,08 (24)	50 $\pm$ 25 (12)	65 $\pm$ 48 (12)	0,479
IL-10 pg/ml	72 h	5 $\pm$ 2 (24)	412 $\pm$ 222 (12)	534 $\pm$ 322 (12)	0,294
IFN- $\gamma$ pg/ml	72 h	4 $\pm$ 5 (24)	130 $\pm$ 87 (12)	129,61 $\pm$ 103 (12)	0,996

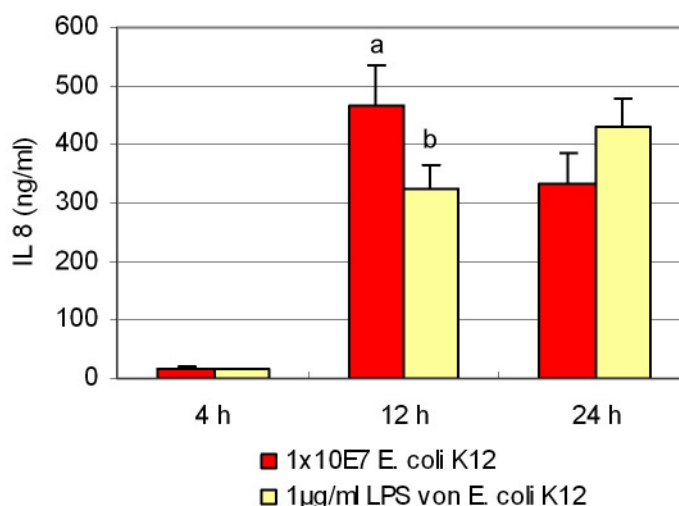


Abbildung 26: IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.4.1.2 Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von *B. vulgatus* und dessen LPS

Um die Vergleichbarkeit aller Versuchsblöcke zu gewährleisten wurden student's t-tests für sämtliche Parameter der Positivkontrollen durchgeführt. Es wurden keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Positivkontrollen der beiden Versuchsblöcke festgestellt. Aus diesem Grund wurde im folgenden davon ausgegangen, dass die vorhandenen Unterschiede auf die immunstimulierende Wirkung des Bakteriums bzw. dessen LPS zurückzuführen waren.

Durchlässigkeit der CaCo-2 Zellmonolayer

Zur Kontrolle der Integrität der Zellmonolayer wurden auch hier die TEER-Differenzen, sowie die prozentuale Permeabilität ermittelt. Dabei konnten mit Ausnahme der TEER-Differenz nach 4 h, die bei Stimulation mit 1 µg/ml *B. vulgatus* LPS höher war als bei Stimulation mit 1x10<sup>7</sup> KBE/ml *B. vulgatus*, keine signifikanten Unterschiede gemessen werden (vgl. Tabelle 52), so dass von vergleichbaren Bedingungen im Verlauf des Versuchs ausgegangen wurde.

Tabelle 52: TEER-Differenzen zwischen den TEER-Werten vor und nach 4-, 12- und 72-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 4-, 12- und 72- Stunden apikaler Stimulation mit 1 x 10<sup>7</sup> KBE/ml *B. vulgatus* bzw. 1, 10 und 100 µg/ml dessen LPS (Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Anzahl der Versuche (N)).

	Zeitpunkt	MW ± SD (N)				p ANOVA/ student's t-test
		<i>B. vulgatus</i> 1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 1µg/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 10µg/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 100µg/ml	
TEER Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>	4 h	20 ± 16 (12)	45 ± 18 (12)	-	-	<b>0,002</b>
	12 h	24 ± 20 (12)	31 ± 98 (22)	-61 ± 130 (10)	9 ± 103 (10)	0,085
	72h	65 ± 27 (12)	52 ± 16 (12)	-	-	0,191
Permeabilität in %	4 h	0,00 ± 0,00 (12)	0,18 ± 0,41 (12)	-	-	0,154
	12 h	0,97 ± 0,83 (12)	0,83 ± 0,83 (22)	0,72 ± 0,43 (10)	1,11 ± 0,53 (9)	0,655
	72 h	8,45 ± 3,50 (12)	7,45 ± 1,67 (12)	-	-	0,981

Im Bezug auf die Durchlässigkeit der CaCo-2-Zellschicht für LPS waren nach 4 h Inkubation noch keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen. Nach 12 h ist die basolaterale Endotoxinkonzentration bei Stimulation mit 1x10<sup>7</sup> KBE/ml *B. vulgatus* hoch signifikant niedriger als bei Stimulation mit 100 µg/ml LPS (p<0,001). Bei Stimulation mit den beiden anderen Endotoxinkonzentrationen besteht kein statistischer Unterschied in der basolateralen LPS-Konzentration zu den mit Bakterien stimulierten Versuchsansätzen. Die einzelnen Endotoxinkonzentrationen unterscheiden sich signifikant (1 µg/ml vs. 10 µg/ml (p=0,014) bzw. hochsignifikant (1 µg/ml vs. 100 µg/ml (p<0,001), 10 µg/ml vs. 100 µg/ml (p<0,001)). Nach 72 h ist die Durchlässigkeit dagegen bei den mit 1 µg/ml LPS stimulierten Versuchsansätzen höher als bei Stimulation mit Bakterien (vgl.

Tabelle 53, Abbildung 27).

Tabelle 53: Basolaterale LPS Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* bzw. 1, 10, und 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS.

	Zeitpunkt	MW ± SD (N)				p ANOVA/ student's t-test
		<i>B. vulgatus</i> 1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 1µg/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 10µg/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 100µg/ml	
LPS basolateral in pg/ml	4 h	1 ± 1 (9)	20 ± 34 (8)	-	-	0,110
	12 h	223 ± 616 (8)	10 ± 20 (18)	140 ± 198 (9)	2038 ± 2099 (10)	<0,001
	72 h	18 ± 30 (9)	151 ± 231 (8)	-	-	0,015

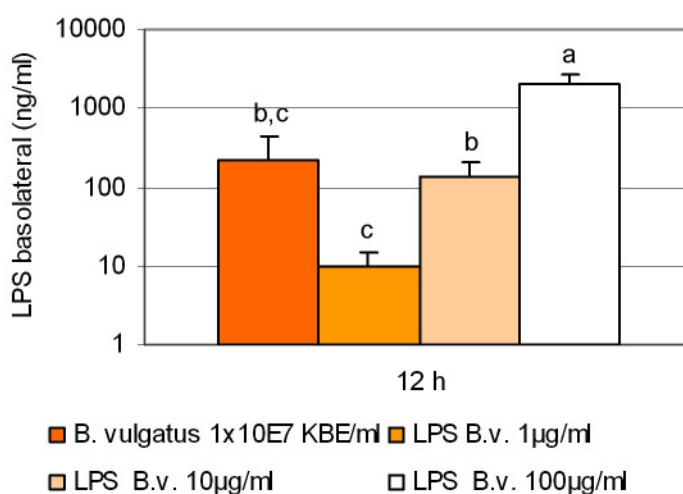


Abbildung 27: Basolaterale LPS Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* bzw. 1, 10, und 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Die zur Beurteilung der immunstimulierenden Eigenschaften gemessenen Zytokine unterschieden sich mit Ausnahme von TNF-α nach 12 h nicht. Beim direkten Vergleich in Tukey's Honest-Significant-Difference Test war die TNF-α-Konzentration im basolateralen Kompartiment nach 12 h Versuchsdauer und Stimulation mit 100 µg/ml *B. vulgatus* Endotoxin im Vergleich zu sämtlichen anderen Versuchsbedingungen (p<0,001) hoch signifikant erhöht (vgl. Tabelle 54, Abbildung 28).

ERGEBNISSE

Tabelle 54: TNF- $\alpha$ -, IL-8-, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* bzw. 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	Zeitpunkt	MW $\pm$ SD (N)	MW $\pm$ SD (N)				p ANOVA/ student's t-test
		Kontrolle	<i>B. vulgatus</i> $1 \times 10^7$ KBE/ml	LPS <i>B. vulgatus</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	LPS <i>B. vulgatus</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	LPS <i>B. vulgatus</i> 100 $\mu\text{g/ml}$	
TNF- $\alpha$ in pg/ml	4 h	11 $\pm$ 9 (24)	9 $\pm$ 6 (12)	11 $\pm$ 7 (12)	-	-	0,551
	12 h	15 $\pm$ 14 (65)	27 $\pm$ 17 (24)	23 $\pm$ 18 (33)	48 $\pm$ 102 (9)	255 $\pm$ 370 (10)	<0.001
IL-8 in ng/ml	4 h	5 $\pm$ 3 (24)	4 $\pm$ 3 (12)	3 $\pm$ 2 (12)	-	-	0,351
	12 h	19 $\pm$ 16 (65)	22 $\pm$ 16 (24)	23 $\pm$ 18 (33)	22 $\pm$ 15 (9)	36 $\pm$ 14 (10)	0,126
IL-6 in pg/ml	24 h	18 $\pm$ 9 (24)	24 $\pm$ 14 (12)	31 $\pm$ 19 (12)	-	-	0,303
IL-10 in pg/ml	24 h	0,06 $\pm$ 0,08 (24)	74 $\pm$ 94 (12)	84 $\pm$ 82 (12)	-	-	0,783
IFN- $\gamma$ in pg/ml	72 h	5 $\pm$ 2 (24)	5 $\pm$ 4 (12)	7 $\pm$ 5 (12)	-	-	0,323
	72 h	4 $\pm$ 5 (24)	4 $\pm$ 3 (12)	3 $\pm$ 2 (8)	-	-	0,703

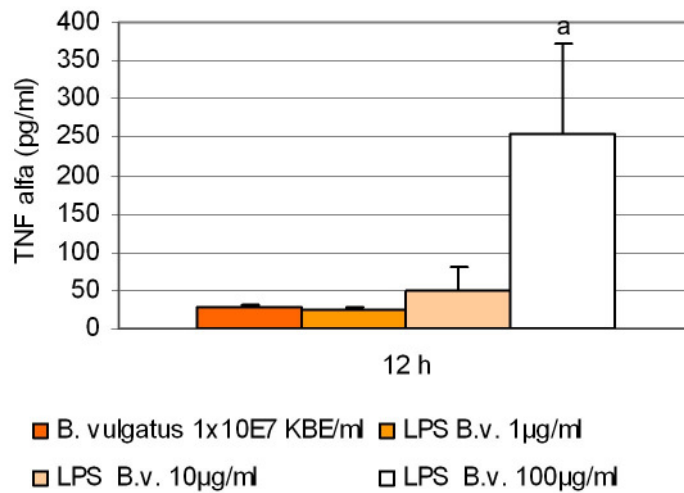


Abbildung 28: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* bzw. 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### 4.4.1.3 Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von *B. vulgatus* MPK und dessen LPS

#### Durchlässigkeit der CaCo-2-Zellmonolayer

Bei der Messung der TEER-Differenzen ergaben sich nach 12 h Unterschiede zwischen den mit Bakterien und den mit LPS stimulierten Versuchsbedingungen. Bei der Permeabilität von Fluorescein-markiertem Dextran waren keine Differenzen messbar (vgl. Tabelle 55).

Tabelle 55: TEER-Differenzen zwischen den TEER-Werten vor und nach 12-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 12-Stunden apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. 1, 10 und 100 µg/ml dessen LPS (Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Anzahl der Versuche (N)).

	TEER-Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>		Permeabilität nach 12 h in %	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
<i>B. vulgatus</i> MPK 1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	17 ± 15 (12)	<b>0.016</b>	0,99 ± 0,83 (12)	0,427
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 1 µg/ml	-84 ± 99 (10)		0,69 ± 0,38 (10)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 10 µg/ml	-81 ± 105 (10)		0,69 ± 0,46 (9)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 100 µg/ml	-12 ± 95 (10)		1,02 ± 0,60 (10)	

Des Weiteren war die Menge des durch die CaCo-2-Zellschicht permeierten, basolateral gemessenen LPS signifikant höher in der höchsten LPS Stimulationskonzentration (100 µg/ml) im Vergleich zu allen anderen Versuchsbedingungen ( $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* (p=0,006), 1 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS (p=0,013), 10 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS (p=0,009)) (vgl. Tabelle 56, Abbildung 29).

Tabelle 56: Basolaterale LPS Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. 1, 10, und 100 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS.

	LPS basolateral nach 12 h in pg/ml	p ANOVA
	MW ± SD (N)	
<i>B. vulgatus</i> MPK 1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	10,33 ± 15,12 (12)	<b>&lt;0,001</b>
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 1µg/ml	0,49 ± 1,33 (8)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 10µg/ml	13,83 ± 33,43 (10)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 100µg/ml	554,75 ± 717,05 (10)	

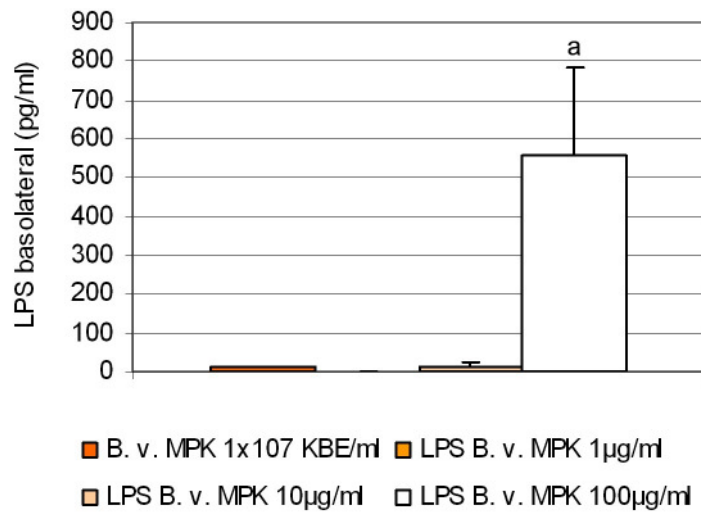


Abbildung 29: Basolaterale LPS Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. 1, 10, und 100 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

### Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Bei der Messung der Zytokine IL-8 und TNF-α im basolateralen Kompartiment war die basolaterale TNF-α-Konzentration bei Stimulation mit 10 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS signifikant verringert gegenüber der basolateralen TNF-α-Konzentration in den mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK versetzten Versuchsansätzen ( $p=0,028$ ) (vgl. Tabelle 57, Abbildung 30).

Tabelle 57: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 4-, 12- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. 1, 10, 100 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	TNF-α nach 12 h in pg/ml		IL-8 nach 12 h in ng/ml	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	15 ± 14 (65)		19 ± 16 (65)	
<i>B. vulgatus</i> MPK $1 \times 10^7$ KBE/ml	28 ± 13 (24)	0,025	19 ± 16 (24)	0,824
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 1µg/ml	18 ± 16 (8)		20 ± 13 (8)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 10µg/ml	11 ± 6 (10)		15 ± 9 (10)	
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 100µg/ml	27 ± 37 (10)		21 ± 16 (10)	

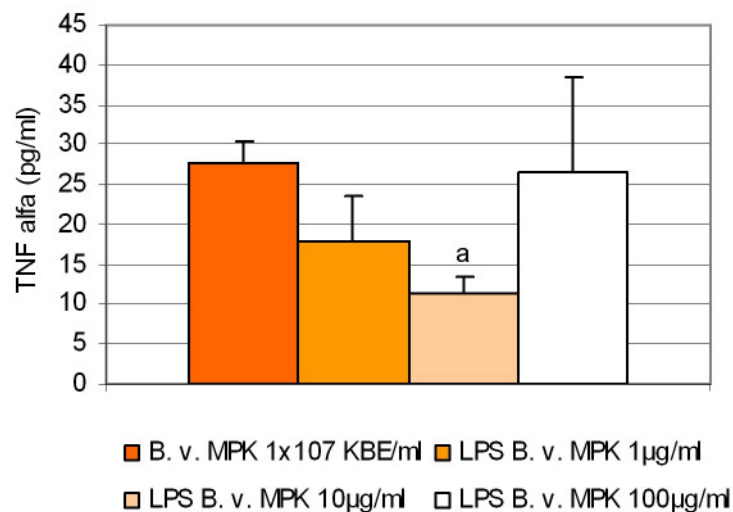


Abbildung 30: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-, 24- und 72-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. 1, 10, 100  $\mu$ g/ml *B. vulgatus* MPK LPS gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.4.1.4 Vergleich der immunstimulierenden Eigenschaften von *E. faecalis* und dessen LTA

##### Durchlässigkeit der CaCo-2 Zellmonolayer

Die TEER-Differenzen der mit Bakterien und den LTA stimulierten Versuchsansätze unterschieden sich nicht voneinander. Dagegen war die Durchlässigkeit der CaCo-2 - Zellschicht für Fluorescein-markiertes Dextran bei den mit Bakterien stimulierten Ansätzen (Tukey's Post hoc Test) im Vergleich zu den mit LTA stimulierten Ansätzen niedriger ( $p < 0,001$ ). Dennoch lagen auch bei den mit LTA stimulierten Versuchsbedingungen die Permeabilität unter 2 % (vgl. Tabelle 58), so dass von einer dichten Zellmonolayer ausgegangen werden konnte.

Tabelle 58: TEER-Differenzen zwischen den TEER-Werten vor und nach 12-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 12-Stunden apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. faecalis* bzw. 1, 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  dessen LTA (Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Anzahl der Versuche (N)).

	TEER-Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>		Permeabilität nach 12 h in %	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
<i>E. faecalis</i> $1 \times 10^7$ KBE/ml	-10 $\pm$ 11 (12)		0,00 $\pm$ 0,00 (12)	
LTA <i>E. faecalis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	59 $\pm$ 146 (9)	0,162	1,69 $\pm$ 0,92 (9)	<0,001
LTA <i>E. faecalis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	-24 $\pm$ 66 (10)		1,54 $\pm$ 1,03 (10)	
LTA <i>E. faecalis</i> 100 $\mu\text{g/ml}$	12 $\pm$ 68 (10)		1,66 $\pm$ 1,14 (9)	

### Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Auf Zytokinebene waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den mit intakten Bakterien stimulierten Versuchsansätzen und den mit LTA stimulierten Versuchsansätzen zu messen. Festzuhalten wäre jedoch, dass v. a. die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  sowohl bei *E. faecalis* als auch bei dessen LTA sehr niedrig sind und im Bereich der unteren Nachweisgrenze des ELISA Tests liegen.

Tabelle 59: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. faecalis* bzw. 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  *E. faecalis* LTA gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodell.

	TNF- $\alpha$ nach 12 h in pg/ml		IL-8 nach 12 h in ng/ml	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	15 $\pm$ 14 (65)		19 $\pm$ 16 (65)	
<i>E. faecalis</i> $1 \times 10^7$ KBE/ml	10 $\pm$ 9 (24)	0,097	18 $\pm$ 17 (24)	0,280
LTA <i>E. faecalis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\pm$ 7 (9)		14 $\pm$ 11 (9)	
LTA <i>E. faecalis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\pm$ 8 (10)		12 $\pm$ 10 (10)	
LTA <i>E. faecalis</i> 100 $\mu\text{g/ml}$	31 $\pm$ 37 (10)		24 - 15 (10)	

### Verleich der durch LTA von *E. faecalis* induzierten Zytokinausschüttung bei direkter Stimulation von PBMC und einer Stimulation im Kokulturmodell

Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen aufgrund einer direkter Stimulation von PBMCs mit 2 pg/ml LTA von *E. faecalis* war signifikant geringer als die durch Stimulation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  *E. faecalis* LTA im Kokulturmodell induzierte TNF- $\alpha$ -Konzentration (p=0,014). Bei IL-8 waren keine Unterschiede zwischen den direkt stimulierten PBMCs und einer Stimulation im



Kokulturmodell zu messen. Allgemein war die durch LTA von *E. faecalis* induzierte Zytokinausschüttung im Bereich der Basisproduktion der PBMCs (vgl. Tabelle 60). So unterscheiden sich sämtliche Versuchsbedingungen nicht von der Zytokinproduktion unstimulierter PBMCs (TNF- $\alpha$  =  $13 \pm 10$  pg/ml; IL-8 =  $19 \pm 12$  ng/ml) (vgl. Tabelle 60).

Tabelle 60: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12 h Inkubation bei direkter Stimulation von PBMC mit 2, 20,200 und 2000 pg/ml bzw.apikaler Stimulation mit 1, 10 und 100  $\mu$ g/ml im Kokulturmodell

		TNF- $\alpha$ nach 12 h in pg/ml		IL-8 nach 12 h in ng/ml	
		MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
Direkt- stimulation	Kontrolle	13 $\pm$ 10 (6)	0,027	19 $\pm$ 12 (6)	0,137
	2pg/ml LTA	5 $\pm$ 2 (4)		6 $\pm$ 1 (4)	
	20pg/ml LTA	7 $\pm$ 3 (4)		8 $\pm$ 4 (4)	
	200pg/ml LTA	8 $\pm$ 2 (4)		1 $\pm$ 3(4)	
	2000pg/ml LTA	5 $\pm$ 3 (6)		9 $\pm$ 2 (6)	
Kokultur- modell	Kontrolle	8 $\pm$ 5(9)		14 $\pm$ 11 (9)	
	1 $\mu$ g/ml LTA	10 $\pm$ 7 (10)		12 $\pm$ 10 (10)	
	10 $\mu$ g/ml LTA	10 $\pm$ 8 (10)		24 $\pm$ 15 (10)	
	100 $\mu$ g/ml LTA	31 $\pm$ 37 (17)		17 $\pm$ 17 (17)	

#### 4.4.2 Inhibierung der durch *E. coli* K12 LPS verursachten Zytokinausschüttung durch LPS bindende Peptide

In weiteren Versuchen sollte nun bekräftigt werden, dass der immunstimulierende Effekt von *E. coli* K12 auf dessen LPS zurückzuführen ist. Dabei wurde das apikal zur Stimulation eingesetzte LPS durch einen ebenfalls apikal zugesetzten Hemmstoff gebunden. Dadurch sollte die vermehrte Zytokinausschüttung ausbleiben.

##### 4.4.2.1 Inhibierung der Zytokinausschüttung mittels Polymyxin

###### Durchlässigkeit der CaCo-2 Zellmonolayer

Wie Tabelle 61 zu entnehmen ist, unterschieden sich die drei Versuchsbedingungen hinsichtlich den TEER-Differenzen sowie der Permeabilität nicht.

Tabelle 61: TEER-Differenzen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) zwischen den TEER-Werten vor und nach 12-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 12 h apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, 10 µg/ml Polymyxin und der Kombination aus 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml Polymyxin.

	TEER-Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>		Permeabilität nach 12 h in %	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	16 ± 112 (18)		0,72 ± 0,43 (16)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	-28 ± 139 (19)		0,87 ± 0,52 (18)	
Polymyxin	-29 ± 56 (5)	0,819	1,28 ± 0,80 (5)	0,296
Polymyxin + <i>E. coli</i> K12 LPS	9 ± 75 (5)		1,21 ± 0,69 (5)	

Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Polymyxin führte zu einer hoch signifikanten Verringerung der TNF-α- und IL-8-Konzentrationen im basolateralen Kompartiment.

Tabelle 62: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, 10 µg/ml Polymyxin sowie der Kombination aus 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml Polymyxin.

	TNF-α nach 12 h in pg/ml		IL-8 nach 12h in ng/ml	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	8 ± 5 (17)		17 ± 17 (17)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	6109 ± 2251 (19)		223 ± 143 (19)	
Polymyxin	4 ± 3 (5)	<0,001	10 ± 10 (5)	<0,001
Polymyxin + <i>E. coli</i> K12 LPS	4 ± 3 (5)		14 ± 9 (5)	

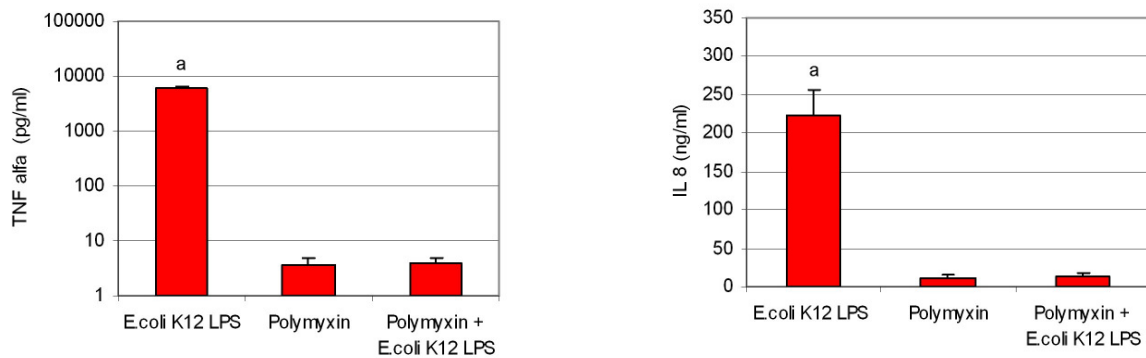


Abbildung 31: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12 h Inkubation und apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, 10 µg/ml Polymyxin und der Kombination aus 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml Polymyxin gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodells. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.4.2.2 Inhibierung der Zytokinausschüttung mittels Colistin

##### Durchlässigkeit der CaCo-2 Zellmonolayer

Bei den gemessenen TEER-Differenzen sowie der Permeabilität des Fluorescein-markierten Dextrans durch die CaCo-2 Zellmonolayer liessen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulantien messen.

Tabelle 63: TEER-Differenzen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) zwischen den TEER-Werten vor und nach 12-stündiger Stimulation sowie der prozentualen Permeabilität nach 12 h apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, 10 µg/ml Colistin und der Kombination aus 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml Colistin.

	TEER-Differenz in Ohm/cm <sup>2</sup>		Permeabilität nach 12 h in %	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	16 ± 112 (18)		0,72 ± 0,43 (16)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	-28 ± 139 (19)		0,87 ± 0,52 (18)	
Colistin	63 ± 105 (3)	0,465	1,07 ± 0,28 (3)	0,534
Colistin + <i>E. coli</i> K12 LPS	43 ± 166 (3)		1,17 ± 0,21 (3)	

##### Zytokinmuster im basolateralen Kompartiment

Auch Colistin war in der Lage, die durch *E. coli* K12 LPS verursachte Zytokinausschüttung hoch signifikant zu verringern bzw. völlig abzuschalten.

Tabelle 64: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, 10 µg/ml Polymyxin sowie der Kombination aus 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml Colistin.

	TNF-α in pg/ml		IL-8 in ng/ml	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	8 ± 5 (17)		17 ± 17 (17)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	6109 ± 2251 (19)		223 ± 143 (19)	
Colistin	6 ± 9 (3)	<0.001	12 ± 9 (3)	<0.001
Colistin + <i>E. coli</i> K12 LPS	5 ± 5 (3)		19 ± 11 (3)	

## ERGEBNISSE

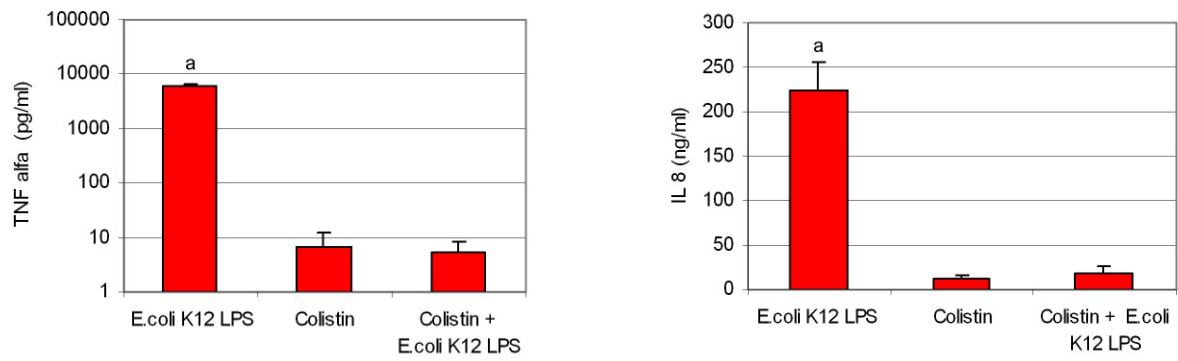


Abbildung 32: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12 h Inkubation und apikaler Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS, 10  $\mu\text{g/ml}$  Polymyxin und der Kombination aus 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und 10  $\mu\text{g/ml}$  Colistin gemessen mittels ELISA im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodells. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

## 4.5 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Stimulationsfähigkeit verschiedener Endotoxine von der Struktur des Lipid A und der mittleren Molmasse

Da das Lipid A das „endotoxic principle“ (Rietschel et al. 1987; Seydel et al. 2003; Zähringer et al. 1994) des LPS darstellt, wurden die Endotoxine der verschiedenen verwendeten Bakterien zunächst in jeweils gleichen Konzentrationen im Kokulturmodell sowie direkt zur Stimulation von PBMC eingesetzt, des Weiteren wurden sie in einem vergleichenden SDS-PAGE Gel aufgetragen und anschließend der Anteil des Lipid A am jeweiligen Endotoxin mittels HPLC ermittelt.

### 4.5.1 Bioaktivität verschiedener Endotoxine

Die Stimulation mit Endotoxinen verschiedener Bakterien in jeweils gleichen Konzentrationen führt zu unterschiedlich starker Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-8. So führen die *Bacteroides* zu keiner bzw. *B. vulgatus* (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu einer vergleichsweise geringen TNF- $\alpha$  und IL-8-Ausschüttung, während die Stimulation mit *E. coli* K12 ( $p < 0,001$ ) bzw. *S. Typhimurium* ( $p < 0,001$ ) zu hoch signifikant höheren Zytokinkonzentrationen im Kokulturmodell führt. Einzig die durch 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *B. vulgatus* LPS induzierte Zytokinproduktion führt zu einer signifikant niedrigeren TNF- $\alpha$ -Konzentration als bei Stimulation mit *E. coli* K12 LPS oder *S. Typhimurium* LPS ( $p < 0,001$ ) und einer höheren Produktion von TNF- $\alpha$  als bei Stimulation mit *B. vulgatus* MPK LPS und den niedrigeren LPS-Konzentrationen von *B. vulgatus*. Die durch Stimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *B. vulgatus* LPS induzierte IL-8-Ausschüttung ist nur gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) erhöht und gegenüber *E. coli* K12 und *S. Typhimurium* Endotoxin ( $p < 0,001$ ) deutlich geringer.

ERGEBNISSE

Tabelle 65: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwert und Standardabweichung) nach 12 h Inkubation bei apikaler Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Endotoxine von *B. vulgatus* MPK, *B. vulgatus*, *S. Typhimurium* und *E. coli* K12 im Kokulturmodell.

	TNF- $\alpha$ nach 12 h in pg/ml		P ANOVA	IL-8 nach 12 h in ng/ml		P ANOVA
	MW $\pm$ SD (N)			MW $\pm$ SD (N)		
Kontrolle	8 $\pm$ 5 (17)			17 $\pm$ 17 (17)		
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 1 $\mu$ g/ml	18 $\pm$ 16 (8)			20 $\pm$ 13 (8)		
LPS <i>B. vulgatus</i> 1 $\mu$ g/ml	23 $\pm$ 18 (33)			14 $\pm$ 6 (9)		
LPS <i>S. Typhimurium</i> 1 $\mu$ g/ml	2788 $\pm$ 742 (5)			278 $\pm$ 116 (5)		
LPS <i>E. coli</i> K12 1 $\mu$ g/ml	6237 $\pm$ 4112 (43)			223 $\pm$ 143 (19)		
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 10 $\mu$ g/ml	11 $\pm$ 7 (10)		<0,001	15 $\pm$ 9 (10)		<0,001
LPS <i>B. vulgatus</i> 10 $\mu$ g/ml	48 $\pm$ 102 (9)			22 $\pm$ 15 (9)		
<i>S. Typhimurium</i> 10 $\mu$ g/ml	6406 $\pm$ 2207 (4)			351 $\pm$ 119 (4)		
LPS <i>B. vulgatus</i> MPK 100 $\mu$ g/ml	27 $\pm$ 37 (10)			21 $\pm$ 16 (10)		
LPS <i>B. vulgatus</i> 100 $\mu$ g/ml	255 $\pm$ 370 (10)			36 $\pm$ 14 (10)		
<i>S. Typhimurium</i> 100 $\mu$ g/ml	6218 $\pm$ 3405 (4)			215 $\pm$ 132 (4)		

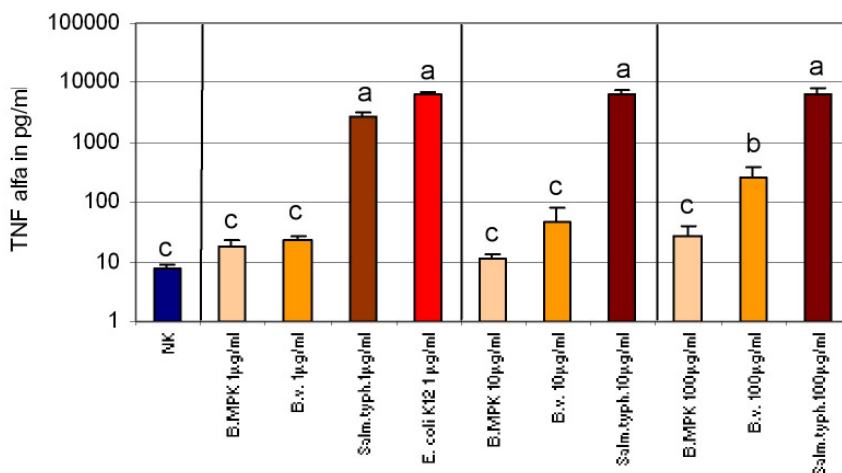


Abbildung 33: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwert und Standardfehler) nach 12 h Inkubation bei apikaler Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Endotoxine von *B. vulgatus* MPK, *B. vulgatus*, *S. Typhimurium* und *E. coli* K12 im Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

Auch bei direkt mit Endotoxin stimulierten PBMC waren deutliche Unterschiede in der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-8 zu messen. So waren die durch *E. coli* K12 induzierten Zytokinkonzentrationen bis zu 640 bzw. 13 fache höher als die durch *B. vulgatus* oder *B. vulgatus* MPK induzierten TNF- $\alpha$ - bzw. IL-8-Konzentrationen.

Tabelle 66: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwert und Standardabweichung) nach 12 h Inkubation bei direkter Stimulation von  $2 \times 10^6$  PBMC/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen der Endotoxine von *E. coli* K12, *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK.

LPS-konzentration	<i>E. coli</i> K12		<i>B. vulgatus</i>		<i>B. vulgatus</i> MPK	
	TNF- $\alpha$ in pg/ml MW $\pm$ SD (N)	IL-8 in ng/ml MW $\pm$ SD (N)	TNF- $\alpha$ in pg/ml MW $\pm$ SD (N)	IL-8 in ng/ml MW $\pm$ SD (N)	TNF- $\alpha$ in pg/ml MW $\pm$ SD (N)	IL-8 in ng/ml MW $\pm$ SD (N)
2 pg/ml	242 $\pm$ 273 (8)	56 $\pm$ 32 (8)	4 $\pm$ 3 (8)	10 $\pm$ 4 (8)	9 $\pm$ 10 (8)	10 $\pm$ 4 (8)
20 pg/ml	2392 $\pm$ 752 (8)	131 $\pm$ 61 (8)	9 $\pm$ 14 (8)	11 $\pm$ 7 (8)	7 $\pm$ 3 (8)	7 $\pm$ 2 (8)
200 pg/ml	4425 $\pm$ 1632 (14)	191 $\pm$ 95 (14)	7 $\pm$ 4 (8)	13 $\pm$ 6 (8)	10 $\pm$ 8 (8)	9 $\pm$ 2 (8)
2000 pg/ml	3546 $\pm$ 1441 (14)	157 $\pm$ 97 (14)	91 $\pm$ 92 (8)	40 $\pm$ 32 (8)	9 $\pm$ 4 (8)	14 $\pm$ 8 (8)

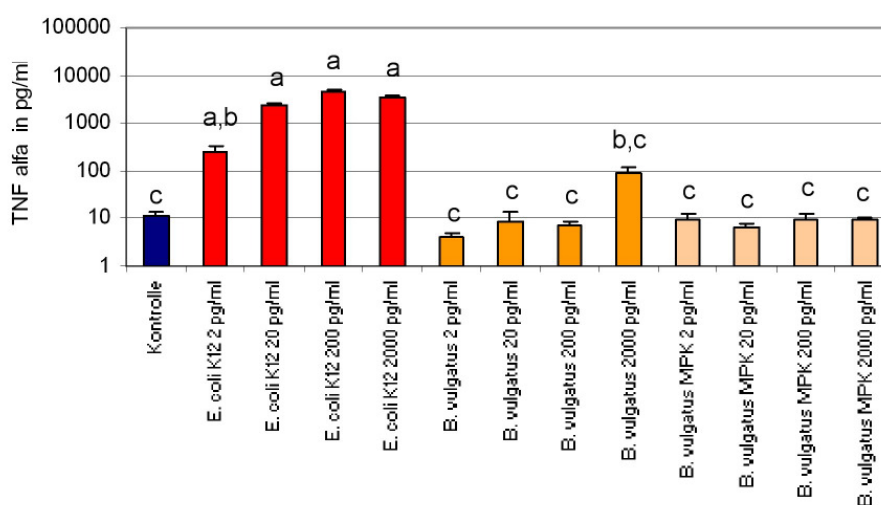


Abbildung 34: TNF- $\alpha$ - Konzentrationen (Mittelwert und Standardfehler) nach 12 h Inkubation bei direkter Stimulation von  $2 \times 10^6$  PBMC/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen der Endotoxine von *E. coli* K12, *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.5.2 SDS-PAGE

Die Endotoxine von *S. Typhimurium*, *E. coli* Nissle, *E. coli* K12, *E. coli* O111 B4, *B. vulgatus*, sowie *B. vulgatus* MPK wurden in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 35). Die *Bacteroides* spp., genauso wie der *E. coli* O111 B4 sowie *S. Typhimurium* waren dem „smooth“-Typ zuzuordnen, während es sich bei *E. coli* K12 und *E. coli* Nissle um „semi-rough“- bzw. „rough“-Typen handelte.

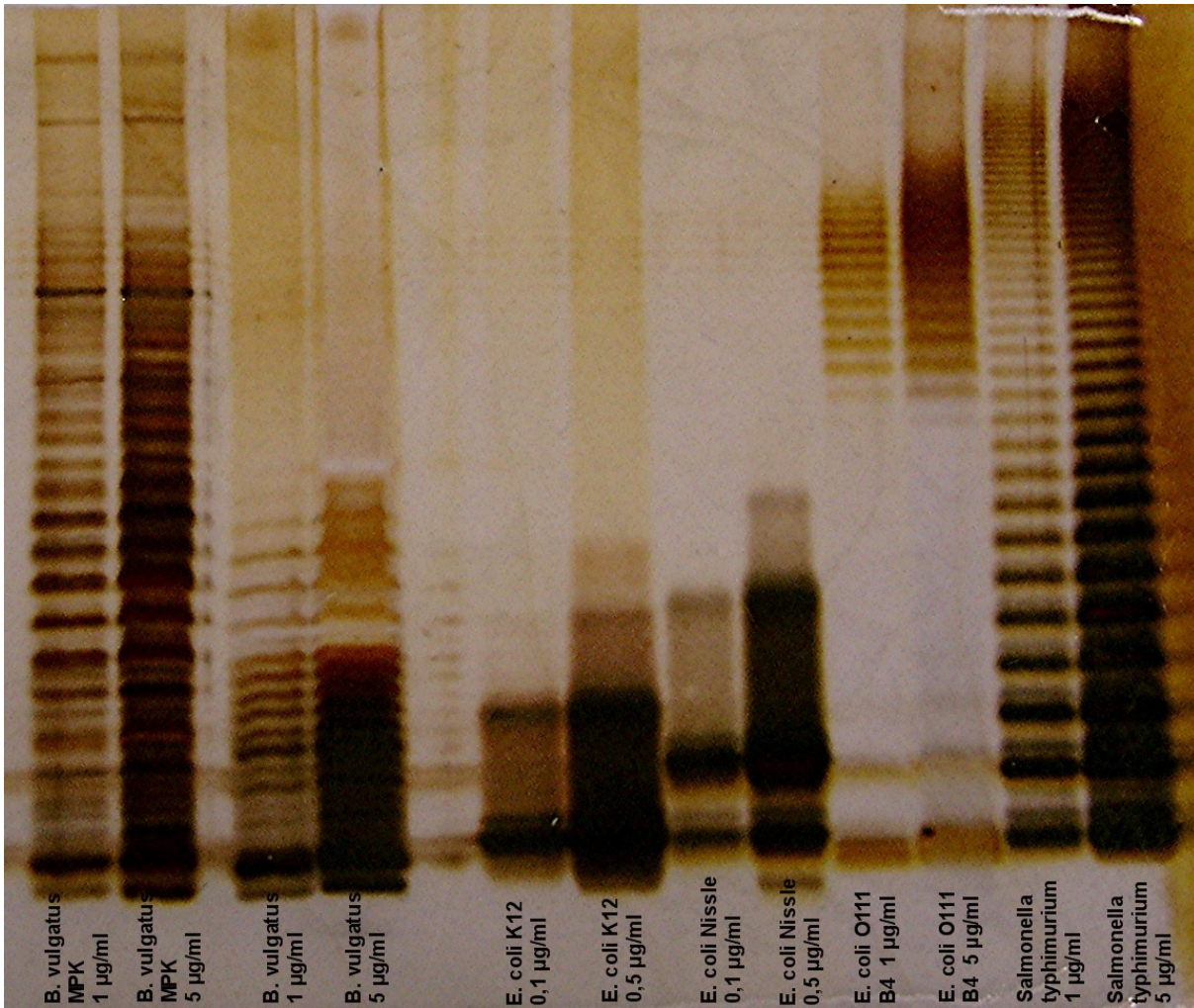


Abbildung 35: Endotoxine unterschiedlicher Bakterien (*S. Typhimurium*, *E. coli* 0111 B4 ; *E. coli* Nissle; *E. coli* K12; *B. vulgatus*; *B. vulgatus* MPK) in Konzentrationen zwischen 0,1 µg/ml und 5 µg/ml im SDS-Page Gel, angefärbt mittels Silbernitratfärbung.

#### 4.5.3 Die Quantifizierung des Lipid A-Anteils verschiedener Endotoxine

Aufgrund des unterschiedlich hohen Anteils der hochmolekularen Polysaccharid-Ketten am einzelnen Endotoxin war ein jeweils höherer, bzw. niedrigerer prozentualen Anteil an Lipid A im LPS zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die für jedes Lipid A charakteristischen 3-Hydroxy-Fettsäuren (3-OH-C14 für das Lipid A von *E. coli* K12, *E. coli* Nissle und *S. Typhimurium*; 3-OH-C15 für das Lipid A von *B. vulgatus* MPK und *B. vulgatus*) mittels HPLC quantifiziert (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37).



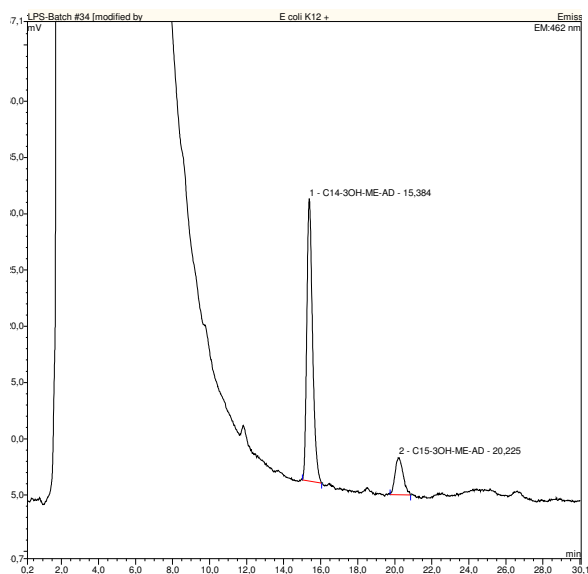


Abbildung 36: Retentionszeiten 3-OH-C15-ME-AD (20,2 min.) und des internen Standards 3-OH-C14-ME-AD (15,4 min.). ME-SD: Methyl ester-Anthroylderivat.

Die *Bacteroides*-LPS wurden bei zwei verschiedenen gain-Einstellungen der HPLC-Anlage gemessen, um eine Quantifizierung der Lipid A Anteile dieser Endotoxine auch anhand der 3-Hydroxy-iso-Heptadecansäure zu ermöglichen (gain: 4,0).

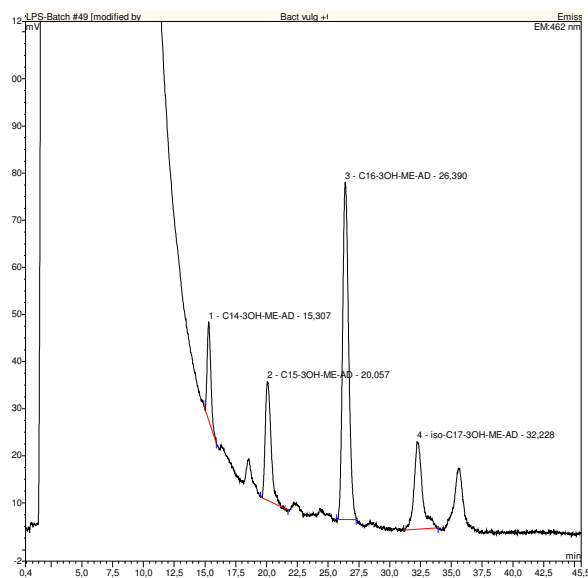


Abbildung 37: Retentionszeiten 3-OH-C15-ME-AD (20,1 min.); 3-OH-C16-ME-AD (26,4 min.); 3-OH-iso-C17 (32,2 min.); und des internen Standards 3-OH-C14-ME-AD (15,3 min.). ME-SD: Methyl ester-Anthroylderivat

Ausgehend von dem Gehalt an 3-OH-C14 betrug der errechnete Anteil des Lipid A am Endotoxin von *E. coli* K12 2,7 % und von *E. coli* Nissle 4,8 %. Der Lipid A Anteil war damit deutlich höher als der von *B. vulgatus* MPK, *B. vulgatus* und *S. Typhimurium*. Bei den Endotoxinen der beiden *Bacteroides* spp. unterschieden sich die mit Hilfe der 3-OH-C15, 3-OH-C16 bzw. 3-OH-iso-C17 berechneten Lipid A Gehalte so dass keine eindeutige Aussage bezüglich des Lipid A-Anteils am gesamten Endotoxinmolekül möglich war (siehe Tabelle 67).

Tabelle 67: Prozentualer Lipid-A-Gehalt verschiedener Endotoxine (Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD)) sowie die für die Berechnung verwendeten charakteristische 3-Hydroxy-Fettsäuren (3-OH-FS) des entsprechenden Lipid A.

Endotoxin	Gain	Quantifizierte 3-OH-FS	Lipid A-Anteil (%) MW ± SD (N)
<i>E. coli</i> Nissle	1,0	3-OH-C14	4,8 ± 1,02 (2)
<i>E. coli</i> K12	1,0	3-OH-C14	2,7 ± 1,58 (2)
<i>B. vulgatus</i> MPK	1,0	3-OH-C15	0,4 ± 0,12 (2)
	1,0	3-OH-C16	1,7 ± 0,13 (2)
	4,0	3-OH-C15	0,5 ± 0,09 (2)
	4,0	3-OH-C16	1,8 ± 0,09 (2)
	4,0	3-OH-iso-C17	2,6 ± 0,05 (2)
<i>B. vulgatus</i>	1,0	3-OH-C15	0,9 ± 0,21 (2)
	1,0	3-OH-C16	1,5 ± 0,55 (2)
	4,0	3-OH-C15	0,9 ± 0,44 (2)
	4,0	3-OH-C16	1,5 ± 0,45 (2)
	4,0	3-OH-iso-C17	1,0 ± 0,44 (2)
<i>S. Typhimurium</i>	1,0	3-OH-C14	0,013 ± 0,00 (2)

## 4.6 Weg der Aktivierung im Kokulturmodell - vermitteln Enterozyten die Aktivierung von kokultivierten Lymphozyten?

### 4.6.1 Vergleich der im Kokulturmodell durch apikale Stimulation induzierten Zytokinantwort mit der, durch direkte Stimulation von Lymphozyten induzierten Zytokinausschüttung.

Aufgrund der in den vorangegangenen Untersuchungen ermittelten Daten der basolateralen LPS Konzentrationen (Übersicht in Tabelle 68) wurden vergleichende Versuche im Kokulturmodell und bei direkter Stimulation von Lymphozyten durchgeführt. Dabei sollte ermittelt werden, ob die basolaterale Zytokinkonzentration im Kokulturmodell auf eine direkte Stimulation der Lymphozyten durch das permeierte Endotoxin zurückzuführen war.

Tabelle 68: Basolateralen LPS Konzentrationen (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) nach 12 h apikaler Stimulation mit Bakterien bzw. unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden Endotoxins.

		LPS basolateral (pg/ml) MW ± SD (N)
<i>E. coli</i> K12	1 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml	155 ± 134 (6)
	1 µg/ml LPS	118 ± 134 (25)
<i>B. vulgatus</i>	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	223 ± 616 (8)
	1 µg/ml LPS	10 ± 20 (18)
	10 µg/ml LPS	140 ± 198 (9)
	100 µg/ml LPS	2038 ± 2099 (10)
<i>B. vulgatus</i> MPK	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	10 ± 15 (12)
	1 µg/ml LPS	0 ± 1 (8)
	10 µg/ml LPS	14 ± 33 (10)
	100 µg/ml LPS	555 ± 717 (10)

Zur Gewährleistung, der Vergleichbarkeit der Basisstimulation der PBMC in den Versuchen, wurde ein student's t-test durchgeführt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Messung der TNF-α- und IL-8-Konzentrationen in den jeweiligen Negativkontrollen nach 12-stündiger Inkubation im Kokulturmodell und der Direktstimulation. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Versuche vergleichbar waren.

**4.6.1.1 Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von *E. coli* K12**

Wie der Tabelle 68 zu entnehmen ist, lagen die basolateralen Endotoxinkonzentrationen bei Stimulation mit *E. coli* K12 bei 155 pg/ml nach 12 h, sowie bei ca. 118 pg/ml bei apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS. Beim Vergleich der TNF-α-Konzentrationen der direkt stimulierten PBMCs und im Kokulturmodell konnten mittels Post hoc Test nach Tukey hoch signifikant geringere TNF-α-Konzentrationen bei 2 bzw. 20 pg/ml *E. coli* K12 LPS direkt stimulierten PBMCs, als bei Stimulation mit 1x10<sup>7</sup> KBE/ml *E. coli* K12 (p(2 pg/ml)<0,001; p(20 pg/ml)=0,003) bzw. 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS (p(2 pg/ml)<0,001; p(20 pg/ml)=0,005) im Kokulturmodell. In etwa gleich waren dagegen die durch die verschiedenen Stimulationen induzierten TNF-α-Konzentrationen in den mit 200 pg/ml bzw. 2000 pg/ml *E. coli* K12 LPS direkt stimulierten PBMC und den Kokulturmodellversuchen. Betrachtet man die IL-8-Konzentrationen so waren im Tukey's Post hoc Test (Tabelle 70) hoch signifikant höherer Konzentrationen im Kokulturmodell mit *E. coli* K12 ind 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS Stimulation als bei den direkt mit 2 pg/ml (p(*E. coli*)<0,001; p(LPS)<0,001) bzw. 2000 pg/ml (p(*E. coli*)=0,001; p(LPS)=0,044) *E. coli* K12 LPS stimulierten Proben. Ausserdem waren auch die IL-8-Konzentrationen bei Stimulation mit 20 pg/ml *E. coli* K12 LPS signifikante geringer als bei Stimulation mit Bakterien im Kokulturmodell (vgl. Tabelle 69 und 70, Abbildung 38).

Tabelle 69: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. dessen Endotoxin LPS im Kokulturmodell bzw. bei direkter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Endotoxins von *E. coli* K12. Die Messung erfolgte mittels ELISA.

		TNF-α (pg/ml)		IL-8 (ng/ml)	
		MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
<i>E. coli</i> K12 im Kokulturmodell	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	6632 ± 4546 (24)	<0,001	468 ± 321 (24)	<0,001
<i>E. coli</i> K12 LPS im Kokulturmodell	1µg/ml	6008 ± 4175 (40)		318 ± 265 (40)	
<i>E. coli</i> K12 LPS bei Direktstimulation	2 pg/ml	242 ± 273 (8)		56 ± 32 (8)	
	20 pg/ml	2392 ± 752 (8)		131 ± 61 (8)	
	200 pg/ml	4425 ± 1632 (14)		191 ± 95 (14)	
	2000 pg/ml	3546 ± 1441 (14)		157 ± 97 (14)	

Tabelle 70: Signifikanzniveau (**p**) der TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen beim direkten Vergleich der Versuchsbedingungen der Direktstimulation mit dem Kokulturmodell bei Stimulation mit *E. coli* K12 LPS in Tukey's Honest Significance Test

	p TNF- $\alpha$		p IL-8	
	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml <i>E. coli</i> K12	1 $\mu$ g/ml <i>E. coli</i> K12 LPS	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml <i>E. coli</i> K12	1 $\mu$ g/ml <i>E. coli</i> K12 LPS
Kokulturmodell				
Direktstimulation				
2 pg/ml	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
20 pg/ml	0,003	0,005	0,012	0,250
200 pg/ml	0,670	0,860	0,065	0,789
2000 pg/ml	0,078	0,138	0,001	0,044

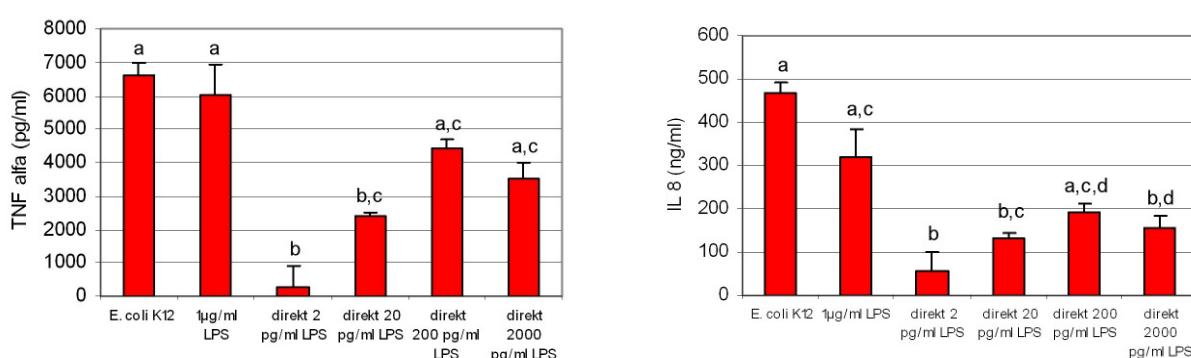


Abbildung 38: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. dessen LPS im Kokulturmodell bzw. nach direkter Stimulation. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.6.1.2 Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von *B. vulgatus*

Von den vorangegangenen Messungen der basolateralen LPS Konzentrationen war bekannt, dass diese sich im Kokulturmodell bei Stimulation mit Bakterien bei ca. 200 pg/ml befinden. Bei Stimulation mit *B. vulgatus* LPS konnten je nach apikal zugesetzter Konzentration zwischen 10 und 2000 pg/ml basolateral gemessen werden (vgl. Tabelle 68). In den vergleichenden Untersuchungen der im Kokulturmodell basolateral gemessenen Zytokinkonzentrationen an TNF- $\alpha$  bei 12-stündiger Inkubation mit  $1 \times 10^7$  KBE *B. vulgatus* und den direkt mit *B. vulgatus* LPS stimulierten PBMCs, so hatte eine Stimulation im

Kokulturmodell mit Bakterien im Vergleich zu einer direkten Stimulation mit 2 pg/ml ( $p=0,007$ ) bzw. 20 pg/ml ( $p=0,031$ ) des Bakterien LPS höhere Zytokinausschüttungen zur Folge. Eine Stimulation mit 1 µg/ml LPS im Kokulturmodell führte im Vergleich zur Direktstimulation mit mit 2 pg/ml ( $p=0,022$ ) ebenfalls zu höheren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen. Dagegen waren keine Unterschiede zwischen den mit 10 µg/ml LPS im Kokulturmodell und sämtlichen direkt stimulierten Versuchsbedingungen messbar. Die mit 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS im Kokulturmodell stimulierten Ansätze führten zu hoch signifikant höheren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen als die direkt mit 2, 20 und 200 pg/ml ( $p<0,001$ ) direkt stimulierten Versuchsansätze (vgl. Tabelle 71 und Tabelle 72, Abbildung 39).

Bei IL-8 waren keinerlei Unterschiede in der Zytokinausschüttung zwischen sämtlichen Stimulationsbedingungen der Direktstimulation und des Kokulturmodells zu messen.

Tabelle 71: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit *B. vulgatus* bzw. dessen Endotoxin LPS im Kokulturmodell bzw. bei direkter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Endotoxins von *B. vulgatus*. Die Messung erfolgte mittels ELISA.

		TNF- $\alpha$ (pg/ml)		IL-8 (ng/ml)	
		MW $\pm$ SD (N)	p ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	p ANOVA
<i>B. vulgatus</i> im Kokulturmodell	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	27 $\pm$ 17 (24)	<b>&lt;0,001</b>	22 $\pm$ 16 (24)	<b>0,030</b>
	1 µg/ml	26 $\pm$ 19 (27)		22 $\pm$ 16 (27)	
<i>B. vulgatus</i> LPS im Kokulturmodell	10 µg/ml	48 $\pm$ 102 (9)		22 $\pm$ 15 (9)	
	100 µg/ml	255 $\pm$ 370 (10)		36 $\pm$ 14 (10)	
<i>B. vulgatus</i> LPS bei Direktstimulation	2pg/ml	4 $\pm$ 3 (8)		10 $\pm$ 4 (8)	
	20pg/ml	9 $\pm$ 14 (8)		11 $\pm$ 7 (8)	
	200pg/ml	7 $\pm$ 4 (8)		13 $\pm$ 6 (8)	
	2000pg/ml	91 $\pm$ 92 (8)		40 $\pm$ 32 (8)	

Tabelle 72: Signifikanzniveau (p) der TNF-a- und IL-8-Konzentrationen beim direkten Vergleich der Versuchsbedingungen der Direktstimulation mit dem Kokulturmodell bei Stimulation mit *B. vulgatus* LPS in Tukey's Honest Significance Test.

Kokulturmodell	p TNF-α				p IL-8			
	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS	100 µg/ml LPS	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS	100 µg/ml LPS
Direktstimulation								
2 pg/ml	0,007	0,021	0,169	<0,001	0,905	0,981	0,779	0,086
20 pg/ml	0,031	0,083	0,367	<0,001	0,814	0,944	0,673	0,054
200 pg/ml	0,188	0,376	0,758	<0,001	0,998	1,000	0,973	0,286
2000 pg/ml	0,657	0,372	0,471	0,404	0,865	0,653	0,997	0,999

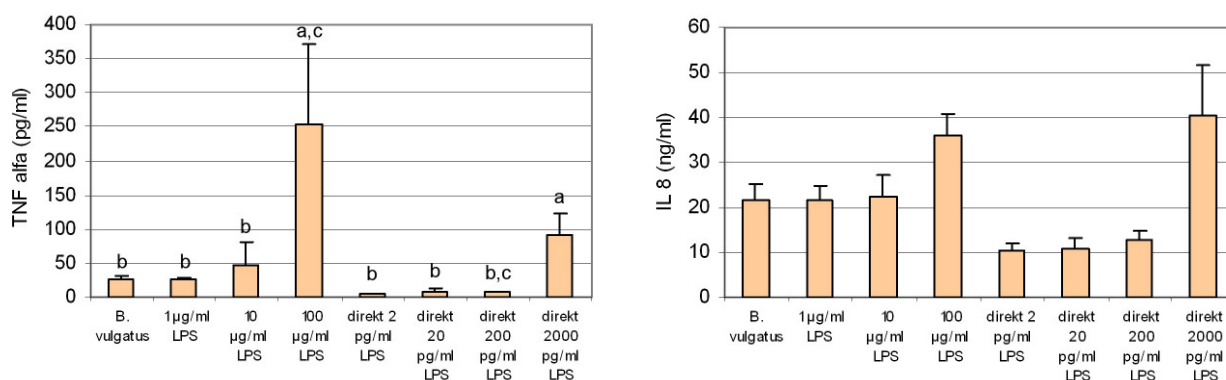


Abbildung 39: TNF-α- und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit 1 x 10<sup>7</sup> KBE/ml *B. vulgatus* bzw. dessen LPS im Kokulturmodell bzw. nach direkter Stimulation. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.6.1.3 Vergleich des Kokulturmodells mit einer direkten Stimulation anhand des Endotoxins von *B. vulgatus* MPK

Bei den Messungen der basolateralen LPS Konzentrationen im Kokulturmodell ergaben sich im Mittel ca. 10 pg/ml LPS nach einer Stimulation mit 1x10<sup>7</sup> KBE Bakterien und Konzentrationen zwischen 0 und 550 pg/ml LPS nach Stimulation mit 1 bis 100 µg/ml apikal LPS (vgl. Tabelle 68). Auch für *B. vulgatus* MPK wurde der Vergleich der Zytokinkonzentrationen bei Stimulation im Kokulturmodell und bei direkter Stimulation der PBMCs mit verschiedenen LPS Konzentrationen durchgeführt. In Bezug auf die durch die Stimulation induzierte basolaterale IL-8-Konzentration war kein Unterschied zwischen direkt stimulierten Lymphozyten und dem Kokulturmodell messbar. Die durch die direkte

Stimulation mit sämtlichen Konzentrationen an *B. vulgatus* MPK LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen waren hoch signifikant bzw. signifikant niedriger, als die mit Bakterien stimulierten Kokulturmodellansätze (vgl. Tabelle 73, Abbildung 40) ( $p(2\text{pg/ml})=0,003$ ;  $p(20\text{pg/ml})=0,001$ ;  $p(200\text{pg/ml})=0,024$ ;  $p(2000\text{pg/ml})=0,042$ ).

Tabelle 73: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit *B. vulgatus* MPK bzw. dessen Endotoxin LPS im Kokulturmodell bzw. bei direkter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Endotoxins von *B. vulgatus* MPK. Die Messung erfolgte mittels ELISA.

		TNF- $\alpha$ (pg/ml)		IL-8 (ng/ml)	
		MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
<i>B. vulgatus</i> MPK LPS im Kokulturmodell	<i>B. vulgatus</i> MPK im Kokulturmodell	1x10 <sup>7</sup> KBE/ml	28 $\pm$ 13 (24)	19 $\pm$ 16 (24)	
	1 $\mu\text{g/ml}$	18 $\pm$ 16 (8)	<0,001	20 $\pm$ 13 (8)	0,089
	10 $\mu\text{g/ml}$	11 $\pm$ 6 (10)		15 $\pm$ 9 (10)	
100 $\mu\text{g/ml}$	27 $\pm$ 37 (10)	21 $\pm$ 16 (10)			
<i>B. vulgatus</i> MPK LPS bei Direktstimulation	2 pg/ml	9 $\pm$ 10 (8)		10 $\pm$ 4 (8)	
	20 pg/ml	7 $\pm$ 3 (8)		7 $\pm$ 2 (8)	
	200 pg/ml	10 $\pm$ 8 (8)		9 $\pm$ 2 (8)	
	2000 pg/ml	9 $\pm$ 4 (8)		14 $\pm$ 8 (8)	

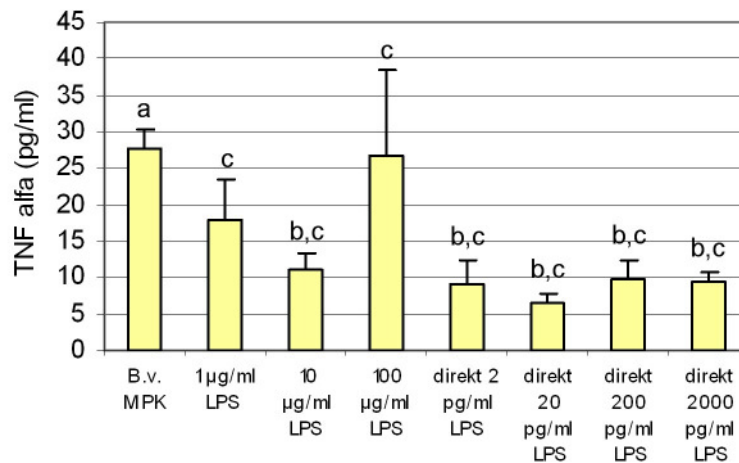


Abbildung 40: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* MPK bzw. dessen LPS im Kokulturmodell bzw. nach direkter Stimulation. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.



#### 4.6.2 Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS durch basolaterale Zugabe von LPS bindenden Peptiden

Vor allem bei *E. coli* K12 hatte die direkte Stimulation mit der entsprechenden Menge LPS, wie sie auch im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodells gemessen wurde, eine vergleichbare Zytokinproduktion durch die Lymphozyten zur Folge. Deshalb sollten hier mit Hilfe von Endotoxin bindenden Peptiden das permeierte LPS im basolateralen Kompartiment des Kokulturmodells gebunden werden und so die direkte Stimulation der Leukozyten inhibiert werden.

##### 4.6.2.1 Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS mit Hilfe von Polymyxin

Basolateral eingesetztes Polymyxin inhibierte die durch apikaler Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS induzierte Ausschüttung von TNF-α und IL-8 vollständig (p<0,001) (vgl. Tabelle 74, Abbildung 41).

Tabelle 74 TNF-α- und IL-8-Konzentration (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit apikal 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS, basolateral 10 µg/ml Polymyxin B sowie der Kombination aus beiden im Kokulturmodell.

	TNF-α (pg/ml)		IL-8 (ng/ml)	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	8 ± 5 (17)		17 ± 17 (17)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	6109 ± 2251 (19)		223 ± 1445 (19)	
PM-bl 10µg/ml + K12 1µg/ml	5 ± 6 (10)	<0,001	15 ± 19 (10)	<0,001
PM-bl 10µg/ml	5 ± 4 (10)		7 ± 4 (10)	

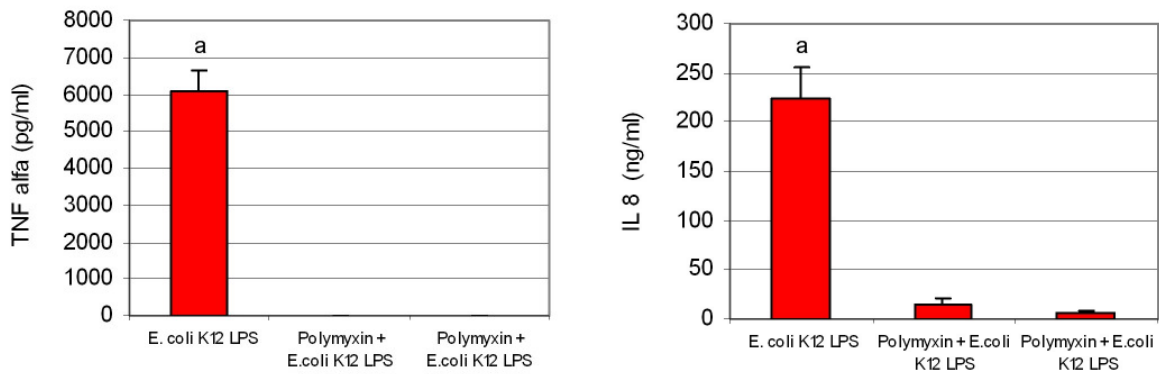


Abbildung 41: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentration (Mittelwerte und Standardabweichungen) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit apikal 1  $\mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS, basolateral 10  $\mu\text{g/ml}$  Polymyxin B sowie der Kombination aus beiden im Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.6.2.2 Inhibierung der immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS mit Hilfe von Colistin

Auch basolateral zugegebenes Colistin inhibierte eine Zytokinproduktion im Kokulturmodell. Die Produktion von TNF- $\alpha$  wurde auf 0,6 % der durch *E. coli* K12 LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Konzentration reduziert ( $p < 0,001$ ), während die IL-8-Produktion noch ca. 10% betrug ( $p < 0,001$ ) (vgl. Tabelle 75, Abbildung 42).

Tabelle 75: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentration (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit apikal 1  $\mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS, basolateral 10  $\mu\text{g/ml}$  Colistin sowie der Kombination aus beiden im Kokulturmodell.

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)		IL-8 (ng/ml)	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
Kontrolle	8 $\pm$ 5 (17)		17 $\pm$ 17 (17)	
<i>E. coli</i> K12 LPS	6109 $\pm$ 2251 (19)		223 $\pm$ 143 (19)	
Colistin + <i>E. coli</i> K12 LPS	37 $\pm$ 50 (8)	<0,001	20 $\pm$ 120 (8)	<0,001
Colistin	4 $\pm$ 4 (8)		9 $\pm$ 4 (8)	

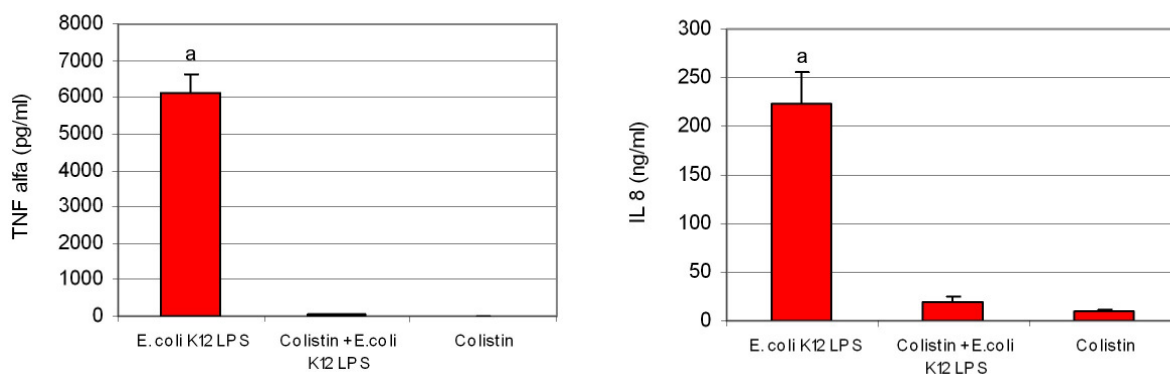


Abbildung 42: TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentration (Mittelwerte und Standardabweichungen) nach 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit apikal 1  $\mu$ g/ml *E. coli* K12 LPS, basolateral 10  $\mu$ g/ml Colistin sowie der Kombination aus beiden im Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.6.3 Reihenfolge der Stimulation im Kokulturmodell

Zur Ermittlung der Reihenfolge der Stimulation wurde die RNA sowohl aus CaCo-2-Zellen, wie auch aus PBMCs isoliert und der Anteil der IL-8-mRNA im Verhältnis zur 18S-RNA in einer quantitativen real time RT-PCR gemessen. Dabei ergab sich nur bei der, aus 12 h inkubierten CaCo-2-Zellen isolierten RNA, ein signifikant höheres IL-8/18S Verhältnis bei Stimulation mit *E. coli* K12 als bei den Negativkontrollen. Bei der aus PBMC isolierten RNA waren keine signifikanten Unterschiede in dem exprimierten IL-8/18S-RNA messbar, jedoch war in der RNA aus PBMC bedeutend mehr IL-8-RNA enthalten. Ausserdem war bereits nach 4 h Inkubationszeit in der aus PBMC isolierten RNA bei Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 ein Trend zu einem höheren, IL-8/18S Verhältnis zu finden als bei der Negativkontrolle. Nach 12 h Inkubation war dieser Trend sogar noch ausgeprägter zu beobachten.

Tabelle 76: IL-8/18S RNA (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) des mittels real time RT-PCR gemessenen Verhältnisses von IL-8/18S in der aus CaCo-2-Zellen bzw. PBMC isolierten RNA nach 4- und 12-stündiger Inkubation sowie apikaler Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml *E. coli* K12 LPS bzw. der Negativkontrolle im Kokulturmodell.

	MW $\pm$ SD (N)		p student's t-test
	Kontrolle	<i>E. coli</i> K12	
CaCo 4h	2,28 $\pm$ 7,20 (10)	0,02 $\pm$ 0,02 (10)	0,358
PBMC 4h	9,77 $\pm$ 10,57 (10)	21,14 $\pm$ 19,21 (10)	0,119
CaCo 12h	0,05 $\pm$ 0,12 (14)	1,92 $\pm$ 3,55 (13)	0,003
PBMC 12h	25,36 $\pm$ 28,81 (14)	138,01 $\pm$ 328,58 (12)	0,064

## ERGEBNISSE

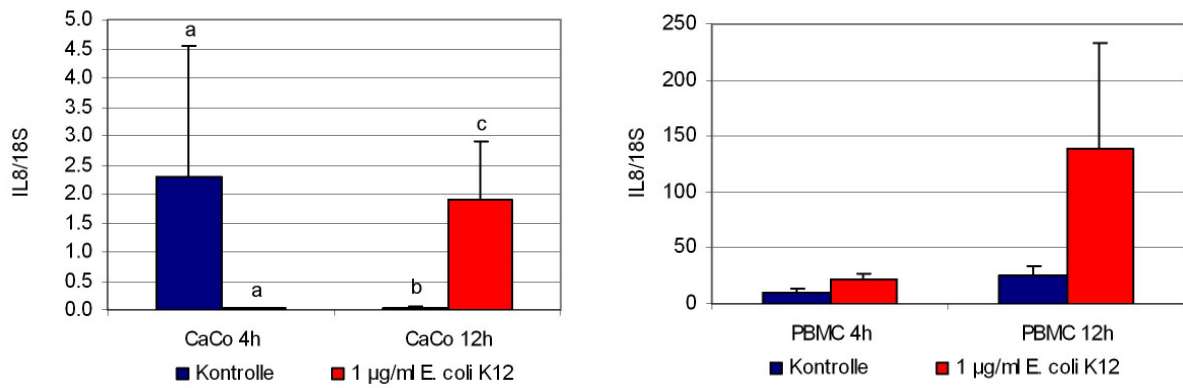


Abbildung 43: IL8/18S RNA Verhältnisses in der aus CaCo-2-Zellen bzw. PBMC isolierten RNA (Mittelwerte und Standardfehler) nach 4- und 12-stündiger Inkubation und Stimulation mit 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS apikal bzw. der Kontrolle im Kokulturmodell. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

## 4.7 Lässt sich eine Stimulation durch nicht stimulierende Bakterien oder deren Endotoxine verringern?

Probiotische und kommensale Keime sowie deren Membranbestandteile führten zu keiner Immunstimulation im Kokulturmodell. Deshalb sollte eine mögliche inhibierende Wirkung einer Basisstimulation untersucht werden. Als Basisstimulans dienten  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. bei den Membranbestandteilen  $1 \mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS.

### 4.7.1 Inhibierung der von *E. coli* K12 induzierten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden Bakterien

#### 4.7.1.1 Kostimulation von *E. coli* K12 mit *B. bifidum*

Bei einer Kostimulation von *E. coli* K12 mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. bifidum* ergaben sich im student's t-test keine Unterschiede zu den nur mit *E. coli* K12 stimulierten Versuchsansätzen. Das *B. bifidum* war, wenn es in der gleichen Konzentration und zum gleichen Zeitpunkt dem Versuch zugesetzt wurde, wie das Basisstimulans nicht in der Lage, eine Änderung der Basisstimulation hervorzurufen (vgl. Tabelle 77).

Tabelle 77: TEER-Differenzen, Permeabilitäten, TNF- $\alpha$ -, IL-8-, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen sowie basolaterale LPS-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und *B. bifidum* im Kokulturmodell.

	Zeitpunkt	MW $\pm$ SD (N)		p student's t-test
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12+ <i>B. bifidum</i>	
TEER-Differenz (Ohm/cm <sup>2</sup> )	4 h	40 $\pm$ 101 (6)	-2 $\pm$ 8 (6)	0,331
	12 h	-12 $\pm$ 12 (18)	-15 $\pm$ 15 (18)	0,487
	72 h	-30 $\pm$ 16 (12)	-23 $\pm$ 20 (11)	0,389
Permeabilität (%)	12 h	0,01 $\pm$ 0,03 (12)	0,00 $\pm$ 0,00 (12)	0,328
	72 h	0,62 $\pm$ 0,22 (12)	0,80 $\pm$ 1,01 (11)	0,858
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	4 h	288 $\pm$ 194 (12)	199 $\pm$ 158 (12)	0,231
	12 h	3275 $\pm$ 2089 (24)	2612 $\pm$ 1451 (23)	0,215
IL-8 (ng/ml)	4 h	6 $\pm$ 4 (12)	6 $\pm$ 2 (12)	0,997
	12 h	107 $\pm$ 61 (24)	109 $\pm$ 45 (23)	0,901
	24 h	304 $\pm$ 121 (12)	296 $\pm$ 103 (11)	0,869
IL-6 (ng/ml)	24 h	24 $\pm$ 14 (12)	23 $\pm$ 16 (11)	0,887

	Zeitpunkt	MW ± SD (N)		p student's t- test
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12+ <i>B. bifidum</i>	
IL-10 (pg/ml)	72 h	347 ± 240 (12)	370 ± 227 (11)	0,815
IFN-γ (pg/ml)	72 h	540 ± 294 (12)	662 ± 382 (11)	0,397
LPS basolateral (pg/ml)	4 h	102 ± 135 (6)	117 ± 122 (6)	0,845
	12 h	28 ± 16 (6)	14 ± 8 (6)	0,102
	72 h	93 ± 173 (6)	73 ± 109 (5)	0,834

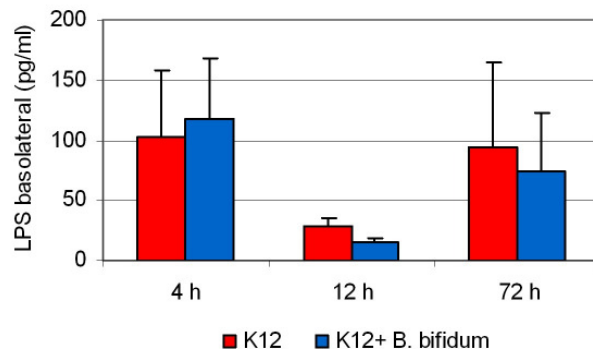


Abbildung 44: Basolateralen LPS-Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und *B. bifidum* im Kokulturmodell.

#### 4.7.1.2 Kostimulation von *E. coli* K12 mit *B. vulgatus*

Genauso wie bei der Kostimulation mit *B. bifidum* ergaben sich auch bei der Kostimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *B. vulgatus* mit Ausnahme der Permeabilität nach 72 h im student's t test, keine signifikanten Unterschiede. Jedoch konnte bei TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IFN $\gamma$  ein nicht signifikanter Trend zu einer geringfügigen Senkung der durch die Basisstimulation induzierten Zytokinausschüttung durch *B. vulgatus* gemessen werden (vgl. Tabelle 78). Die Permeabilität bei Kostimulation war leicht erhöht im Vergleich zu einer Stimulation ohne Zusatz von *B. vulgatus* ( $p=0,05$ ).

Tabelle 78: TEER-Differenzen, Permeabilitäten, TNF- $\alpha$ -, IL-8-, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und *B. vulgatus* im Kokulturmodell.

	Zeitpunkt	MW $\pm$ SD (N)		P <i>student's</i> - <i>test</i>
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12 + <i>B. vulgatus</i>	
TEER-Differenz (Ohm/cm <sup>2</sup> )	4 h	40 $\pm$ 101 (6)	-1 $\pm$ 5 (6)	0,341
	12 h	-12 $\pm$ 12 (18)	-14 $\pm$ 16 (18)	0,602
	72 h	-30 $\pm$ 16 (12)	-26 $\pm$ 19 (12)	0,601
Permeabilität (%)	12 h	0,01 $\pm$ 0,03 (12)	0,00 $\pm$ 0,00 (12)	0,328
	72 h	0,62 $\pm$ 0,22 (12)	0,87 $\pm$ 0,37 (12)	<b>0,050</b>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	4 h	288 $\pm$ 194 (12)	200 $\pm$ 172 (12)	0,255
	12 h	3275 $\pm$ 2089 (24)	2565 $\pm$ 1563 (24)	0,189
IL-8 (ng/ml)	4 h	6 $\pm$ 4 (12)	7 $\pm$ 3 (12)	0,552
	12 h	107 $\pm$ 61 (24)	126 $\pm$ 53 (24)	0,264
	24 h	304 $\pm$ 121 (12)	307 $\pm$ 114 (12)	0,945
IL-6 (ng/ml)	24 h	24 $\pm$ 14 (12)	13 $\pm$ 11 (10)	0,074
IL-10 (pg/ml)	72h	347 $\pm$ 240 (12)	271 $\pm$ 198 (12)	0,408
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	72 h	540 $\pm$ 294 (12)	429 $\pm$ 346 (12)	0,406

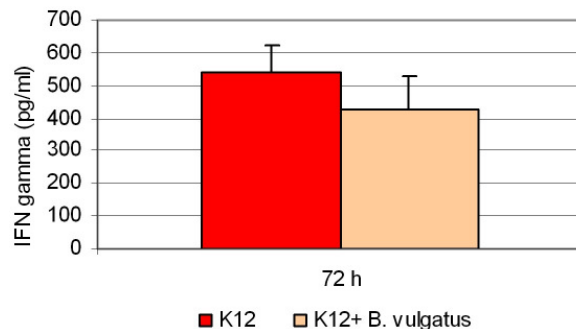
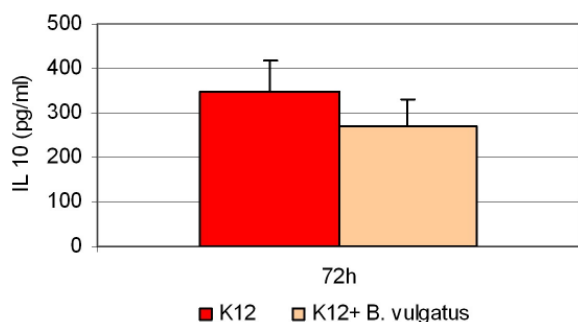
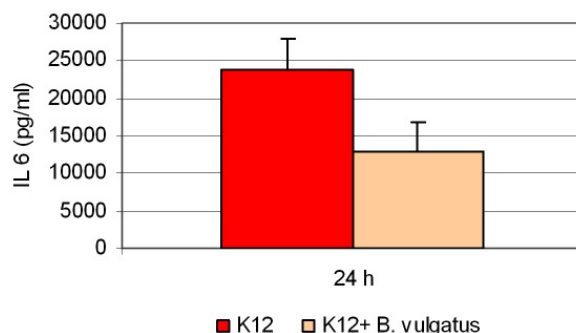
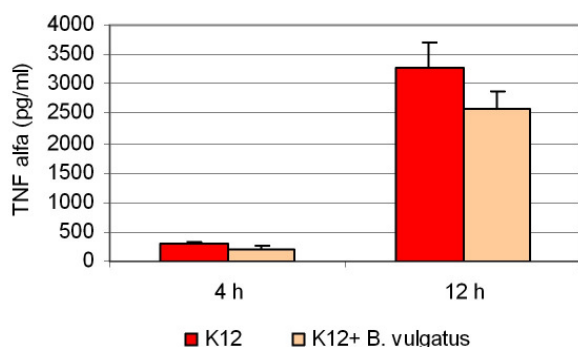


Abbildung 45: TNF- $\alpha$ -, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und *B. vulgatus* im Kokulturmodell.

**4.7.1.3 Kostimulation von *E. coli* K12 mit *Lb. rhamnosus* GG**

Die Kostimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml (1x) und  $1 \times 10^8$  KBE/ml (10x) hatte ebenfalls kaum Veränderungen der Basisstimulation zur Folge. Unterschiede wurden nur bei der Permeabilität nach 72 h gefunden, wobei die Kostimulation eine geringfügig höhere Permeabilität aufwies. Bei der TNF- $\alpha$ -Konzentration im basolateralen Kompartiment hatten die mit 10x *Lb. rhamnosus* GG kostimulierten Versuchsansätze höhere Konzentrationen als die Ansätze der Basisstimulation ( $p=0,026$ ) und der Kostimulation mit 1x *Lb. rhamnosus* GG ( $p=0,007$ ) zur Folge.

Tabelle 79: TEER-Differenzen, Permeabilitäten, TNF- $\alpha$ -, IL-8-, IL-6-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen sowie basolaterale LPS-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und  $1 \times 10^7$  KBE/ml *Lb. rhamnosus* GG, sowie *E. coli* K12 und  $1 \times 10^8$  KBE *Lb. rhamnosus* GG im Kokulturmmodell.

	Zeitpunkt	MW $\pm$ SD (N)			p ANOVA / student's t- test
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12+ 1x <i>Lb. rh.</i> GG	<i>E. coli</i> K12+ 10x <i>Lb. rh.</i> GG	
TEER-Differenz (Ohm/cm <sup>2</sup> )	4h	40 $\pm$ 101 (6)	4 $\pm$ 9 (6)		0,416
	12h	-12 $\pm$ 12 (18)	-9 $\pm$ 13 (18)		0,538
	72h	-30 $\pm$ 16 (12)	-21 $\pm$ 15 (12)		0,190
Permeabilität (%)	12h	0,29 $\pm$ 0,42 (18)	0,25 $\pm$ 0,40 (17)		0,793
	72h	0,62 $\pm$ 0,22 (12)	1,08 $\pm$ 0,22 (12)		<b>&lt;0,001</b>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	4 h	288 $\pm$ 194 (12)	159 $\pm$ 123 (12)		0,065
	12 h	4161 $\pm$ 2987 (28)	3443 $\pm$ 2500 (29)	8033 $\pm$ 1740 (4)	<b>0,009</b>
IL-8 (ng/ml)	4 h	6 $\pm$ 4 (12)	7 $\pm$ 2 (12)		0,689
	12 h	131 $\pm$ 85 (30)	150 $\pm$ 111 (29)	210 $\pm$ 103 (5)	0,255
	24 h	304 $\pm$ 121 (12)	307 $\pm$ 149 (12)		0,946
IL-6 (ng/ml)	24 h	24 $\pm$ 14 (12)	21 $\pm$ 15 (7)		0,657
IL-10 (pg/ml)	72h	347 $\pm$ 240 (12)	223 $\pm$ 167 (12)		0,156
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	72 h	540 $\pm$ 294 (12)	455 $\pm$ 265 (12)		0,463
LPS basolateral (pg/ml)	4 h	102 $\pm$ 135 (6)	21 $\pm$ 26 (6)		0,134
	12 h	28 $\pm$ 16 (6)	72 $\pm$ 118 (6)		0,678
	72 h	93 $\pm$ 173 (6)	44 $\pm$ 49 (6)		0,807



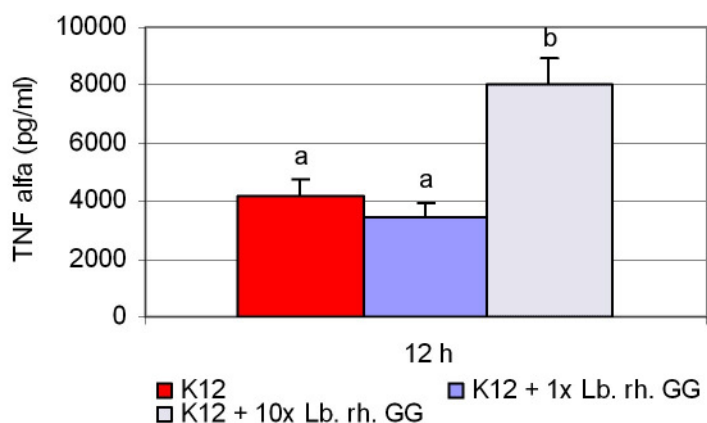


Abbildung 46: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und  $1 \times 10^7$  KBE/ml *Lb. rhamnosus* GG bzw.  $1 \times 10^8$  KBE *Lb. rhamnosus* GG im Kokulturmolell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.7.2 Inhibierung der von *E. coli* K12 LPS induzierten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden LPS

##### 4.7.2.1 Kostimulation von *E. coli* K12 LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen an *B. vulgatus* MPK LPS

Bei einer Kostimulation durch 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  nicht stimulierendem LPS von *B. vulgatus* MPK zu einer Basisstimulation von 1  $\mu\text{g/ml}$  *E. coli* K12 LPS waren bei der Messung der Integrität der CaCo-2 Monolayer keine Unterschiede in den TEER-Differenzen messbar. Jedoch führten die mit 100  $\mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* MPK kostimulierten Versuchsansätze im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit *E. coli* K12 LPS Stimulation ohne Kostimulation zu einer signifikant erhöhten Permeabilität ( $p=0,006$ ) (vgl. Tabelle 80).

Tabelle 80: TEER-Differenzen und Permeabilitäten (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* MPK LPS im Kokulturmolell.

	TEER-Differenz (Ohm/cm <sup>2</sup> ) nach 12 h		Permeabilität (%) nach 12 h	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	-28 $\pm$ 139 (19)	0,545	0,87 $\pm$ 0,52 (18)	0,012
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	15 $\pm$ 98 (10)		1,40 $\pm$ 0,89 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 10 $\mu\text{g/ml}$	0 $\pm$ 66 (10)		1,41 $\pm$ 0,82 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 100 $\mu\text{g/ml}$	29 $\pm$ 85 (10)		2,19 $\pm$ 1,58 (10)	

Auf TNF- $\alpha$  hatte die Kostimulation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *B. vulgatus* MPK LPS dagegen eine signifikante Verringerung der basolateralen Konzentration nach 12 h Inkubation im Vergleich zur Basisstimulation zur Folge ( $p=0,021$ ) (vgl. Tabelle 81, Abbildung 47). Bei IL-8 konnten dagegen keine derartigen Einflüsse gemessen werden. Jedoch scheint sich die gleiche Tendenz wie bei TNF- $\alpha$  abzuzeichnen.

Tabelle 81: TNF- $\alpha$ -, IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)) nach 12-stündiger Stimulation mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *B. vulgatus* MPK LPS im Kokulturmodell.

	TNF- $\alpha$ (pg/ml) nach 12 h		IL-8 (ng/ml) nach 12 h	
	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA	MW $\pm$ SD (N)	P ANOVA
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6109 $\pm$ 2251 (19)	0,032	223 $\pm$ 143 (19)	0,684
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4872 $\pm$ 1975 (10)		198 $\pm$ 139 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4658 $\pm$ 062 (10)		189 $\pm$ 118 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + <i>B. vulgatus</i> MPK LPS 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3807 $\pm$ 1304 (10)		163 $\pm$ 92 (10)	

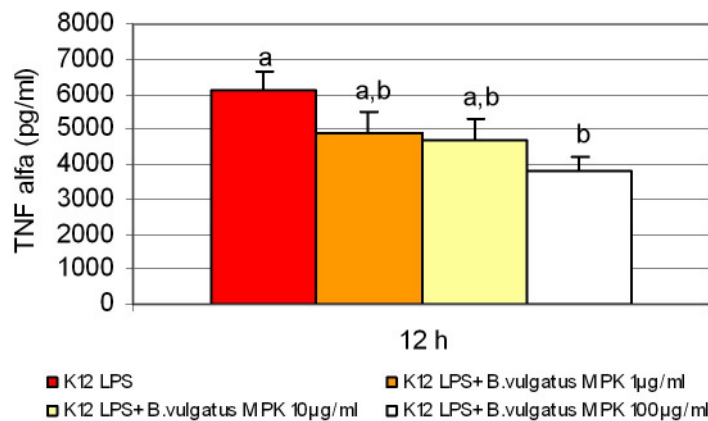


Abbildung 47: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *B. vulgatus* MPK LPS im Kokulturmodell. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant.

#### 4.7.2.2 Kostimulation von *E. coli* K12 LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen an *B. vulgatus* LPS

Im Gegensatz zur Kostimulation mit *B. vulgatus* MPK konnten keine signifikanten Veränderungen bei der Messung der Integrität der CaCo-2 Monolayer durch eine der Versuchsbedingungen gemessen werden (vgl. Tabelle 82).

Tabelle 82: TEER-Differenzen und Permeabilitäten (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) nach Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS im Kokulturmodell.

	TEER-Differenz (Ohm/cm <sup>2</sup> ) nach 12 h		Permeabilität (%) nach 12 h	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml	-28 ± 139 (19)	0,45	0,87 ± 0,52 (18)	0,212
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml + <i>B. vulgatus</i> LPS 1µg/ml	5 ± 104 (10)		0,90 ± 0,81 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml <i>B. vulgatus</i> LPS 10µg/ml	25 ± 112 (10)		0,96 ± 0,78 (9)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml + <i>B. vulgatus</i> LPS 100µg/ml	42 ± 101 (10)		1,46 ± 0,91 (10)	

Auch bei den basolateral gemessenen Zytokinkonzentrationen brachte der Zusatz der verschiedenen Konzentrationen an *B. vulgatus* LPS keine signifikante Veränderung (vgl. Tabelle 83, Abbildung 48). Der Trend schien aber zu einer geringeren Zytokinausschüttung durch Zusatz höherer Konzentrationen an nicht bzw. gering stimulierendem *B. vulgatus* LPS zu gehen.

Tabelle 83: TNF-α-, IL-8-Konzentrationen (Mittelwerte (**MW**) und Standardabweichungen (**SD**)) nach Stimulation mit 1×10<sup>7</sup> KBE/ml *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS im Kokulturmodell.

	TNF-α (pg/ml) nach 12 h		IL-8 (ng/ml) nach 12 h	
	MW ± SD (N)	P ANOVA	MW ± SD (N)	P ANOVA
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml	6109 ± 2251 (19)	0,175	223 ± 143 (19)	0,422
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml + <i>B. vulgatus</i> LPS 1µg/ml	5597 ± 2403 (10)		168 ± 104 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml <i>B. vulgatus</i> LPS 10µg/ml	4588 ± 2111 (10)		159 ± 93 (10)	
<i>E. coli</i> K12 LPS 1µg/ml + <i>B. vulgatus</i> LPS 100µg/ml	4549 ± 1594 (10)		167 ± 95 (10)	

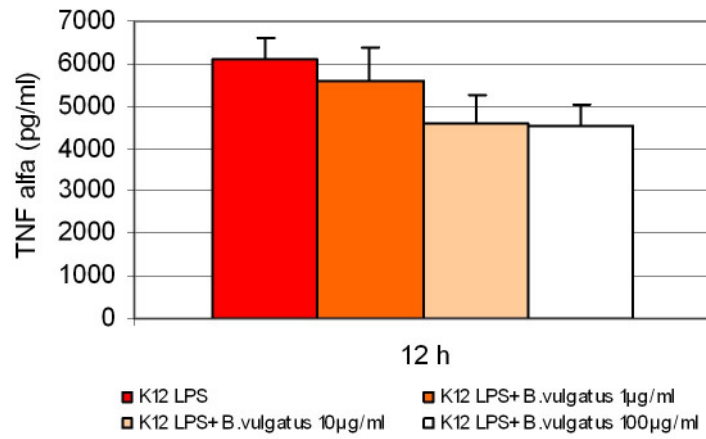


Abbildung 48: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Mittelwerte und Standardfehler) nach 12-stündiger Stimulation mit *E. coli* K12 bzw. Kostimulation von *E. coli* K12 und 1, 10 bzw. 100  $\mu$ g/ml *B. vulgatus* LPS im Kokulturmodell.

## 5 Diskussion

### 5.1 Adaptation der Enterozyten und Leukozyten in Kokultur vor der Stimulation

Um möglichst *in-vivo* nahe Bedingungen *in-vitro* zu schaffen, wurde in dem verwendeten Kokulturmodell aus Leukozyten und Enterozyten eine 24-stündige Adaptationsphase der Leukozyten an die Enterozyten im Vergleich zur direkten Stimulation erprobt. Im Gegensatz zur Annahme, dass es zu keiner Änderung der durch nichtpathogene *E. coli* ausgelösten Immunantwort kommt, zeigte sich eine teilweise signifikante, im Trend eindeutige 50 bis 75% ige Hemmung der Zytokinausschüttung bei den adaptierten Leukozyten. Als mögliche Ursachen dieser Hemmung kommen eine geringere Stimulierbarkeit aufgrund der Alterung der Zellen, aber auch die von Parlesak et al. (2004) beschriebene Immunsuppression der Leukozyten in Präsenz von Enterozyten in Betracht. Dabei wird die Expression des endotoxinspezifischen Korezeptors CD14 in Anwesenheit von IEC reduziert (Haller et al. 2002a). Dies entspricht auch den in der Mucosa vorherrschenden Bedingungen, wo diese klassischen Oberflächenantigene der Monozyten auch nur in geringem Umfang exprimiert werden und als ein Mechanismus oraler Toleranz zu werten sind. Dies wird auch insofern bestätigt, als dass derartig immunsupprimierte Monozyten nicht bei Patienten mit IBD nachgewiesen wurden (Rugtveit et al., 1997). Aufgrund des angewandten Versuchsdesigns lässt sich nicht eindeutig sagen, welche der beiden möglichen Ursachen für die gemessene Hemmung in der Zytokinausschüttung verantwortlich ist. Die Kernfrage dieses Versuchsaufbaus war es, die prinzipiellen Eigenschaften der Zellen bei sofortiger und mit 24 Stunden verzögerter Stimulation zu vergleichen wobei die PBMCs lediglich als Biomarker dienten, so dass die Ursache der Immunsuppression aufgrund verzögerter Stimulation von sekundärer Bedeutung ist.

Auch die Interaktion der Leukozyten mit den Enterozyten ist in beiden Modellen via löslicher Faktoren gewährleistet, so dass eine Stimulierbarkeit bei beiden Versuchsdesigns möglich ist. Einzig die Effekte bei sofortiger Stimulation fallen deutlicher aus weswegen für alle weiteren Versuche aufgrund der höheren Sensitivität die direkte Stimulation gewählt wurde.

## 5.2 Stimulationspotentiale probiotischer und kommensaler Bakterien in einer Enterozyten-Leukozyten-Kokultur

Die Aussagen über Wirkmechanismen und die tatsächlichen Auswirkungen von kommensalen Keimen im allgemeinen, sowie probiotischen Bakterien im besonderen, sind in der Literatur teilweise sehr widersprüchlich. Beispielsweise konnte Tejada-Simon et al. (1999b) bei Stimulation von RAW 264.7 mit *Lb. casei shirota* *in-vitro* eine Steigerung der TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion messen, während im Tiermodell bei oraler Verabreichung von *Lb. casei shirota* an Mäuse keinerlei Veränderungen messbar waren (Tejada-Simon et al. 1999a). Ähnlich widersprüchlich sind auch die Ergebnisse in Bezug auf die durch *B. bifidum* ausgelöste Zytokinausschüttung. So zeigten Mènard et al. (2004) eine Verringerung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Produktion durch Kulturmedium von *B. bifidum* bei HT29-19 Zellen auf Transwell Filtern. He et al. (2002) konnten dagegen bei Stimulation von J777.1 Zellen mit 27 verschiedenen hitzeinaktivierten *Bifidobakterien* sp. eine erhöhte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-12 durch Bifidobakterien, die hauptsächlich bei Erwachsenen vorkommen (*B. adolescentis* und *B. longum*), messen. Dagegen führte *B. adolescentis* zu keiner Induktion der Ausschüttung des antiinflammatorischen IL-10.

Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zum Vergleich der Stimulationspotentiale verschiedener kommensaler (*E. coli* K12, *B. vulgatus*), probiotischer (*Lb. casei shirota*, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. johnsonii*, *B. bifidum*, *B. vulgatus* MPK, *E. faecalis*) und lebensmitteloriginärer (*Lb. acidophilus*, *Lb. sakei*) Bakterien durchgeführt. Dabei ergaben sich zwar Unterschiede in der Integrität der Zellmonolayer, die aber kein Muster hin zu einer Veränderung der Permeabilität bei bestimmten Bakteriengruppen aufwiesen. Dies widerspricht den Ergebnissen von Madsen et al. (2001), der eine Erhöhung der Integrität, mittels des Mannitol-Flusses in Ussing Kammern, durch die probiotische Mischung VSL#3 messen konnte. Darüber hinaus konnten Cario et al. (2004) mechanistische Änderungen bezüglich der Integrität in einer durch TLR-2 via Proteinkinase C vermittelten Erhöhung der ZO-1 assoziierten Integrität messen. Auch Resta-Lenert et al. (2006) zeigten eine durch *Str. thermophilus* und *Lb. acidophilus* vermittelte Steigerung der Integrität der Epithelzellschicht durch eine Erhöhung der Phosphorylierung von ZO-1 aber auch von Occludin. In dieser Arbeit konnten diese durch probiotische Bakterien verursachten Veränderungen der Integrität weder in erhöhten TEER-Differenzen noch in erniedrigten Fluorescein-Dextran Permeabilitäten gemessen werden. Die vorhandenen uneinheitlichen

Integritätsunterschiede sind jedoch nicht mit den Stimulationspotentialen der Bakterien assoziiert, da bei Bakterien wie z.B. *B. vulgatus* mit einer Permeabilität von 8% keine stark erhöhte Ausschüttung der gemessenen Zytokine gezeigt werden konnte. Die geringen Zytokinkonzentrationen der mit *Laktobacillen* sp., *B. bifidum*, *E. faecalis* und *B. vulgatus* stimulierten Versuchsansätze können somit nicht auf eine durch die Bakterien gestiegene Dichtigkeit der Zellmonolayer zurückgeführt werden.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu denen von Haller et al. (2000), der bei Stimulation eines Kokulturmodells aus CaCo-2-Zellen und humanen PBMC gemessen hat, dass *Lb. sakei* zu einer Steigerung der TNF- $\alpha$ -Expression führt. Bestätigt werden konnte aber, dass der Zusatz von *Lb. johnsonii* keine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine in diesem Modell zur Folge hat, genauso wie Riedel et al. (2006) keine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine durch *Bifidobakterien* sp. im Kokulturmodell aus CaCo-2-Zellen und PBMC messen konnte. Allgemein unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass gram-positive probiotische Bakterien nicht zu einer Erhöhung der Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder IL-8 führen (Otte und Podolsky, 2004; Menard et al., 2004, McCracken et al., 2002). Gram-positive probiotische Bakterien haben demzufolge keine Auswirkungen auf Epithelzellen und entsprechende darunterliegende Lymphozyten, hinsichtlich der Ausschüttung der gemessenen Zytokine. Daraus wurde geschlossen, dass die probiotische Immunmodulation nicht auf einer Veränderung der Expression von TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  erfolgt.

Dennoch belegen verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Studien, dass es bei erkrankten Versuchstieren oder mittels stimulierender Substanzen sensibilisierter Zellen zu einer Senkung der Ausschüttung proinflammatorischer bzw. zu einer Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine kommt (Madsen et al. 2001). Ménard et al. (2004) konnten beispielsweise eine dosisabhängige Inhibierung der durch LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Sekretion in einem Kokulturmodell aus HT29 19A-Zellen und mit Endotoxin stimulierten PBMCs durch *Laktobacillen* messen. *B. breve* führte in selbigem Modell sogar zu einer erhöhten Bildung des antiinflammatorischen IL-10. Auch Pena et al. (2003) konnte eine Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Sekretion durch *Lb. rhamnosus* messen und Shida et al. (1998) sowie Matsuzaki et al. (1998) fanden eine dosisabhängig erhöhte Bildung des immunregulierenden Zytokins IFN- $\gamma$  in mit Ovalalbumin stimulierten Mäusemilzzellen nach Gabe von

*Lb. casei* shirota. Diese Steigerung der IFN- $\gamma$ -Konzentration in stimulierten Mäusemilzzellen konnten Gill et al. (2000) auch bei Fütterung mit *Lb. rhamnosus* und *Lb. acidophilus* messen. Dies lässt den Schluss zu, dass nur aktivierte Darmepithelzellen sensibel für die protektive Wirkung gram-positiver probiotischer Bakterien sind. Bestätigt wird dies durch eine *in-vitro*-Studie von McCracken et al. (2002), die nur in Anwesenheit von TNF- $\alpha$  eine Erhöhung der IL-8-mRNA durch *Lb. plantarum* messen konnte, nicht aber ohne TNF- $\alpha$ -Vorstimulation. Auf Proteinebene wurde dagegen die IL-8 Sekretion durch *Lb. plantarum* bei Sensibilisierung mit TNF- $\alpha$  verringert. Auch Spanhaak et al. (1998) konnten in einer Humanstudie keinen Einfluss auf Immunparameter von gesunden Probanden bei Supplementierung mit *Lb. casei* shirota feststellen. Dagegen konnte in einer Humanstudie mit Kindern, die an atopischem Ekzem und Kuhmilchallergie erkrankt waren, die TNF- $\alpha$ -Konzentration in Fäzes durch orale *Lb. rhamnosus* Aufnahme vermindert werden (Majamaa et al., 1997). In einer weiteren Humanstudie mit Colitis ulcerosa-Patienten konnte durch die Behandlung mit einem probiotischen Präparat, bestehend aus *Enterococccen* sp., *Bifidobakterien* sp. und *Laktobacillen* sp., in Biopsieproben eine Verminderung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen sowie eine Steigerung der mRNA-Menge des antiinflammatorischen IL-10 bewirkt werden (Cui et al., 2004).

Aber nicht nur gram-positive probiotische Bakterien führen in den durchgeführten Experimenten zu keiner Veränderung der Zytokinausschüttung im Vergleich zur Negativkontrolle, sondern auch die gram-negativen Kommensalen: ein *B. vulgatus* Isolat, sowie der *B. vulgatus* MPK. Einzig *E. coli* K12 führte zu hoch signifikant gestiegenen Zytokinkonzentrationen im basolateralen Medium. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Waidmann et al. (2003), die in IL-2-defizienten Mäusen nur eine Colitis mit *E. coli*, nicht aber mit *B. vulgatus* auslösen konnten und dieser im Gegenteil sogar vor der *E. coli*-induzierten Kolitis schützte. Daraus wurde geschlossen, dass auch die gram-Eigenschaft nicht die Ursache für die Stimulierbarkeit ist. Eine mögliche Ursache könnte aber die unterschiedliche Struktur des Endotoxins bzw. dessen Lipid A sein, welches für die immunbiologische Aktivität der Endotoxine verantwortlich gemacht wird (Kotani et al., 1985; Westphal et al., 1954; Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1987).

Allgemein scheint der Crosstalk zwischen Bakterien und Epithelzellen für die Immunantwort von zentraler Bedeutung zu sein. Da die Epithelzellen in direktem Kontakt mit sämtlichen Noxen und luminalen Stimuli stehen, gelten sie als Vermittler der intestinalen



Immunantwort (Haller und Jobin, 2004). Dabei erfolgt die Initiation der Signalvermittlung über die extrazellulär lokalisierten toll-like-Rezeptoren (TLR), sowie die intrazellulären NOD-Protein-Rezeptoren (Bonen et al., 2003). Die durch LPS induzierte Signalvermittlung geschieht über TLR4, während für die Oberflächenbestandteile gram-positiver Bakterien, Flagellin und unmethylierte CpG TLR2, TLR5 und TLR9 verantwortlich sind. Auch die Signalvermittlung sämtlicher Stimuli, kommensaler und probiotischer Bakterien, erfolgt über die Rezeptorfamilien TLR und NOD Rezeptoren (Cario et al., 2002a). So konnten Haller et al. (2003, 2002b) eine Phosphorylierung von RelA aufgrund des nicht pathogenen kommensalen *B. vulgatus* in Primärkultur und IEC Linien nachweisen. Diese Aktivierung des Epithels wurde bei mit *B. vulgatus* monoassoziierten Ratten bestätigt. Gleichzeitig konnte jedoch keine Induktion der darunter lokalisierten Immunzellen der Lamina propria nachgewiesen werden, was ausschließlich auf eine partielle NFκB-Aktivierung der Mucosa schließen lässt. Diese fehlende Aktivierung der basolateralen Lymphozyten könnte eine Erklärung für die geringen Zytokinkonzentrationen im angewandten Kokulturmodell bei Stimulation mit beiden Stämmen des *B. vulgatus* sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass in dieser Arbeit keine erhöhten IL-8-mRNA-Spiegel in CaCo-2-Zellen gemessen werden konnten. Diese fehlende Stimulierbarkeit könnte aber auch an einem wie von Neish et al. (2000) für nichtvirulente *Salmonella* sp. beschriebenen Mechanismus liegen, der die angeborene Immunantwort über regulatorische Elemente des NFκB-Signalweges herunterreguliert. Ähnlich Mechanismen könnten auch die Ursache dafür sein, dass *E. faecalis* in den Versuchen im Kokulturmodell zu keiner Zytokinausschüttung oder Expression von IL-8-mRNA in CaCo-2-Zellen führt. Dies widerspricht aber den Ergebnissen von Ruiz et al. (2005a), die auch für *E. faecalis* bei Wildtyp Mäusen eine vorübergehende, bei IL-10 defizienten Mäusen eine persistierende RelA-Phosphorylierung sowie einer Erhöhung der NFκB abhängigen Gene gemessen haben. Für eine Aktivierung des darmassoziierten Immunsystems durch *E. faecalis* spricht auch, dass IL 10<sup>-/-</sup> 129 SvEv Mäuse nach 12 bis 16 Tagen mit *E. faecalis* eine experimentelle Colitis entwickeln (Balish und Warner, 2002). Auch für *B. lactis* konnten Ruiz et al. (2005b) eine RelA-Phosphorylierung messen, die im Gegensatz zur Stimulation mit *B. vulgatus*, auch eine p38 MAPK-Phosphorylierung in IEC Linien zur Folge hatte und die IL-6-Genexpression erhöhte. Dies widerspricht aber den Ergebnissen dieser Arbeit, in der es bei Stimulation mit *B. bifidum* weder zu einer erhöhten Zytokinausschüttung noch zu einer vermehrten IL-8-Expression in CaCo-2-Zellen kam.

Dass es im Gastrointestinaltrakt des gesunden Menschen trotz Anwesenheit der oben genannten Bakterien zu keinen pathologischen Veränderungen kommt, spricht dafür, dass Mechanismen existieren, die aktivierende Signale regulieren und damit eine permanente Aktivierung der IEC und chronische Entzündung verhindern. An der Regulation der Proteine, die in ihrer Expression von der Aktivierung von TLR abhängen sind IRAK-M, toll-interacting protein (TOLLIP), A20 und der peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  beteiligt. IRAK-M gilt dabei als ein regulatorisches Protein der LPS-Toleranz, da es stark durch LPS induziert wird und über einen Feedback-Mechanismus die immunologische Reaktion herunterzuregulieren vermag (Kobayashi et al., 2002). Damit verhindert es eine permanente Stimulation durch LPS, was v.a. in Bereichen mit hohen Endotoxinkonzentrationen wie im Gastrointestinaltrakt von grosser Bedeutung ist. Eine derartige Hemmung der Immunreaktion könnte in dem angewandten Kokulturmodell z. B. die Einstellung der Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nach ca. 12 h sein (Parlesak et al., 2004). Darüber hinaus könnte auch die nach 72 h gemessene Erhöhung der IL-10-Konzentration eine beginnende Immunreaktion hemmen und so einen chronischen Entzündungsprozess durch *E. coli* unterbinden. Ein weiteres Protein zur Modulation des Stimulationsprozesses im Intestinum ist TOLLIP (Melmed et al., 2003, Otte et al., 2004), das sowohl mit TLR4 als auch mit TLR2 assoziiert und somit die IRAK-Phosphorylierung unterbindet (Harton et al., 2002). Auch PPAR $\gamma$  ist neben verschiedenen zellulären Funktionen in der Lage, die Expression proinflammatorischer Gene sowie die Induktion einer experimentellen Colitis, zu verhindern (Desreumaux et al., 2001). Darüber hinaus hat die kommensale Flora via TLR4 einen Einfluss auf die Expression von PPAR $\gamma$  (Dubuquoy et al., 2003). Auch hier findet sich ein Erklärungsansatz für die geringen Zytokinkonzentrationen v. a. bei den mit *B. vulgatus* stimulierten Versuchsansätzen. So konnten Haller et al. (2003, 2002b) durch *B. vulgatus* zwar eine erhöhte RelA Phosphorylierung messen, jedoch konnte in den Versuchen dieser Arbeit weder eine erhöhte Zytokinkonzentrationen noch mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine gemessen werden. Dies könnte darin begründet sein, dass aufgrund der Interaktion des Endotoxins mit TLR4 vermehrt PPAR $\gamma$  exprimiert wurde und damit verbunden sich die Expression NF $\kappa$ B abhängiger proinflammatorischer Gene verringerte (Desreumaux et al., 2001). Als letztes regulatorisches Protein für NF $\kappa$ B ist das zinc finger protein A20 zu nennen (Beyaert et al., 2000), welches wie PPAR $\gamma$  durch einzelne Bakterien der Intestinalflora beeinflusst wird. So konnten Ruiz et al. (2005b) zeigen, dass *B. lactis* BB12, nicht aber *B. vulgatus* die mRNA Expression von A20 in Primärkulturen intestinaler

Epithelzellen sowie IEC Linien erhöht. Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringen Zytokinkonzentrationen bei Stimulation mit probiotischen Bakterien, *E. faecalis* und *Bacteroides* könnte eine durch unmethylierte CpG via TLR9 verursachte Immunsuppression sein (Rachmilewitz et al., 2004).

Auch auf Zytokinebene sind verschiedene Inhibierungsmechanismen im Gespräch. So entwickeln IL-10-defiziente Mäuse in einer SPF (specific pathogen free) Umgebung eine Colitis, während sie unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben. Dies zeigt zum einen, dass Antigene aus der kommensalen Mikroflora in der Lage sind einen Entzündungsprozess des Darmes auszulösen, es belegt aber auch, dass IL-10 massgeblich an der Vermeidung eines solchen beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IL-10-Konzentrationen im basolateralen Kompartiment bei Stimulation mit dem nichtpathogenen *E. coli* K12 nach 72 h deutlich angestiegen waren. Dabei steigt die Konzentration bis zu einem Maximum bei ca. 30 Stunden und bleibt dann konstant (Parlesak et al., 2004). Diese IL-10-Ausschüttung könnte ein Grund dafür sein, dass es durch *E. coli*, trotz der schnellen Freisetzung verschiedener proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine in diesem Modell, zu keiner chronischen Entzündung im gesunden GIT kommt. Neben IL-10 gilt auch TGF- $\beta$  als zentrales antiinflammatorisches Zytokin, da in zahlreichen Tierversuchen belegt werden konnte, dass TGF- $\beta$ -defiziente Tiere oder Tiere mit inhibiertem TGF- $\beta$  Signalweg eine Colitis entwickeln (Kulkarni et al., 1995, Hahm et al., 2001). Fuss et al. (2002) sowie Ruiz et al. (2005a) wiesen einen indirekten Effekt von IL-10 auf die TGF- $\beta$ -Sekretion in der Lamina propria nach und zeigten damit eine Wechselwirkung zwischen IL-10 und TGF- $\beta$  auf. Da aber außer bei *E. coli* K12 keine erhöhten Zytokinkonzentrationen gemessen werden konnten, ist die Ursache für die fehlende Immunreaktion bei probiotischen und kommensalen Bakterien nicht auf Ebene einer Stimulation der nachgeschalteten Regulation von Zytokinen angesiedelt.

Eine weitere Variante der Suppression der Zytokinausschüttung könnte durch das verwendete Modell aus basolateralen PBMCs und apikalen CaCo-2-Zellen vermittelt sein. So wurde bei direkter Stimulation der basolateralen PBMCs eine Hemmung der Zytokinausschüttung bei apikaler Anwesenheit von CaCo-2-Zellen gemessen (Parlesak et al., 2004). Dabei könnte es sich um eine Unterdrückung der Expression von PAMP-spezifischen Rezeptoren (CD14) durch CaCo2-Zellen in einem Kokulturmodell aus PBMCs und CaCo-2-Zellen handeln (Haller et al., 2002a). Außerdem bestätigt es die Theorie, dass die Immunantwort von IEC auf nicht pathogene kommensale Bakterien durch die darunterliegenden Lamina propria-Lymphozyten reguliert wird (Strober, 1998).

### 5.3 Stimulationspotentiale verschiedener *E. coli* sp. im Kokulturmodell

Da einzig *E. coli* K12 erhöhte Zytokinkonzentrationen in dem verwendeten Modell induzierte, sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern sich die Stimulationspotentiale probiotischer, apathogener und pathogener *E. coli* sp. unterscheiden. Die Integrität der CaCo-2 Monolayer blieb über den Zeitrahmen des Versuchs stabil. Erst nach 72 h stiegen die Permeabilitätswerte leicht an. Dies bestätigt die Ergebnisse von Canil et al. (1993), der bei Zugabe von EPEC einen Abfall der TEER Werte entlang einer CaCo-2 Monolayer messen konnte. Dieser Abfall konnte durch Zugabe von Antibiotika vermieden werden, was sich auch in den in dieser Arbeit gemessenen Daten widerspiegelt. Die von Philpott et al. (1996) beschriebene Verringerung des TEER und damit verbundene Erhöhung der Permeabilität bei der Inkubation von T84-Zellen mit EPEC ohne Antibiotikazugabe ist mit dem vorliegenden Versuchsaufbau mit Antibiotikazusatz nicht vergleichbar. Ursache für eine derartige Änderung des TEER kann nach McNamara et al. (2001) das durch EPEC produzierte EspF-Protein sein, welches ins Zellinnere der eukariotischen Zelle sekretiert wird. Auch Shifflett et al. (2005) sehen EspF als Ursache der frühen Zerstörung der Tight Junction-Barrierefunktion. Eine Änderung der Integrität der Epithelzellschicht konnte aber in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden.

Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen einzig auf die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen *E. coli* sp. zurückzuführen sind. Dabei zeigt sich, dass *E. coli* K12 zu allen Zeitpunkten die höchsten Konzentrationen an TNF- $\alpha$ , dicht gefolgt von *E. coli* Nissle, induziert. Der Zusatz von EPEC dagegen hat signifikant bis hochsignifikant geringere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zur Folge. Erstaunlich ist v. a. die starke TNF- $\alpha$ -Induktion durch *E. coli* Nissle, der als probiotisches Therapeutikum eingesetzt wird. Auch Hockertz (1991) konnte in Peritonealmakrophagen der C57 BL/6-Maus nach 24 stündiger Inkubation eine stärkere TNF- $\alpha$ -Sekretion bei Stimulatin mit abgetöteten *E. coli* Nissle messen als mit *E. coli* O111:B4 LPS. Ebenfalls eine Erhöhung der Expression proinflammatorischer Zytokine konnten Ukena et al. (2005) in CaCo-2-Zellen und im Mausmodell nachweisen. Die geringe TNF- $\alpha$  Ausschüttung aufgrund der Stimulation mit dem enteropathogenen *E. coli* EPEC ist erstaunlich, da zu erwarten war, dass EPEC zu besonders hohen Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen führt (Haller et al., 2000). Auch bei IL-10 und IFN- $\gamma$  induziert *E. coli* K12 im Vergleich zu den

anderen beiden *E. coli* spp. die höchste und EPEC die niedrigsten Zytokinkonzentrationen. Klapproth et al. (2000) konnten eine ähnlich niedrige, aber nicht signifikante Verringerung der Zytokinkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  durch EPEC im Vergleich zu einem kommensalen *E. coli* messen. Diese führen sie auf die Aktivität eines (LIF) lymphocyte inhibitory factors zurück (Klapproth et al., 2000). Bei IL-8 wurden bei Stimulation mit *E. coli* K12 ebenfalls die höchsten und bei EPEC die niedrigsten Konzentrationen unter den *E. coli* sp. gemessen. Wie bei TNF- $\alpha$  waren die Zytokinkonzentrationen bei Stimulation mit *E. coli* Nissle nur geringfügig niedriger als bei *E. coli* K12. Auch bei IL-6 wurden bei Stimulation mit EPEC die niedrigsten Konzentrationen gemessen, während *E. coli* Nissle zu den höchsten, allerdings nicht signifikant höheren Konzentrationen, als *E. coli* K12 führte. Hockertz (1991) konnte ebenfalls höhere IL-6-Konzentrationen bei Stimulation von Mäusemakrophagen mit *E. coli* Nissle als bei Stimulation mit *E. coli* O111:B4 LPS messen. Ausserdem wurden von Ukena et al. (2005) bei Stimulation von CaCo-2-Zellen mit *E. coli* Nissle eine um bis zu zehnfach erhöhte Expressionen an proinflammatorischen Molekülen wie MCP-1, MIP-2 $\alpha$  oder auch MIP-2 $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle gemessen, die sich auch in den Proteinkonzentrationen spiegeln.

DeGrado et al. (2001) zeigten, dass EPEC in der Lage ist, verschiedene Signaltransduktionswege anzuschalten und damit beispielsweise den erg1 (early growth response factor) (deGrado et al., 2001), eine IL-8 vermittelte Transmigration von PMN (Savkovic et al., 1996), aber auch eine NF $\kappa$ B-vermittelte IL-8-Sekretion zu induzieren (Savkovic et al., 1997). Allerdings sind die Zytokinausschüttungen bezüglich IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation mit EPEC zu den relevanten Zeitpunkten stets niedriger, als die von *E. coli* Nissle und *E. coli* K12 induzierten Zytokinkonzentrationen. Diese Hemmung der Zytokinausschüttung könnte, wie bereits erwähnt, durch Lymphostatin vermittelt sein (Klapproth et al., 2000), da aber die Bakterien vor dem Zusetzen in die Kokultur gewaschen wurden, und das im Basismedium enthaltene Antibiotikum die Proteinsynthese und somit die Synthese für Lymphostatin inhibiert, ist eine inhibierende Wirkung von Lymphostatin unwahrscheinlich. Nach Savkovic et al. (2001) ist jedoch die durch EPEC induzierte Signalweiterleitung zur Initiierung der Entzündungsreaktion unabhängig von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , aber ERK1/2 vermittelt. ERK1/2 ist aber nicht an der Zerstörung der intestinalen Barrierefunktion beteiligt (Savkovic et al., 2001).

## 5.4 Membranbestandteile als Ursache der Immunstimulation

Aufgrund der grossen Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen mit gram-positiven und unterschiedlichen gram-negativen Bakterien stimulierten Versuchsansätzen stellte sich die Frage nach den Ursachen. Da die Endotoxine der gram-negativen Bakterien zu den aktivsten Stimulanzen des menschlichen Immunsystems gezählt werden (Wiese et al., 1999), lag der Verdacht nahe, dass die gemessenen Unterschiede auf die verschiedenen Membranbestandteile zurückzuführen waren. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen der Membranbestandteile verschiedener gram-positiver, v. a. aber gram-negativer Bakterien mit den Wirkungen intakter Bakterien verglichen werden.

Im Bezug auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität ergaben sich hinsichtlich der Effekte der einzelnen Bakterien und Oberflächenbestandteilen keine Unterschiede. Auch bei der Permeabilität des Endotoxins waren keine Unterschiede zwischen den mit *E. coli* K12 und 1 µg/ml *E. coli* K12 LPS stimulierten Ansätzen zu messen. Für *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK wurden nach Stimulation mit dem Bakterium und 1 bis 10 µg/ml LPS vergleichbare Endotoxinpermeabilitäten quantifiziert, während bei Stimulation mit 100 µg/ml Endotoxin hochsignifikant höhere Permeabilitätsraten zu messen waren. Mit Erhöhung der apikalen Endotoxin-Konzentration permeierte aber auch relativ mehr LPS durch die CaCo-2 Monolayer. Dies könnte möglicherweise auf erhöhte basolaterale TNF-α-Konzentrationen zurückgeführt werden, die in der Lage sind, die parazelluläre Permeabilität der CaCo-2 Monolayer zu steigern (Ma et al., 2004). Zareie et al. (1998) zeigten darüber hinaus, dass diese epithelialen Veränderungen durch den Zusatz von TNF-α-Antikörpern verhindert werden können. Des Weiteren ist laut Sansonetti et al. (1999) auch IL-8 ein wichtiger Mediator bei der Entstehung epithelialer Schäden.

Aber auch bei den Zytokinkonzentrationen setzt sich der bei den Endotoxinpermeabilitäten gemessene Trend fort. Es waren keine Unterschiede in den basolateral gemessenen Zytokinkonzentrationen zwischen den mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml Bakterien und 1 bis 10 µg/ml des jeweiligen Endotoxins stimulierten Versuchsansätzen zu messen. Einzig die mit 100 µg/ml *B. vulgatus* LPS stimulierten Ansätze führten zu hoch signifikant höheren TNF-α- und IL-8-Konzentrationen. Bei *B. vulgatus* MPK ließen sich aber keine erhöhten Zytokinkonzentrationen, trotz erhöhter basolateraler Endotoxinmengen bei Stimulation mit 100 µg/ml *B. vulgatus* MPK LPS messen. Demnach ist LPS von *B. vulgatus* im Bioassay wesentlich weniger aktiv als beispielsweise LPS von *E. coli* K12. Diese Befunde deckten sich mit den Ergebnissen von Jotwani et al. (1994) und Poxton und Edmond (1995). Sie konnten

beim Vergleich verschiedener Endotoxine, isoliert aus verschiedenen *Bacteroides* sp. und eines *E. coli*, deutliche Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit messen. *E. coli* LPS führte dabei eindeutig zu den höchsten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Bioassay, während *B. vulgatus* LPS ein vergleichsweise geringes Stimulationspotential aufwies (Poxton und Edmond, 1995). Auch zwischen den einzelnen Endotoxinen von *Bacteroides* sp. konnten Poxton und Edmond (1995) deutliche Unterschiede messen. So induzierte *B. vulgatus* die geringste TNF- $\alpha$ -Antwort, während *B. fragilis* die gut siebenfache TNF- $\alpha$ -Konzentration in humanen mononukleären Lymphozyten bewirkte (Poxton und Edmond, 1995). Eine geringe, wenn nicht sogar supprimierte Antwort auf die Stimulation mit *B. vulgatus* MPK, lassen auch die Ergebnisse von Waidmann et al. (2003) vermuten, die zeigen konnten, dass *B. vulgatus* MPK IL-2-defiziente Mäuse vor einer *E. coli*-induzierten Colitis schützt. Dies widerspricht aber zahlreichen Publikationen, die *B. vulgatus* als Colitis Auslöser im Tiermodell (Rath et al., 1996) und beim Menschen (Bamba et al., 1995, Matsuda et al., 2000) postulieren. Aber nicht nur bei den gram-negativen Bakterien entspricht in der vorliegenden Studie die durch LPS ausgelöste Zytokinantwort derjenigen, die durch lebende Bakterien bewirkt wird. Auch bei dem gram-positiven *E. faecalis* werden bei Stimulation mit Bakterien genauso wenig Zytokine produziert, wie bei Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des LTA von *E. faecalis*. Ausserdem sind die dadurch induzierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nur ein Bruchteil der Konzentrationen, die Bhakdi (1991) bei Stimulation von Monozyten mit *E. faecalis* LTA (0,5-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) messen konnte. Sie zeigten, dass die Lipoteichonsäure von *E. faecalis* in der Lage war, eine ähnlich starke TNF- $\alpha$ -Ausschüttung (im Bereich von 5000-7000 pg/ml) bei menschlichen Monozyten zu induzieren wie LPS von *E. coli* 055:B4. Auch den Ergebnissen von Bruserud et al. (2004) widersprechen den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Bruserud et al. (2004) konnten im Mittel bei Stimulation von humanen PBMC mit LTA von *E. faecalis* eine Erhöhung der IL-1 $\beta$ - und IL-8-Konzentrationen messen. Laut den Autoren ist aber eine Kontamination des verwendeten LTA mit Endotoxin auszuschliessen (Gao et al., 2001), so dass dieser Unterschied nur auf die im verwendeten Kokulturmodell vorhandene Enterozytenschicht zurückgeführt werden kann, die einen direkten Kontakt des LTA mit PBMC unterbindet. Dies widerspricht aber den mittels direkter Stimulation von PBMC generierten Daten, bei denen durch Stimulation mit 2, 20, 200 und 2000 pg/ml *E. faecalis* LTA keine erhöhten Zytokinkonzentrationen gemessen werden konnten. Ausserdem konnten keine Unterschiede zwischen den durch direkte

Stimulation induzierten Zytokinkonzentrationen und den im Kokulturmodell durch apikale Stimulation mit 1, 10 und 100 µg/ml *E. faecalis* LTA induzierten Zytokinkonzentrationen gemessen werden.

Zur Bestätigung, dass LPS die Ursache der gemessenen Immunantwort ist, wurden Versuche durchgeführt, in denen via verschiedener Endotoxin-neutralisierender-Substanzen das apikal zugegebene Endotoxin durch gleichfalls apikalen Zusatz neutralisiert wurde. Die Neutralisierung von LPS erfolgte mittels Polymyxin B und Colistin. Dabei binden die kationischen Peptide mit hoher Affinität an Lipid A und neutralisieren so dessen endotoxische Effekte (Warner et al., 1985). Aufgrund seiner negativen Ladung ist LPS der optimale Bindungspartner für diese polykationischen Peptide (Brandenburg et al., 2004), Polymyxin inhibierte damit sofort die NFκB-Aktivierung, so dass die TNF-α-Sekretion durch die PBMCs verhindert wurde (Tsuzuki et al., 2001; Yang et al., 2003). Tsuzuki et al. (2001) zeigten ausserdem, dass eine Inkubation von PBMC mit Polymyxin B, welches in höheren Konzentrationen pyrogen wirksam ist, in einer Konzentration von 10 µg/ml keine Erhöhung der TNF-α-Bildung zur Folge hat.

Diese Endotoxin-neutralisierende Wirkung der Polymyxine konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So inhibierte der apikale Zusatz von Colistin bzw. Polymyxin B in einer Konzentration von je 10 µg/ml die die basolaterale Ausschüttung von TNF-α und IL-8 in Gegenwart von Endotoxin aus *E. coli* K12 (1 µg/ml) in mit Leukozyten kokultivierten CaCo-2-Zellen. Dieses Inhibition der Zytokinausschüttung bestätigt die Annahme, dass permeierendes LPS die wichtigste Ursache der Zytokinausschüttung im Kokulturmodell ist.



## 5.5 Vergleich der immunologischen Bioaktivität des LPS der *Bacteroides* sp. mit der von *E. coli* K12 bzw.

### *S. Typhimurium*

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Endotoxin von *E. coli* K12 deutlich stärkere Zytokinausschüttungen induzierte als die LPS der beiden *Bacteroides* sp.. Eine mögliche Ursache könnte die unterschiedliche Struktur des Lipid A sein, welches für die immunbiologische Aktivität der Endotoxine verantwortlich gemacht wird (Kotani et al., 1985; Westphal et al., 1954; Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1987). Diese grossen Unterschiede im Bezug auf die Aktivierung immunologischer Parameter durch Endotoxine verschiedener Bakterien bekräftigt die Ergebnisse diverser Publikationen, dass unter allen bisher untersuchten natürlichen oder synthetischen Lipid A Strukturen diejenige von *E. coli* (und anderen Enterobacteriaceae) das Spektrum endotoxischer Aktivitäten optimal induziert und damit die höchste biologische Aktivität aufweist (Mayer et al., 1990; Takada et al., 1988). Deshalb wird diese Struktur von Rietschel et al. (1991, 1994) auch als „endotoxic conformation“ bezeichnet. Sowohl *E. coli* K12 als auch *S. Typhimurium* verfügen über ein Lipid A mit genau dieser Struktur. Es besteht aus einem  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) D-Glucosamin-Disaccharid-Rückgrat, an welchem 2 negativ geladene Phosphatgruppen (Positionen C4' und C1) hängen und besitzt ein definiertes Fettsäuremuster (Loppnow et al., 1989; Feist et al., 1989; Seydel, 1994; Takada et al., 1988, Zähringer et al., 1994). Jegliche Variation dieser Komposition führt zu partiellem oder totalem Verlust dieser biologischen Aktivität (Mayer et al., 1990; Müller-Loennies et al., 1998; Rietschel et al., 1991 und 1994).

Die geladenen Phosphatgruppen im Lipid A sind verantwortlich für die optimale Zytokininduktion (Rietschel et al., 1987; Schromm et al., 1998; Takada et al., 1988 und 1992). So führt die Substitution des  $\alpha$ -anomeren Phosphates durch ein  $\beta$ -anomerer Phosphat bzw. das vollständige Fehlen einer Phosphatgruppe zu einem Bioaktivitätsverlust um den Faktor  $10^4$  bzw.  $10^2$  (Müller-Loennies et al., 1998; Rietschel et al., 1994). Besteht das Rückgrat des Lipid A aus einem Monosaccharid, bleibt die endotoxische Aktivität so gut wie aus (Aktivitätsreduktion um den Faktor  $10^7$ ) (Aschauer et al., 1990). Auch Änderungen in der lipophilen Region, ausgehend vom für die Stimulation optimalen Lipid A, haben deutliche Effekte. So führen das Entfernen einer Acylkette, wodurch ein penta-acyliertes Lipid A entsteht, sowie der Zusatz einer Acylkette (Hepta-acyl Lipid A) zu einem Bioaktivitätsverlust um den Faktor  $10^2$ . Werden gar 2 Acylketten entfernt (tetra-acyliertes Lipid A), fehlt jegliche

Mediator-induzierende Fähigkeit. Nicht nur das Entfernen bzw. Zufügen von Acylketten, sondern auch deren Dislokation, wodurch z.B. eine symmetrische Verteilung entsteht, reduzieren die Bioaktivität des Moleküls um den Faktor  $10^4$  (Müller-Loennies et al., 1998; Rietschel et al., 1994). Sowohl das Fehlen einer Phosphatgruppe an Position C4' im Lipid A von *B. fragilis* als auch das Vorhandensein eines Penta-Acylierungsmusters bedingen somit die schwache biologische Aktivität der *Bacteroides*-Endotoxine in den vorliegenden Versuchen. Weitere bioaktivitätsreduzierende Faktoren sind die vergleichsweise langkettigen Acylketten des *Bacteroides*-Lipid A, die teilweise isoverzweigt sind und sich damit von denen des „optimalen“ Lipid A deutlich unterscheiden (Lindberg et al., 1990).

In den Direktstimulationen der PBMC mit den Endotoxinen von *B. vulgatus* und *E. coli* K12 in einer jeweiligen Konzentration von 2 pg/ml, 20 pg/ml, 200 pg/ml bzw. 2000 pg/ml induzierte das *E. coli* K12 LPS eine maximal um den Faktor 640 bzw. 13 höhere TNF- $\alpha$ - bzw. IL-8-Konzentration, als die im Ansatz mit *B. vulgatus* LPS. Die Bioaktivitäten der beiden Endotoxine unterscheiden sich demnach nicht so stark, wie es die Publikationen von Rietschel et al. (1994) und Müller-Loennies et al. (1998) hätten vermuten lassen. Um allerdings einen genauen Vergleich anstellen zu können, hätte in den Versuchen anstelle gleicher LPS-Konzentrationen dieselben Mengen an reinem Lipid A der beiden Bakterien eingesetzt werden müssen.

Obwohl das Lipid A von *E. coli* K12 und *S. Typhimurium* die gleiche „optimale“ Struktur aufweist, wurden bei einem Zusatz von jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in den Ansätzen mit *E. coli* K12 LPS deutlich höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im basolateralen Kompartiment der Kokultur gemessen.

Ein möglicher Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass *E. coli* K12 LPS zum Typ „semi-rough“ gehört, also nur über eine sehr kurze unpolare O-spezifische Kette verfügt, was mittels SDS-PAGE bestätigt werden konnte. Das somit insgesamt vergleichsweise kleinere Molekül kann nach apikaler Zugabe möglicherweise besser durch die CaCo-2 Monolayer ins basolaterale Kompartiment permeieren, in welchem sich die Leukozyten befinden, als das LPS von *S. Typhimurium*. Bei letzterem handelt es sich um ein so genanntes „Wildtyp-LPS“, das z. T. über eine sehr lange O-spezifische Kette verfügt und somit möglicherweise nur schwer durch die Enterozytenschicht der Kokultur ins basolaterale Medium gelangen kann. Diese Annahme konnte durch die Messung der basolateralen LPS-Konzentrationen nach apikaler Zugabe der Endotoxine von *E. coli* K12 bzw. *S. Typhimurium* (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bekräftigt

werden. So waren die basolateralen Konzentrationen von *E. coli* K12 LPS hoch signifikant höher als die des *S. Typhimurium* LPS. Außerdem bedingt die Anwesenheit einer O-spezifischen Kette im LPS von *S. Typhimurium* eine höhere Molmasse und somit einen kleineren prozentualen Stoffmengenanteil des endotoxisch aktiven Lipid A (Kotani et al., 1985; Westphal et al., 1954; Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1987) am Gesamtmolekül, was eine weitere Erklärung für die unterschiedliche immunbiologische Aktivität der in gleichen Konzentrationen eingesetzten Endotoxine von *E. coli* K12 und *S. Typhimurium* sein könnte. Dies konnte mit Hilfe einer Lipid A Quantifizierung mittels HPLC belegt werden. Die Aussagekraft der Quantifizierung des Lipid A Anteils der Endotoxine von *E. coli* K12 und *S. Typhimurium* ist leider eingeschränkt, da die Signalstärken geringer waren als erwartet und sich an der Nachweisgrenze befanden.

Große Unterschiede im Stimulationspotential der Endotoxine ergaben sich aber in den durchgeführten Versuchen v. a. zwischen den LPS von *B. vulgatus* sowie *B. vulgatus* MPK mit einem sehr schwachen endotoxisch aktivem Verhalten und dem LPS von *E. coli* K12. Auch diesen Unterschieden könnte eine unterschiedliche Lipid A Struktur zu Grunde liegen. Aber nicht nur zwischen den Endotoxinen von *E. coli* K12 und *B. vulgatus* sind Unterschiede erkennbar, sondern auch zwischen den einzelnen *B. vulgatus* Stämmen. So induzierte beispielsweise LPS von *B. vulgatus* bei Stimulation mit 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung der TNF-α-Konzentration, die mit der gleichen Konzentration des Endotoxins von *B. vulgatus* MPK nicht messbar war. Ein vergleichbares Ergebnis konnte auch bei direkter Stimulation von PBMCs mit einer Konzentration von 2000 pg/ml mit den beiden *B. vulgatus*-Endotoxinen gemessen werden. Eine mögliche Erklärung könnten auch hier die im SDS-PAGE Gel erkennbar längeren O-spezifischen Ketten des *B. vulgatus* MPK Endotoxins sein, die eine höhere Molmasse dieses Endotoxins bedingen. Auch bei der Quantifizierung des (apikal zugegebenen) LPS im basolateralen Medium sind die Konzentrationen in den Ansätzen mit *B. vulgatus* deutlich über denen von *B. vulgatus* MPK. Dies lässt den Schluss zu, dass das im Schnitt niedermolekulare *B. vulgatus* LPS nach apikaler Zugabe besser durch die CaCo-2 Monolayer permeieren kann als das von *B. vulgatus* MPK. Außerdem bedingt eine höhere Molmasse des LPS Moleküls einen kleineren prozentualen Anteil des endotoxisch aktiven Lipid A (Kotani et al., 1985; Westphal et al., 1954; Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1987) am Gesamtmolekül. Dies konnte bei der Lipid A Messung leider nicht bestätigt werden, da die zu messenden Konzentrationen an der unteren Nachweisgrenze der Methode lagen.

## 5.6 Weg der Aktivierung im Kokulturmodell - vermitteln Enterozyten die Aktivierung von kokultivierten Lymphozyten?

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenbestandteile der einzelnen Bakterien die Hauptursache für die ihnen eigene Immunreaktion ist. Allerdings ist nicht klar, ob die intestinalen Epithelzellen oder die darunter liegenden Lymphozyten die entsprechende Immunantwort auslösen. Anatomisch betrachtet bilden die Epithelzellen die Aussenfläche, die mit sämtlichen Stimulantien in Kontakt kommt und die damit primär als Auslöser einer Immunreaktion in Frage kommen (Mowat et al., 2003, Eckmann et al., 1993). Rasmussen et al. (1997) zeigten, dass die akute Immunantwort bei Chlamydieninfektionen an mucosalen Oberflächen primär durch die intestinalen Epithelzellen initiiert und aufrechterhalten wird. Dagegen war nur eine sehr geringe bzw. keine Immunreaktion bei CaCo-2-Zellen ohne basolaterale PBMC zu messen (Parlesak et al., 2004). Allerdings konnten beim Vergleich einer direkten Stimulation der humanen PBMC und dem angewandten Kokulturmodell aus Enterozyten und humanen PBMC, bei vergleichbaren Mengen an in der direkten Simulation sowie im basolateralen Kompartiment gemessenem Endotoxin, keine Unterschiede in der Zytokinantwort gemessen werden. Auffällig ist jedoch, dass die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-8 im Kokulturmodell zwar nicht signifikant, aber tendenziell höher war. Dies zeigt sich v. a. bei den mit dem Endotoxin der *Bacteroides* sp. stimulierten Versuchsansätzen und lässt möglicherweise auf eine Beteiligung der CaCo-2-Zellen an der Vermittlung der Zytokinantwort, wie sie von Rasmussen et al. (1997) gezeigt wurde, schliessen. Zur genaueren Spezifizierung der ursächlich an der Zytokinantwort beteiligten Zellen wurden im Kokulturmodell dem basolateralen Medium die Endotoxin bindenden Proteine Polymyxin B und Colistin zugesetzt. Sowohl durch Polymyxin B als auch durch Colistin konnte eine TNF- $\alpha$ -Ausschüttung vollständig unterdrückt werden (Reduktion um ca. 99,9%). Die IL-8-Bildung blieb zu 5 bis 10 % trotz der LPS-bindenden Proteine erhalten, was möglicherweise auf die auch in unstimulierten Zellen reativ hohe IL-8-Basisausschüttung der PBMCs zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass der basolaterale Einsatz von Colistin und Polymyxin B die durch *E. coli* K12 LPS induzierte Zytokinausschüttung hoch signifikant hemmte, bekräftigt die Hypothese, dass apikal zugegebenes Endotoxin, welches durch die Enterozytenschicht permeiert, nahezu ausschließlich für die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$  und IL-8) verantwortlich ist. Eine mittelbare

Stimulation der Leukozyten durch aktivierte Enterozyten ist demnach unwahrscheinlich. Die Messung der IL-8-mRNA-Konzentrationen mittels qRT-PCR zeigt zwar Unterschiede in der IL-8-Expression der CaCo-2-Zellen nach 12 stündiger Inkubation, jedoch war der Hauptanteil der IL-8-Zytokinmengen im Kokulturmodell eindeutig auf die von den PBMC exprimierte mRNA zurückzuführen. Auch Parlesak et al. (2004) konnten eine deutliche Steigerung der mRNA Expression v. a. in CaCo-2-Zellen, aber auch PBMCs nach 12 stündiger Inkubation eines CaCo-2/PBMC Kokulturmodells stimuliert mit *E. coli* K12 nachweisen, stellten aber gleichzeitig auch heraus, dass wie in den Versuchen dieser Arbeit die IL-8-mRNA Konzentrationen in Leukozyten, erheblich höher waren. Betrachtet man den Zeitpunkt, an dem die Steigerung der IL-8-mRNA Expression erfolgt, so ist nach 4 h bei CaCo-2-Zellen noch keinerlei Anstieg zu verzeichnen, während sich bei den PBMC bereits ein Trend zu einer höheren IL-8-mRNA Expression als in der Negativkontrolle abzeichnet. Diese Datenlage lässt für *E. coli* K12 als Stimulans darauf schliessen, dass die in diesem Modell gemessene Zytokinausschüttung auf die Induktion durch PBMC zurückzuführen ist und CaCo-2-Zellen erst sekundär, möglicherweise durch die von den Leukozyten ausgeschütteten Zytokine, stimuliert werden.

## 5.7 Inhibierung der durch *E. coli* K12 verursachten Immunstimulation durch Kostimulation mit nicht stimulierenden Bakterien

In diversen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien wurde bei Patienten, erkrankten Versuchstieren oder mittels stimulierender Substanzen sensibilisierter Zellen, eine Senkung der Ausschüttung proinflammatorischer bzw. eine Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine durch Gabe von probiotischen oder nicht stimulierenden kommensalen Bakterien gemessen (Madsen et al., 2001, Frick et al., 2006, Schultz et al., 2004, Majamaa et al., 1997, Ménard et al., 2004). Dies lässt den Schluss zu, dass nur aktivierte Darmepithelzellen sensibel für die entzündungsprotektive Wirkung gram-positiver probiotischer Bakterien sind. Aus diesem Grund wurden Experimente durchgeführt, in denen mit *E. coli* K12 bzw. dessen Endotoxin stimuliert wurde und parallel in den vorangegangenen Versuchen immunologisch inaktive Bakterien bzw. deren Membranbestandteile zugesetzt wurden. Beim parallelen Zusatz von Bakterien konnten sowohl durch *B. bifidum*, *Lb. rhamnosus* als auch dem gram-negativen *B. vulgatus* keine Hemmung der proinflammatorischen Zytokine gemessen werden. Auch die Integrität der Zellschicht blieb unverändert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ménard et al. (2004), der eine dosisabhängige Inhibierung der durch LPS induzierten TNF- $\alpha$  Sekretion in einem Kokulturmodell aus HT29 19A Zellen und mit Endotoxin stimulierten PBMCs durch Laktobacillen messen konnte. Auch *B. breve* führte in selbigem Modell zu einer Steigerung der Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 und Pena et al. (2003) konnten eine Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Sekretion durch *Lb. rhamnosus* messen. Auch diese Hemmung durch *Lb. rhamnosus* GG konnte in den Versuchen dieser Arbeit weder bei einfacher noch bei zehnfacher Laktobacillenkonzentration im Verhältnis zur *E. coli* Menge bestätigt werden. Die von Gill et al. (2000) gemessene Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration in stimulierten Mäusemilzzellen bei Fütterung mit *Lb. rhamnosus* und *Lb. acidophilus* konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch verringerte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen sowie eine Steigerung der mRNA des antiinflammatorischen IL-10, wie sie von Cui et al. (2004) bei Colitis Ulcerosa Patienten durch die Behandlung mit einem probiotischen Präparat aus Enterococccen, Bifidobakterien und Laktobacillen erzielt wurde, konnte nicht gemessen werden (Cui et al., 2004). Jedoch konnten auch Spanhaak et al. (1998) in einer Humanstudie keinen Einfluss der Supplementierung mit *Lb. casei* shirota auf die Immunparameter (NK-Zellaktivität, Phagozytoseleistung oder Zytokinproduktion) gesunder Probanden messen. Auch die in Analogie durch *B. vulgatus* zu erwartende Hemmung einer *E. coli*-induzierten

Colitis in IL-2-defizienten Mäusen (Waidmann et al., 2003) konnte in dem angewandten *in-vitro*-Modell mit *B. vulgatus* nicht bestätigt werden. Dies könnte aber auf ein im Versuch eingesetztes ungünstiges Verhältnis der beiden kommensalen Darmkeime zurückzuführen sein, da *B. vulgatus* mit ca.  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  KBE/g in deutlich höheren Keimzahlen in den Fäces auftritt als *E. coli* (Coliforme:  $10^4$  bis  $10^{10}$  KBE/g) (Simon et al., 1984). Aus diesem Grund wäre eine Wiederholung des Versuchs mit deutlich mehr *B. vulgatus* im Verhältnis zum stimulierenden *E. coli* sinnvoll. Des weiteren stellt sich die Frage, ob die nicht-stimulierenden bzw. die Immunreaktion hemmenden Bakterien nicht bereits deutlich vor der Stimulation mit *E. coli* dem Modell zugesetzt werden müssten. So wird beispielsweise die verringerte Anzahl an Diarrhoen bei Kindern nur durch eine präventive Supplementierung mit probiotischen Bakterien erzielt (Saavedra et al., 1994).

Die von Waidmann et al. (2003) publizierte Hemmung der *E. coli*-induzierten Colitis durch *B. vulgatus* MPK wirft die Frage auf, ob auch das isolierte LPS von *B. vulgatus* MPK bzw. *B. vulgatus* genauso wie das Endotoxin von *E. coli* K12 die Ursache für deren immunologische Aktivität ist und damit in der Lage ist, die endotoxische Aktivität von *E. coli* K12-LPS im Kokulturmodell zu inhibieren. In diesen Experimenten konnte keine signifikante Verringerung der Zytokinkonzentrationen durch Zusatz verschiedener Konzentrationen von *B. vulgatus* bzw. *B. vulgatus* MPK LPS zum mittels *E. coli* K12 LPS stimulierten Kokulturmodell gemessen werden. Dennoch zeigt sich im Trend mit zunehmender Konzentration des *B. vulgatus* bzw. *B. vulgatus* MPK Endotoxins eine Hemmung der *E. coli* K12-LPS-induzierten Zytokinausschüttung. Bei  $100 \mu\text{g/ml}$  *B. vulgatus* MPK Endotoxin kommt es sogar zu einer signifikanten Hemmung der durch LPS von *E. coli* K12 hervorgerufenen TNF- $\alpha$ -Ausschüttung. Die Ergebnisse von Waidmann et al. (2003) konnten somit im Bezug auf das Endotoxin von *B. vulgatus* MPK nicht eindeutig bestätigt werden. Denkbar wäre, dass eine weitere Erhöhung der *Bacteroides*-LPS-Konzentration (bei gleich bleibender *E. coli* K12-LPS-Konzentration) zu einer deutlicheren Hemmung der immunbiologischen Aktivität von *E. coli* K12 LPS führen würde. Leider ist in den Arbeiten von Waidmann et al. (2003) das Verhältnis der kokolonisierten Keime in den IL-2-defizienten Mäusen nicht bestimmt worden, welches eine Abschätzung der notwendigen einzusetzenden LPS Verhältnisse ermöglichen würde. Im Fäzes des Menschen sind aber *B. vulgatus* ca. 30mal so häufig vorhanden wie *E. coli* (Moore et al., 1974), so dass auf die Verhältnisse im Kokulturmodell übertragen, die eingesetzte Endotoxinmenge von *Bacteroides* ausreichend gewesen sein müsste, um eine Hemmung hervorzurufen, die auch unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung ist.

## 5.8 Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften des gram-negativen *E. coli* Nissle und der gram-positiven probiotischen Bakterien

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen kein einheitliches Zytokinmuster durch Stimulation mit probiotischen Bakterien. So führen gram-positive probiotische Bakterien in einem Kokulturmodell aus auf Transwell-Filtern kultivierten CaCo-2-Zellen und basolateralen PBMCs nicht zu einer signifikanten Aktivierung immunkompetenter Zellen. Damit konnten die Ergebnisse von Haller et al. (2000) und Riedel et al. (2006), die durch den Zusatz des probiotischen *Lb. johnsonii* bzw. verschiedene *Bifidobakterien* sp. ebenfalls keine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine in diesem Modell messen konnten, bestätigt werden. Allgemein unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass gram-positive probiotische Bakterien nicht zu einer Erhöhung der Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder IL-8 führen (Otte und Podolsky, 2004; Menard et al., 2004, McCracken et al., 2002). Der gram-negative, probiotische *E. coli* Nissle hat dagegen in selbigem Kokulturmodell sogar eine stärkere Aktivierung der immunkompetenten Zellen zur Folge als der enteropathogene *E. coli* EPEC. Dies bestätigt die Ergebnisse von Ukena et al. (2005), die ebenfalls eine Steigerung der Expression proinflammatorischer Zytokine durch *E. coli* Nissle in CaCo-2-Zellen und im Mausmodell zeigen konnte. Somit erfolgt die probiotische Immunmodulation an der unstimulierten Mucosa nicht über eine Veränderung der Expression von inflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10 oder IFN- $\gamma$ .



## 6 Ausblick

Eine Hemmung der durch *E. coli* K12 bzw. LPS von *E. coli* K12 hervorgerufenen entzündungsspezifischen Reaktionen von immunkompetenten Zellen durch die probiotischen *Lb. rhamnosus* und *B. bifidum* sowie den kommensalen *B. vulgatus* konnte nicht gemessen werden. Bei Kostimulation mit den Endotoxinen von *B. vulgatus* und *B. vulgatus* MPK war zwar keine signifikante Verringerung der Zytokinkonzentrationen messbar, dennoch zeigte sich im Trend mit zunehmender Konzentration des Endotoxins eine Hemmung der *E. coli* K12-LPS-induzierten Zytokinausschüttung. Um diese Ergebnisse zu festigen, wären jedoch noch weitere Untersuchungen nötig. Interessant wäre dabei eine vorherige Konditionierung des Modells, um eine präventive Wirkungen von probiotischen Bakterien zu zeigen. Dabei könnte das Modell mit probiotischen und nicht-stimulierenden Bakterien aber auch Endotoxinen von *Bacteroides* vor der Stimulation konditioniert werden. Eine derartige Hemmung einer überschießenden Immunreaktion durch probiotische Bakterien könnte eine Ursache für die Erfolge von Probiotika-Gaben bei infektiösen Diarrhoen (Van Niel et al., 2002; Huang et al., 2002; Szajewska et al., 2001a;), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Mimura et al., 2004; Gionchetti et al., 2003; Gionchetti et al., 2000; Venturi et al., 1999; Bibiloni et al., 2005; Ishikawa et al., 2003; Waidmann et al., 2003) aber auch atopischen Erkrankungen (Kalliomaki et al., 2001, 2003; Rosenfeldt et al., 2003) sein.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrams GD.** Impact of the intestinal microflora on intestinal structure and function. In: Hentges, DJ. ed. Human Intestinal Microflora in Health and Disease. New York.; Academic Press, 1983; 291-310.
- Abrams, G.D. and J.E. Bishop.** Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1967; 126: 301-304.
- Aderem, A.A.** How cytokines signal messages within cells. J.Infect.Dis. 1993; 167 (Suppl) 1: S2-7.
- Akira, S. and K. Takeda.** Toll-like receptor signalling. Nat.Rev.Immunol.2004; 4(7): 499.-511.
- Alberts B, A. Johnson, J. Lewis, M . Raff, K. Roberts, P. Walter.** Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, WILEY-VCH-Verlag, 2004.
- Anderson, K.V.** Toll signaling pathways in the innate immune response. Curr.Opin.Immunol. 2000; 12 (1): 13-19.
- Aschauer, H., A. Grob, J. Hildebrandt, E. Schuetze, and P. Stuetz.** Highly purified lipid X is devoid of immunostimulatory activity. Isolation and characterization of immunostimulating contaminants in a batch of synthetic lipid X. J.Biol.Chem. 1990; 265: 9159-9164.
- Autenrieth, I.B.** Das darmassoziierte Immunsystem: Grundlagen und Bedeutung für Wirt-Erreger-Interaktion. In: Hacker, J. and W. Kruis. ed. Darmflora in Symbiose und Pathogenität. Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., 2000; 83-90.
- Balish, E. and T. Warner.** Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. Am.J.Pathol. 2002; 160 (6): 2253-2257.
- Bamba, T., H. Matsuda, M. Endo, and Y. Fujiyama.** The pathogenic role of Bacteroides vulgatus in patients with ulcerative colitis. J.Gastroenterol. 1995; (30) Suppl 8: 45-47.
- Bausserman, M. and S. Michail.** The use of Lactobacillus GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. J.Pediatr. 2005; 147 (2): 197-201.
- Beagley, K.W., J.H. Eldridge, F. Lee, H. Kiyono, M.P. Everson, W.J. Koopman, T. Hirano, T. Kishimoto, and J.R. McGhee.** Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. J.Exp.Med. 1989; 169: 2133-2148.
- Begley, M., C.G. Gahan, and C. Hill.** The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol.Rev.2005. 29 (4):625-651.
- Bellone, G., M. Aste-Amezaga, G. Trinchieri, and U. Rodeck.** Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. J.Immunol. 1995; 155: 1066-1073.
- Berg, D.J., N. Davidson, R. Kuhn, W. Muller, S. Menon, G. Holland, L. Thompson-Snipes, M.W. Leach, and D. Rennick.** Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. J.Clin.Invest. 1996; 98: 1010-1020.

- Berg, R.D.** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends.Microbiol.* 1995; 3: 149-154.
- Berg, R.D.** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1999; 473:11-30.
- Bernet, M.F., D. Brassart, J.R. Neeser, and A.L. Servin.** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl.Environ.Microbiol.* 1993; 59: 4121-4128.
- Bernet, M.F., D. Brassart, J.R. Neeser, and A.L. Servin.** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ.Microbiol.* 1993; 59: 4121-4128.
- Beutler, B.** Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr.Opin.Immunol.*2000; 12 (1)::20-26.
- Beutler, B., D. Greenwald, J.D. Hulmes, M. Chang, Y.C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami.** Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 1985; 316: 552-554.
- Beyaert, R., K. Heyninck, and S. Van Huffel.** A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem.Pharmacol.*2000; 60 (8): 1143-1151.
- BgVV.** Abschlussbericht der Arbeitsgruppe „probiotische Mikroorganismenkulturen“ am BgVV. Oktober 1999.
- Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer.** Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect.Immun.* 1991; 59: 4614-4620.
- Bibiloni, R., R.N. Fedorak, G.W. Tannock, K.L. Madsen, P. Gionchetti, M. Campieri, C. De Simone, and R.B. Sartor.** VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am.J.Gastroenterol.*2005; 100 (7): 1539-1546.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard.** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 1997; 15:749-795.
- Bonen, D.K., Y. Ogura, D.L. Nicolae, N. Inohara, L. Saab, T. Tanabe, F.F. Chen, S.J. Foster, R.H. Duerr, S.R. Brant, J.H. Cho, and G. Nunez.** Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology.*2003; 124 (1): 140.-146.
- Bonfield, T.L., M.W. Konstan, P. Burfeind, J.R. Panuska, J.B. Hilliard, and M. Berger.** Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995; 13: 257-261.
- Bousvaros, A., S. Guandalini, R.N. Baldassano, C. Botelho, J. Evans, G.D. Ferry, B. Goldin, L. Hartigan, S. Kugathasan, J. Levy, K.F. Murray, M. Oliva-Hemker, J.R. Rosh, V. Tolia, A. Zholudev, J.A. Vanderhoof, and P.L. Hibberd.** A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus GG* versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.*2005; 11 (9): 833.-839.

- Brade, H., L. Brade, and E.T. Rietschel.** Structure-activity relationships of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). Current and future aspects. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A.]*. 1988; 268: 151-179.
- Brandenburg, K. and A. Wiese.** Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr.Top.Med.Chem.* 2004; 4 (11): 1127-1146.
- Brandtzaeg, P., E.S. Baekkevold, and H.C. Morton.** From B to A the mucosal way. *Nat.Immunol.* 2001; 2 (12): 1093-1094.
- Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen.** Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol.Rev.* 2005; 206: 32-63.
- Brandtzaeg, P.** Review article: Homing of mucosal immune cells-a possible connection between intestinal and articular inflammation. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 1997; (11) Suppl 3: 24-37; discussion 37-39.
- Brandtzaeg, P.** Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev.* 1998; 56: S5-18.
- Brigidi, P., B. Vitali, E. Swennen, G. Bazzocchi, and D. Matteuzzi.** Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res.Microbiol.* 2001; 152 (8): 735-741.
- Brown, J.P.** Role of gut bacterial flora in nutrition and health: a review of recent advances in bacteriological techniques, metabolism, and factors affecting flora composition. *CRC Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* 1977; 8: 229-336.
- Bruserud, O., O. Wendelbo, and K. Paulsen.** Lipoteichoic acid derived from *Enterococcus faecalis* modulates the functional characteristics of both normal peripheral blood leukocytes and native human acute myelogenous leukemia blasts. *Eur.J.Haematol.* 2004; 73 (5): 340-350.
- Canil, C., I. Rosenshine, S. Ruschkowski, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, and B.B. Finlay.** Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect.Immun.* 1993; 61: 2755-2762.
- Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky.** Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology.* 2004; 127 (1): 224-238.
- Cario, E., D. Brown, M. McKee, K. Lynch-Devaney, G. Gerken, and D.K. Podolsky.** Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am.J.Pathol.* 2002; 160 (1): 165-173.
- Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky.** "For whom the bell tolls!" -- innate defense mechanisms and survival strategies of the intestinal epithelium against luminal pathogens. *Z. Gastroenterol.* 2002; 40 (12): 983-990.
- Cario, E.** Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 2005; 54 (8): 1182-1193.

- Caroff, M. and D. Karibian.** Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr.Res.* 2003 ; 338 (23): 2431.-2447.
- Cayphas, S., J. Van Damme, A. Vink, R.J. Simpson, A. Billiau, and J. Van Snick.** Identification of an interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection. *J.Immunol.* 1987; 139: 2965-2969.
- Cebra, J.J.** Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am.J.Clin.Nutr.* 1999; 69: 1046S-1051S.
- Chomarat, P., M.C. Rissoan, J. Banchereau, and P. Miossec.** Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J.Exp.Med.* 1993; 177: 523-527.
- Chow, J.C., D.W. Young, D.T. Golenbock, W.J. Christ, and F. Gusovsky.** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 10689-10692.
- Cohen, J.** The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002; 420: 885-891.
- Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri.** Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001; 97 (10): 3146-3151.
- Corthesy, B., H.R. Gaskins, and A. Mercenier.** Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J.Nutr.* 2007.Mar.;137.(3.Suppl.2.):781S.-90S. 137: 781S-790S,
- Cremonini, F., S. Di Caro, E.C. Nista, F. Bartolozzi, G. Capelli, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini.** Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2002 ; 16 (8): 1461-1467.
- Cui, H.H., C.L. Chen, J.D. Wang, Y.J. Yang, Y. Cun, J.B. Wu, Y.H. Liu, H.L. Dan, Y.T. Jian, and X.Q. Chen.** Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J.Gastroenterol.* 2004; 10 (10): 1521.-1525.
- Cummings, J.H., J.M. Antoine, F. Azpiroz, R. Bourdet-Sicard, P. Brandtzaeg, P.C. Calder, G.R. Gibson, F. Guarner, E. Isolauri, D. Pannemans, C. Shortt, S. Tuijtelaars, and B. Watzl.** PASSCLAIM--gut health and immunity. *Eur.J.Nutr.* 2004; 43 (Suppl. 2): II118.-II173.
- D'Souza, A.L., C. Rajkumar, J. Cooke, and C.J. Bulpitt.** Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* 2002; 324 (7350): 1361.
- Daftarian, P.M., A. Kumar, M. Kryworuchko, and F. Diaz-Mitoma.** IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.* 1996; 157: 12-20.
- Davidson, N.J., M.W. Leach, M.M. Fort, L. Thompson-Snipes, R. Kuhn, W. Muller, D.J. Berg, and D.M. Rennick.** T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J.Exp.Med.* 1996; 184: 241-251.

- de Grado, M., C.M. Rosenberger, A. Gauthier, B.A. Vallance, and B.B. Finlay.** Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect.Immun.* 2001; 69 (10): 6217-6224.
- De Waal, M., J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, and J.E. de Vries.** Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 1991; 174: 1209-1220.
- De Waal, M., J. Haanen, H. Spits, M.G. Roncarolo, V.A. te, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, and J.E. de Vries.** Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J.Exp.Med.* 174: 915-924, 1991.
- Deininger, S., A. Stadelmaier, S. von Aulock, S. Morath, R.R. Schmidt, and T. Hartung.** Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J.Immunol.*2003; 170 (8): 4134.-4138.
- Desreumaux, P., L. Dubuquoy, S. Nutten, M. Peuchmaur, W. Englaro, K. Schoonjans, B. Derijard, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, M.D. Leibowitz, J.F. Colombel, and J. Auwerx.** Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J.Exp.Med.* 2001; 193 (7): 827-838.
- Dewit, O., G. Boudraa, M. Touhami, and J.F. Desjeux.** Breath hydrogen test and stools characteristics after ingestion of milk and yogurt in malnourished children with chronic diarrhoea and lactase deficiency. *J.Trop.Pediatr.* 1987; 33: 177-180.
- Didierlaurent, A., J.C. Sirard, J.P. Kraehenbuhl, and M.R. Neutra.** How the gut senses its content. *Cell Microbiol.* 2002; 4 (2): 61-72.
- Donnet-Hughes, A., F. Rochat, P. Serrant, J.M. Aeschlimann, and E.J. Schiffrin.** Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J.Dairy.Sci.* 1999; 82: 863-869.
- Dubuquoy, L., E.A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J.F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux.** Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2003; 124 (5): 1265-1276.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber.** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21 (2): 137-148.
- Dwinell, M.B., L. Eckmann, J.D. Leopard, N.M. Varki, and M.F. Kagnoff.** Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 1999; 117: 359-367.
- Dziarski, R. and D. Gupta.** Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J.Endotoxin.Res.* 2000; 6 (5): 401.-405.

- Eckmann, L.** Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2004; 20 (2): 82-88.
- Eckmann, L., H.C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff.** Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1689-1697.
- Erwin, A.L. and R.S. Munford.** Deacylation of structurally diverse lipopolysaccharides by human acyloxyacyl hydrolase. *J.Biol.Chem.* 1990; 265: 16444-16449.
- Fagarasan, S. and T. Honjo.** Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3 (1): 63-72.
- Feist, W., A.J. Ulmer, J. Musehold, H. Brade, S. Kusumoto, and H.D. Flad.** Induction of tumor necrosis factor-alpha release by lipopolysaccharide and defined lipopolysaccharide partial structures. *Immunobiology.* 1989; 179: 293-307.
- Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* 1989; 170: 2081-2095.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra.** IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* 1991; 147: 3815-3822.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, T.R. Mosmann, M. Howard, K.W. Moore, and A. O'Garra.** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J.Immunol.* 1991; 146: 3444-3451.
- Fischer W.** Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids. *Handb. Lipid. Res.* 1990; 6:123-234.
- Fomsgaard, A., M.A. Freudenberg, and C. Galanos.** Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *J.Clin.Microbiol.* 1990; 28: 2627-2631.
- Freter, R.** The fatal enteric cholera infection in the guinea pig, achieved by inhibition of normal enteric flora. *J.Infect.Dis.* 1955; 97: 57-65.
- Frick, J.S., N. Zahir, M. Muller, F. Kahl, O. Bechtold, M.B. Lutz, C.J. Kirschning, J. Reimann, B. Jilge, E. Bohn, and I.B. Autenrieth.** Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur.J.Immunol.* 2006; 36 (6): 1537-1547.
- Fujihashi, K., J.R. McGhee, C. Lue, K.W. Beagley, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto, J. Mestecky, and H. Kiyono.** Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA1 and IgA2 synthesis. *J.Clin.Invest.* 1991; 88: 248-252.
- Fujihashi, K., Y. Kono, and H. Kiyono.** Effects of IL6 on B cells in mucosal immune response and inflammation. *Res.Immunol.* 1992; 143: 744-749.
- Fuss, I.J., M. Boirivant, B. Lacy, and W. Strober.** The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J.Immunol.* 2002; 168 (2) 900.-908.

- Gajewski, T.F., E. Goldwasser, and F.W. Fitch.** Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.* 1988; 141: 2635-2642.
- Galanos, C., O. Luderitz, E.T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, and H. Yoshimura.** Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur.J.Biochem.* 1985; 148: 1-5.
- Galanos, C. and M.A. Freudenberg.** Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology.* 1993; 187: 346-356.
- Gall, L.S.** Significance of microbial interactions in control of microbial ecosystems. *Biotechnol.Bioeng.* 1970; 12: 333-340.
- Ganguly, R. and R. Waldman.** Development of local immunity. *Am.J.Clin.Nutr.* 1977; 30: 1843-1850.
- Gao, J.J., Q. Xue, E.G. Zuvanich, K.R. Haghi, and D.C. Morrison.** Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect.Immun* 2001; 69 (2): 751-757.
- Gautreaux, M.D., E.A. Deitch, and R.D. Berg.** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infect.Immun.* 1994; 62: 2132-2134.
- Gill, H.S., K.J. Rutherford, J. Prasad, and P.K. Gopal.** Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br.J.Nutr.*2000.Feb.;83.(2.):167.-76. 83: 167-176,
- Gill, H.S., K.J. Rutherford, M.L. Cross, and P.K. Gopal.** Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001; 74 (6): 833-839.
- Gill, H.S., K.J. Rutherford, and M.L. Cross.** Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J.Clin.Immunol.* 2001; 21 (4): 264-271.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, U. Helwig, A. Venturi, K.M. Lammers, P. Brigidi, B. Vitali, G. Poggioli, M. Miglioli, and M. Campieri.** Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2003; 124 (5): 1202-1209.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, A. Venturi, P. Brigidi, D. Matteuzzi, G. Bazzocchi, G. Poggioli, M. Miglioli, and M. Campieri.** Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2000; 119 (2):305-309.
- Goldin, B.R., S.L. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri, and S. Salminen.** Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig.Dis.Sci.* 1992; 37: 121-128.
- Golledge, C.L. and T.V. Riley.** "Natural" therapy for infectious diseases. *Med.J.Aust.* 1996; 164: 94-95.



- Gopal, P.K., J. Prasad, J. Smart, and H.S. Gill.** In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int.J.Food Microbiol.* 2001; 67 (3): 207-216.
- Gosselink, M.P., W.R. Schouten, L.M. van Lieshout, W.C. Hop, J.D. Laman, and J.G. Ruseler-van Embden.** Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Dis.Colon Rectum.* 2004; 47 (6): 876-884.
- Grassl, G.A., E. Bohn, Y. Muller, O.T. Buhler, and I.B. Autenrieth.** Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int.J.Med.Microbiol.* 2003; 293 (1):41-54.
- Grozdanov, L., U. Zahringer, G. Blum-Oehler, L. Brade, A. Henne, Y.A. Knirel, U. Schombel, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, E.T. Rietschel, and U. Dobrindt.** A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J.Bacteriol.* 2002; 184 (21): 5912.-5925.
- Gupta, P., H. Andrew, B.S. Kirschner, and S. Guandalini.** Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2000; 31 (4): 453-457.
- Guslandi, M., P. Giollo, and P.A. Testoni.** A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2003; 15 (6): 697-698.
- Ha, C.L., J.H. Lee, H.R. Zhou, Z. Ustunol, and J.J. Pestka.** Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse. *J.Food Prot.* 1999; 62: 181-188.
- Haenel, H. and J. Bendig.** Intestinal flora in health and disease. *Prog.Food Nutr.Sci.* 1: 21-64, 1975.
- Hahm, K.B., Y.H. Im, T.W. Parks, S.H. Park, S. Markowitz, H.Y. Jung, J. Green, and S.J. Kim.** Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2001; 49 (2): 190-198.
- Hailman, E., H.S. Lichenstein, M.M. Wurfel, D.S. Miller, D.A. Johnson, M. Kelley, L.A. Busse, M.M. Zukowski, and S.D. Wright.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J.Exp.Med.* 1994; 179: 269-277.
- Haller, D., C. Bode, W.P. Hammes, A.M. Pfeifer, E.J. Schiffrin, and S. Blum.** Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut.* 2000; 47 (1): 79-87.
- Haller, D., P. Serrant, G. Peruisseau, C. Bode, W.P. Hammes, E. Schiffrin, and S. Blum.** IL-10 producing CD14<sup>low</sup> monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *Microbiol.Immunol.* 2002a; 46 (3): 195-205.
- Haller, D. and C. Jobin.** Interaction between resident luminal bacteria and the host: can a healthy relationship turn sour? *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2004; 38 (2):123.-36.

- Haller, D., L. Holt, S.C. Kim, R.F. Schwabe, R.B. Sartor, and C. Jobin.** Transforming growth factor-beta 1 inhibits non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced NF-kappa B recruitment to the interleukin-6 gene promoter in intestinal epithelial cells through modulation of histone acetylation. *J.Biol.Chem.* 2003; 278 (26): 23851-23860
- Haller, D., M.P. Russo, R.B. Sartor, and C. Jobin.** IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J.Biol.Chem.* 2002b; 277 (41): 38168-38178.
- Harton, J.A., M.W. Linhoff, J. Zhang, and J.P. Ting.** Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J.Immunol.* 2002; 169 (8): 4088-4093.
- Hatada, E.N., D. Krappmann, and C. Scheidereit.** NF-kappaB and the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 2000; 12 (1): 52-58.
- Haziot, A., B.Z. Tsuberi, and S.M. Goyert.** Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 1993; 150: 5556-5565.
- He, F., E. Tuomola, H. Arvilommi, and S. Salminen.** Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2001; 31 (2): 93-96.
- He, F., H. Morita, A.C. Ouwehand, M. Hosoda, M. Hiramatsu, J. Kurisaki, E. Isolauri, Y. Benno, and S. Salminen.** Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains. *Microbiol.Immunol.* 2002; 46 (11): 781-785.
- Helin, T., S. Haahtela, and T. Haahtela.** No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy.* 2002; 57 (3): 243-246.
- Herias, M.V., C. Hesse, E. Telemo, T. Midtvedt, L.A. Hanson, and A.E. Wold.** Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin.Exp.Immunol.* 1999; 116: 283-290.
- Hill, M.J. and B.S. Drasar.** The normal colonic bacterial flora. *Gut.* 1975; 16: 318-323.
- Hirano T.** Ιντερλευκιν 6. In: *Τηε Χηττοκινε Ηαυδβουκ*, edited by Thomson A. San Diego, USA: Academic Press, 1998; 197-228.
- Hoarau, C., C. Lagaraine, L. Martin, F. Velge-Roussel, and Y. Lebranchu.** Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2006; 117 (3): 696-702.
- Hockertz, S.** [Immunomodulating effect of killed, apathogenic *Escherichia coli*, strain Nissle 1917, on the macrophage system]. *Arzneimittelforschung.* 41: 1108-1112, 1991.

- Holst O, B.H.** Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In: *Molecular Biochemistry and Cellular Biology.*, edited by R.J.L. Morrison DC. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1992; 135-170.
- Hooper, L.V., M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk, and J.I. Gordon.** Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 2001; 291 (5505): 881-884.
- Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon.** How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu.Rev.Nutr.* 2002;. 22: 283-307.
- Hoverstad T.** The normal microflora and short-chain fatty acids. In: *The regulatory and protective role of the normal microflora.*, edited by M.T.N.E. Grubb R. London, New York: MacMillan, Stockton Press, 1989; 89-108.
- Hoverstad, T.** Studies of short-chain fatty acid absorption in man. *Scand.J.Gastroenterol.* 1986; 21: 257-260.
- Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ.** Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig.Dis.Sci.* 2002; 47(11): 2625-2634.
- Ibelgaufts H.** Dictionary of cytokines. Basel, Switzerland: Hoffmann-la-Roche Ltd, 1995.
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T.** Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J.Am.Coll.Nutr.* 2003; 22 (1):56-63.
- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H.** Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology.* 1993; 105:1643-1650.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol.Rev.* 1995; 59:171-200.
- Jeannin P, Delneste Y, Seveso M, Life P, Bonnefoy JY.** IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *J.Immunol.* 1996; 156:3159-3165.
- Jijon, H., J. Backer, H. Diaz, H. Yeung, D. Thiel, C. McKaigney, C. De Simone, and K. Madsen.** DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology.* 2004; 126 (5): 1358-1373.
- Jotwani R, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka-Bandoh K, Kato N, Ueno K.** Comparison of cytokine induction by lipopolysaccharide of *Bacteroides fragilis* with *Salmonella typhimurium* in mice. *Microbiol.Immunol.* 1994; 38:763-766.
- Jung, H.C., L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff.** A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J.Clin.Invest.* 1995; 95: 55-65.
- Kagnoff MF, Eckmann L.** Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J.Clin.Invest.* 1997; 100: 6-10.

- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H.** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr.Res.* 1992; 32: 141-144.
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*2001; 357 (9262):1076-1079.
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E.** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003; 361 (9372): 1869-1871.
- Kalliomaki MA, Isolauri E.** Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol.Allergy Clin.North Am.* 2004; 24 (4): 739-752.
- Kayser, R.H., K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel.** *Medizinische Mikrobiologie.* 9 Edn. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1998.
- Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM.** Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat.Immunol.* 2002; 3 (8): 699-702.
- Kim, H.J., R.M. Vazquez, M. Camilleri, D. Stephens, D.D. Burton, K. Baxter, G. Thomforde, and A.R. Zinsmeister.** A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol.Motil.* 2005; 17 (5): 687-696.
- Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ.** The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol.Lett.* 1998; 167: 185-189.
- Kirjavainen PV, ElNezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF.** Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 1999; 6: 799-802.
- Klapproth, J.M., I.C. Scaletsky, B.P. McNamara, L.C. Lai, C. Malstrom, S.P. James, and M.S. Donnenberg.** A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect.Immun.* 2000 ; 68 (4): 2148-2155.
- Knoke M BH.** *Mikroökologie des Menschen: Mikroflora bei Gesunden und Kranken.* Edition Medizin Edn. Weinheim/Deerfield Beach: VCH Verlagsgesellschaft, 1986.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CAJ, Medzhitov R, Flavell RA.** IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002; 110 (2): 191-202.
- Kotani, S., H. Takada, M. Tsujimoto, T. Ogawa, I. Takahashi, T. Ikeda, K. Otsuka, H. Shimauchi, N. Kasai, and J. Mashimo.** Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect.Immun.* 1985; 49: 225-237.

- Kruis, W., P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M.A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, and J. Schulze.** Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*.2004. ; 53 (11): 1617-1623.
- Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M.** Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 1997; 11: 853-858.
- Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A.** Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am.J.Pathol.*2001.Dec.;159.(6.):2001.-9. 159:2001-2009.
- Kuhbacher, T., S.J. Ott, U. Helwig, T. Mimura, F. Rizzello, B. Kleessen, P. Gionchetti, M. Blaut, M. Campieri, U.R. Folsch, M.A. Kamm, and S. Schreiber.** Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*.2006; 55 (6): 833-841.
- Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, Farkkila M.** Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment.Pharmacol.Ther.*2003.; 17 (4): 509-515.
- Kulkarni, A.B., J.M. Ward, L. Yaswen, C.L. Mackall, S.R. Bauer, C.G. Huh, R.E. Gress, and S. Karlsson.** Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am.J.Pathol.* 1995; 146: 264-275.
- Kvietys PR, Granger DN.** Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterology.* 1981; 80: 962-969.
- Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P.** Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur.J.Immunol.* 1993; 23: 2144-2151.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Lee A.** Neglected Niches- The Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. In: Marshall KC. ed. *Advances in Microbial Ecology.* Volume 8. New York: Plenum Publ Corp, 1985:115-162.
- Lee, J.W., J.G. Shin, E.H. Kim, H.E. Kang, I.B. Yim, J.Y. Kim, H.G. Joo, and H.J. Woo.** Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J.Vet.Sci.* 2004; 5 (1): 41-48.
- Lichtenberger LM.** The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu.Rev.Physiol.* 1995; 57: 565-583.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell.** Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-748.
- Lin XP, Almqvist N, Telemo E.** Human small intestinal epithelial cells constitutively express the key elements for antigen processing and the production of exosomes. *Blood Cells Mol.Dis.* 2005; 35 (2): 122-128.

- Lindberg AA, Weintraub A, Zahringer U, Rietschel ET.** Structure-activity relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. *Rev.Infect.Dis.* 1990; 12 Suppl 2: S133-S141
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM.** Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 1994; 10: 55-63.
- Loppnow, H, H Brade, I Durrbaum, CA Dinarello, S Kusumoto, ET Rietschel, and H.D. Flad.** IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J.Immunol.* 1989; 142: 3229-3238.
- Luckey TD.** Intestinal microecology. Introduction: the villus in chemostat man. *Am.J.Clin.Nutr.* 1974; 27: 1266-1276.
- Lüderitz, O, MA Freudenberg, C Galanos, V Lehmann, ET Rietschel, D Shaw.** Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. In: Razin S., Rottem S. ed. *Current topics in membranes and transport.* New York: Academic Press, 1982; 79-151.
- Ma, TY, G.K. Iwamoto, NT Hoa, V Akotia, A Pedram, MA Boivin, and HM Said.** TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2004.Mar.;286.(3.):G367.-76. 286:G367-G376
- Maaser C, Kagnoff MF.** Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z.Gastroenterol.* 2002; 40 (7): 525-529.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA.** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am.J.Physiol.* 1999; 276: G941-G950
- Macpherson AJ, Uhr T.** Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 2004; 303 (5664): 1662-1665.
- Madsen, K, A Cornish, P Soper, C McKaigney, H Jijon, C Yachimec, J Doyle, L Jewell, and C De Simone.** Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 2001; 121(3): 580-591.
- Majamaa H, Isolauri E.** Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1997; 99: 179-185.
- Malchow HA.** Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J.Clin.Gastroenterol.* 1997; 25:653-658.
- Mannel DN, Northoff H, Bauss F, Falk W.** Tumor necrosis factor: a cytokine involved in toxic effects of endotoxin. *Rev.Infect.Dis.* 1987; 9 Suppl 5: S602-S606
- Marteau, P, JP Vaerman, JP Dehennin, S Bord, D Brassart, P Pochart, JF Desjeux, and JC Rambaud.** Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroenterol.Clin.Biol.* 1997; 21: 293-298.

- Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, Ushijima T, Kajinami T, Bamba T.** Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2000; 15 (1): 61-68.
- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T.** Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut.* 1997; 40: 782-789.
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T.** The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J.Dairy.Sci.* 1998; 81: 48-53.
- Mayer M, Krauss JH, Yokota A, Weckesser J.** Natural variants of lipid A. In Friedman H, Klein TW, Nakano M, Nowotny A. *Endotoxin.* New York, Plenum Press, 1990.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL.** An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005 ; 122 (1): 107-118.
- McCracken, VJ, T Chun, ME Baldeon, S Ahrne, G Molin, RI Mackie, and HR Gaskins.** TNF-alpha sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Exp.Biol.Med.(Maywood).* 2002; 227 (8): 665-670.
- McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Sonnenberg MS, Hecht G.** Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J.Clin.Invest.* 2001; 107 (5): 621-629.
- Melmed, G, LS Thomas, N Lee, SY Tesfay, K Lukasek, KS Michelsen, Y Zhou, B Hu, M Arditi, and MT Abreu.** Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J.Immunol.* 2003; 170 (3): 1406-1415.
- Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M.** Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut.* 2004.Jun.;53.(6.):821.-8. 53: 821-828.
- Mestecky J, Russell MW, Elson CO.** Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut.* 1999; 44: 2-5.
- Michail S, Abernathy F.** *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2002; 35 (3): 350-355.
- Michail S, Abernathy F.** *Lactobacillus plantarum* inhibits the intestinal epithelial migration of neutrophils induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2003; 36 (3): 385-391.
- Mimura, T, F Rizzello, U Helwig, G Poggioli, S Schreiber, IC Talbot, RJ Nicholls, P Gionchetti, M Campieri, and MA Kamm.** Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* 2004; 53 (1): 108-114.
- Moore WE, Holdeman LV.** Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl.Microbiol.* 1974; 27: 961-979.

- Moreau MC, Ducluzeau R, Guy-Grand D, Muller MC.** Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect.Immun.* 1978; 21: 532-539.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J.Immunol.* 2005; 175 (1): 5-14.
- Mowat AM.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3 (4): 331-341.
- Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, Fukase K, Schromm AB, Seydel U.** Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J.Biol.Chem.* 2004; 279 (25):26307-26313.
- Muller-Loennies S, Lindner B, Brade H.** Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of Escherichia coli K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 2003; 278 (36): 34090-34101.
- Muller-Loennies S, Zahringer U, Seydel U, Kusumoto S, Ulmer AJ, Rietschel ET.** What we know and don't know about the chemical and physical structure of lipopolysaccharide in relation to biological activity. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1998; 397: 51-72.
- Munk K.** Grundstudium der Mikrobiologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- Muraguchi, A, T Kishimoto, Y Miki, T Kuritani, T Kaieda, K Yoshizaki, Y Yamamura.** T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J.Immunol.* 1981; 127: 412-416.
- Neish, AS, AT Gewirtz, H Zeng, AN Young, ME Hobert, V Karmali, AS Rao, JL Madara.** Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science.* 2000; 289 (5484): 1560-1563.
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP.** Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat.Immunol.* 2001; 2 (11): 1004-1009.
- Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP.** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.* 1996; 86: 345-348.
- Nielsen E, Friis CW.** Influence of an intestinal microflora on the development of the immunoglobulins IgG1, IgG2a, IgM and IgA in germ-free BALB/c mice. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[C].* 1980; 88: 121-126.
- O'Sullivan MA, O'Morain CA.** Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig.Liver Dis.* 2000; 32 (4): 294-301.
- Oberhelman, RA, RH Gilman, P Sheen, DN Taylor, RE Black, L Cabrera, AG Lescano, R Meza, G Madico.** A placebo-controlled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J.Pediatr.* 1999; 134: 15-20.



- Ogle, CK, JG Noel, X Guo, DA Wells, JF Valente, JD Ogle, and JW Alexander.** The ability of endotoxin-stimulated enterocytes to produce bactericidal factors. *Crit.Care Med.* 2002; 30 (2): 428-434.
- Oliveira IC, Sciavolino PJ, Lee TH, Vilcek J.** Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992; 89: 9049-9053.
- Osborn, MJ** Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of salmonella typhimurium.. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1963; 50:499-506.
- Otte JM, Podolsky DK.** Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2004; 286 (4): G613-G626
- Otte JM, Cario E, Podolsky DK.** Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2004; 126 (4): 1054-1070.
- Ouellette AJ, Bevins CL.** Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm.Bowel.Dis.*2001.Feb.;7.(1.): 43-50.
- Ozawa, A and R Freter.** Ecological mechanism controlling growth of escherichia coli in continuous flow cultures and in the mouse. *J.Infect.Dis.* 1964; 114:235-242.
- Palva ET, Makela PH.** Lipopolysaccharide heterogeneity in Salmonella typhimurium analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur.J.Biochem.* 1980; 107: 137-143.
- Parker RB.** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974; 29: 4-8.
- Parlesak A, Haller D, Brinz S, Baeuerlein A, Bode C.** Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand.J.Immunol.* 2004.; 60 (5): 477-485.
- Parlesak A, Bode C.** Lipopolysaccharide determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography after fluorescence labeling. *J.Chromatogr.A.* 1995; 711: 277-288.
- Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S.** Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin.Exp.Allergy.* 1998; 28: 1474-1479.
- Pena JA, Versalovic J.** Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.*2003.Apr.;5.(4.):277.-85. 5: 277-285.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N.** Immune system stimulation by probiotics. *J.Dairy.Sci.* 1995; 78: 1597-1606.
- Pfeiffer R.** Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z f f Hygiene* 1892; 11: 393-412.
- Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthesy B.** Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity.* 2002; 17 (1): 107-115.

- Phalipon A, Corthesy B.** Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends.Immunol.* 2003; 24 (2): 55-58.
- Philpott DJ, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH.** Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am.J.Physiol.* 1996; 270: G634-G645
- Pothoulakis, C, CP Kelly, MA Joshi, N Gao, CJ O'Keane, I Castagliuolo, and JT Lamont.** *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology.* 1993; 104: 1108-1115.
- Poxton IR, Edmond DM.** Biological activity of *Bacteroides* lipopolysaccharide--reappraisal. *Clin.Infect.Dis.* 1995; 20 Suppl 2: S149-S153
- Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C.** Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut.* 2002; 51 (3): 405-409.
- Qiao, L, J Braunstein, M Golling, G Schurmann, F Autschbach, P Moller, S Meuer.** Differential regulation of human T cell responsiveness by mucosal versus blood monocytes. *Eur.J.Immunol.* 1996; 26: 922-927.
- Qureshi N, Takayama K, Heller D, Fenselau C.** Position of ester groups in the lipid A backbone of lipopolysaccharides obtained from *Salmonella typhimurium*. *J.Biol.Chem.* 1983; 258: 12947-12951.
- Rachmilewitz, D, K Katakura, F Karmeli, T Hayashi, C Reinus, B Rudensky, S Akira, K Takeda, J Lee, K Takabayashi, E Raz.** Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.* 2004; 126 (2): 520-528.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R.** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004; 118 (2): 229-241.
- Rangavajhyala N, Shahani KM, Sridevi G, Srikumaran S.** Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha by murine macrophages. *Nutr.Cancer.* 1997; 28: 130-134.
- Rasic JL, Kurmann JA.** Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia Suppl.* 1983; 39: 1-295.
- Rasmussen, SJ, L Eckmann, AJ Quayle, L Shen, YX Zhang, DJ Anderson, J Fierer, RS Stephens, MF Kagnoff.** Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J.Clin.Invest.* 1997; 99: 77-87.
- Rath, HC, HH Herfarth, JS Ikeda, WB Grenther, TEJ Hamm, E.Balish, JD Taurog, RE Hammer, KH Wilson, RB Sartor.** Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J.Clin.Invest.* 1996; 98: 945-953.
- Reid G.** Probiotic Therapy and Functional Foods for Prevention of Urinary Tract Infections: State of the Art and Science. *Curr.Infect.Dis.Rep.* 2000; 2 (6): 518-522.

- Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL.** Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Can.J.Microbiol.* 1988; 34: 344-351.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT.** Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* 1999; 354: 635-639.
- Rescigno, M, M Urbano, B Valzasina, M Francolini, G Rotta, R Bonasio, F Granucci, JP Kraehenbuhl, P Ricciardi-Castagnoli.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* 2001; 2 (4): 361-367.
- Resta-Lenert S, Barrett KE.** Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). *Gut.* 2003; 52 (7): 988-997.
- Riedel CU, Foata F, Goldstein DR, Blum S, Eikmanns BJ.** Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. *Int.J.Food Microbiol.* 2006; 110 (1):62.-68.
- Rietschel, ET, H Brade, L Brade, K Brandenburg, U Schade, U Seydel, U Zahringer, C Galanos, O Luderitz, O Westphal.** Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1987; 231: 25-53.
- Rietschel, ET, U Seydel, U Zahringer, UF Schade, L Brade, H Loppnow, W Feist, MH Wang, AJ Ulmer, HD Flad.** Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 1991; 5: 753-779.
- Rietschel, ET, L. Brade, FU Schade, U Seydel, U Zahringer, U. Mamat, G Schmidt, AJ Ulmer, H Loppnow, HD Flad.** [Bacterial endotoxins: relationship between chemical structure and biological effect]. *Immun.Infekt.* 1993a; 21: 26-35.
- Rietschel, ET, T Kirikae, FU Schade, AJ Ulmer, O Holst, H Brade, G Schmidt, U Mamat, HD Grimmecke, S Kusumoto.** The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology.* 1993b; 187: 169-190.
- Rietschel, ET, T Kirikae, FU Schade, U Mamat, G Schmidt, H Loppnow, AJ Ulmer, U Zahringer, U Seydel, F Di Padova.** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994; 8: 217-225.
- Rietschel, ET, H Brade, O Holst, L Brade, S Muller-Loennies, U Mamat, U Zahringer, F Beckmann, U Seydel, K Brandenburg, AJ Ulmer, T Mattern, H Heine, J Schletter, H Loppnow, U Schonbeck, HD Flad, S Hauschildt, UF Schade, F Di Padova, S Kusumoto, RR Schumann.** Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996; 216: 39-81.
- Rigothier MC, Maccario J, Gayral P.** Inhibitory activity of saccharomyces yeasts on the adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to human erythrocytes in vitro. *Parasitol.Res.* 1994; 80: 10-15.
- Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M.** Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood.* 2005; 106 (8): 2818.-2826.

- Rolfe RD.** Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev.Infect.Dis.* 1984; 6 Suppl 1: S73-S79
- Rolle m., A. Mayr.** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage; Enke-Verlag Stuttgart 2002.
- Rosenfeldt, V, E Benfeldt, SD Nielsen, KF Michaelsen, DL Jeppesen, NH Valerius, A Paerregaard.** Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2003; 111 (2): 389-395.
- Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P.** Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin.Exp.Immunol.* 1997; 110: 104-113.
- Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D.** IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic Enterococcus faecalis. *J.Immunol.* 2005a; 174 (5): 2990-2999.
- Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D.** Innate mechanisms for Bifidobacterium lactis to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology.* 2005b; 115 (4): 441-450.
- Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH.** Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 1994; 344: 1046-1049.
- Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, Campos-Sanchez M, Chea-Woo E, Sack RB.** Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. *BMC.Pediatr.* 2004; 4: 18
- Salfinger M.** [Possibilities and limits of the proof by culture of intestinal bacterial infections]. *Ther.Umsch.* 1980; 37: 181-186.
- Sansonetti PJ, Arondel J, Huerre M, Harada A, Matsushima K.** Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect.Immun.* 1999; 67: 1471-1480.
- Sarker SA, Gyr K.** Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut.* 1992; 33: 987-993.
- Sartor RB.** Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology.* 1994; 106: 533-539.
- Savage DC.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu.Rev.Microbiol.* 1977; 31: 107-133.
- Savkovic SD, Ramaswamy A, Koutsouris A, Hecht G.** EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2001; 281 (4): G890-G898

- Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G.** Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect.Immun.* 1996; 64: 4480-4487.
- Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G.** Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am.J.Physiol.* 1997; 273: C1160-C1167
- Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A.** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J.Dairy.Sci.* 1995; 78: 491-497.
- Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E.** Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J.Immunol.* 1987; 139: 3474-3483.
- Schroder, NW, S Morath, C Alexander, L Hamann, T Hartung, U Zahringer, UB Gobel, JR Weber, RR Schumann.** Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol.Chem.* 2003; 278 (18):15587-15594.
- Schromm, AB, K Brandenburg, H Loppnow, U Zahringer, ET Rietschel, SF Carroll, MH Koch, S Kusumoto, U Seydel.** The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J.Immunol.* 1998; 161: 5464-5471.
- Schultz, M, UG Strauch, HJ Linde, S Watzl, F Obermeier, C Gottl, N Dunger, N Grunwald, J Scholmerich, HC Rath.** Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 2004; 11 (2): 372-378.
- Schumann, RR, SR Leong, GW Flaggs, PW Gray, SD Wright, JC Mathison, PS Tobias, RJ Ulevitch.** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990; 249: 1429-1431.
- Servin AL.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28 (4): 405-440.
- Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K.** Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur.J.Biochem.* 2000b; 267 (10): 3032-3039.
- Seydel U, Schromm AB, Blunck R, Brandenburg K.** Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins. *Chem.Immunol.* 2000a; 74.: 5-24.
- Seydel, U, L Hawkins, AB Schromm, H Heine, O Scheel, MH Koch, K Brandenburg.** The generalized endotoxic principle. *Eur.J.Immunol.* 2003; 33 (6): 1586-1592.
- Seydel U, Labischinski H, Kastowsky M, Brandenburg K.** Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology.* 1993; 187: 191-211.
- Seydel U, Brandenburg K, Rietschel ET.** A case for an endotoxic conformation. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1994; 388: 17-30.

- Shalaby MR, Waage A, Espevik T.** Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. *Cell Immunol.* 1989; 121: 372-382.
- Shedlofsky S, Freter R.** Synergism between ecologic and immunologic control mechanisms of intestinal flora. *J.Infect.Dis.* 1974; 129: 296-303.
- Shida, K, K Makino, A Morishita, K Takamizawa, S Hachimura, A Ametani, T Sato, Y Kumagai, S Habu, S Kaminogawa.** Lactobacillus casei inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1998; 115: 278-287.
- Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA.** Enteropathogenic E. coli disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Lab.Invest.* 2005.Oct.;85.(10.):1308.-24. 85: 1308-1324.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 1999; 189: 1777-1782.
- Siegenthaler W.** Klinische Pathophysiologie. 8. Auflage Edn. Stuttgart: Thieme-Verlag, 2001.
- Siitonen, S, H Vapaatalo, S Salminen, A Gordin, M Saxelin, R Wikberg, and AL Kirkkola.** Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann.Med.* 1990; 22: 57-59.
- Simon GL, Gorbach SL.** Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology.* 1984; 86: 174-193.
- Smits, HH, A Engering, D van der Kleij, EC de Jong, K Schipper, TM van Capel, BA Zaat, M Yazdanbakhsh, EA Wierenga, Y van Kooyk, ML Kapsenberg.** Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2005; 115 (6): 1260-1267.
- Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G.** The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur.J.Clin.Nutr.* 1998; 52: 899-907.
- Stadnyk AW.** Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can.J.Gastroenterol.* 2002; 16 (4): 241-246.
- Strober W.** Interactions between epithelial cells and immune cells in the intestine. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998; 859: 37-45.
- Strober W, Kelsall B, Marth T.** Oral tolerance. *J.Clin.Immunol.* 1998; 18: 1-30.
- Szajewska H, Mrukowicz JZ.** Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2001b; 33 Suppl.2.: S17.-25.

- Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W.** Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J.Pediatr.* 2001a; 138 (3): 361-365.
- Tagg JR, Dierksen KP.** Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends.Biotechnol.* 2003; 21 (5): 217-223.
- Takada H, S. Kotani.** Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. Boca Raton/USA: CRC Press, 1992.
- Takada, H, S Kotani, S Tanaka, T Ogawa, I Takahashi, M Tsujimoto, T Komuro, T Shiba, S Kusumoto, N Kusunose.** Structural requirements of lipid A species in activation of clotting enzymes from the horseshoe crab, and the human complement cascade. *Eur.J.Biochem.* 1988; 175: 573-580.
- Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF.** A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP.* 1990; 24: 382-384.
- Tatsumi Y, Lichtenberger LM.** Molecular association of trinitrobenzenesulfonic acid and surface phospholipids in the development of colitis in rats. *Gastroenterology.* 1996; 110: 780-789.
- Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ.** Effects of lactic acid bacteria ingestion of basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse. *J.Food Prot.* 1999a; 62: 287-291.
- Tejada-Simon MV, Pestka JJ.** Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J.Food Prot.* 1999b; 62: 1435-1444.
- Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tscherner V, Walz A, Baggiolini M.** Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J.* 1988; 2: 2702-2706.
- Thomson A,** *The Cytokine Handbook.* 3<sup>rd</sup> edition. San Diego: Academic Press; 1998.
- Tlaskalova-Hogenova, H, L Tuckova, R Lodinova-Zadnikova, R Stepankova, B Cukrowska, DP Funda, I Striz, H Kozakova, I Trebichavsky, D Sokol, Z Rehakova, J Sinkora, P Fundova, D Horakova, L Jelinkova, D Sanchez.** Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2002; 128 (2): 77-89.
- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ.** Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J.Biol.Chem.* 1989; 264: 10867-10871.
- Travassos, LH, SE Girardin, DJ Philpott, D Blanot, MA Nahori, C Werts, IG Boneca.** Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 2004; 5 (10):1000-1006.
- Tsai CM, Frasch CE.** A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 1982; 119: 115-119.
- Tsai EY, Jain J, Pesavento PA, Rao A, Goldfeld AE.** Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol.Cell Biol.* 1996a; 16: 459-467.

- Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE.** Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol.Cell Biol.* 1996b; 16: 5232-5244.
- Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, Kodama M.** Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J.Surg.Res.* 2001 ; 100 (1): 127-134.
- Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S.** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001; 73 (2.Suppl.): 393S-398S.
- Ukena, SN, AM Westendorf, W Hansen, M Rohde, R Geffers, S Coldewey, S Suerbaum, J Buer, F Gunzer.** The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC.Med.Genet.* 2005; 6: 43.
- Van Damme J, Van Snick J.** Induction of hybridoma growth factor (HGF), identical to IL-6, in human fibroblasts by IL-1: use of HGF activity in specific and sensitive biological assays for IL-1 and IL-6. *Dev.Biol.Stand.* 1988; 69: 31-38.
- Van Damme, N, M De Vos, D Baeten, P Demetter, H Mielants, G Verbruggen, C Cuvelier, EM Veys, F De Keyser.** Flow cytometric analysis of gut mucosal lymphocytes supports an impaired Th1 cytokine profile in spondyloarthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2001; 60 (5): 495-499.
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA.** *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2002; 109 (4): 678-684.
- Van Snick J.** Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* 1990; 8: 253-278.
- Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, Stockinger B.** Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. *J.Immunol.* 2006; 176 (10): 6202-6210.
- Venturi, A, P Gionchetti, F Rizzello, R Johansson, E Zucconi, P Brigidi, D Matteuzzi, M Campieri.** Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 1999; 13: 1103-1108.
- Vogel SN, MM Hogan.** The role of cytokines in endotoxin-mediated host responses. In: Oppenheim JJ SEM. ed. *Immunopharmacology- the Role of cells and cytokines in Immunity and Inflammation.* New York: Oxford University Press, 1990: 238-258.
- Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T.** The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J.Exp.Med.* 1989; 169: 333-338.
- Waidmann, M, O Bechtold, JS Frick, HA Lehr, S Schubert, U Dobrindt, J Loeffler, E Bohn, and IB Autenrieth.** *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology.* 2003; 125 (1): 162-177.
- Warner SJ, Mitchell D, Savage N, McClain E.** Dose-dependent reduction of lipopolysaccharide pyrogenicity by polymyxin B. *Biochem.Pharmacol.* 1985; 34: 3995-3998.



- Westphal O, Lüderitz O.** Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. *Angew.Chemie* 1954; 66: 407
- Wheeler, JG, SJ Shema, ML Bogle, MA Shirrell, AW Burks, A Pittler, RM Helm.** Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 1997; 79: 229-233.
- Wiese A, Brandenburg K, Ulmer AJ, Seydel U, Muller-Loennies S.** The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule. *Biol.Chem.* 1999; 380: 767-784.
- Wilson M, McNab R, Henderson B.** Bacterial disease mechanisms. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- Wollenweber HW, Rietschel ET, Hofstad T, Weintraub A, Lindberg AA.** Nature, type of linkage, quantity, and absolute configuration of (3-hydroxy) fatty acids in lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 and related strains. *J.Bacteriol.* 1980; 144: 898-903.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249: 1431-1433.
- Wuyts, A, P Proost & J Van Damme.** Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: Thomson A, ed. *The Cytokine Handbook*. 3<sup>rd</sup> edition. San Diego: Academic Press; 1998: 271-311.
- Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P.** Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J.Immunol.* 2003.Jan.15.;170.(2.):816.-22. 170: 816-822.
- Yan F, Polk DB.** Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 2002; 277 (52): 50959-50965.
- Yang JH, Yin W, Yuan J, Li YC.** [Effects of polymyxin B on LPS-induced activation of NF-kappaB in pulmonary alveolar macrophages]. *Xi.Bao.Yu.Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za.Zhi.* 2003; 19 (3): 235-238 (Abstract).
- Yoshimura, T, K Matsushima, S Tanaka, EA Robinson, E Appella, JJ Oppenheim, EJ Leonard.** Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 9233-9237.
- Yssel, H, M De Waal, MG Roncarolo, JS Abrams, R Lahesmaa, H Spits, JE de Vries.** IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J.Immunol.* 1992; 149: 2378-2384.
- Yu B, Wright SD.** Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 4100-4105.
- Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET.** Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 1994; 50:211-76.: 211-276.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Zareie M, McKay DM, Kovarik GG, Perdue MH.** Monocyte/macrophages evoke epithelial dysfunction: indirect role of tumor necrosis factor-alpha. *Am.J.Physiol.* 1998; 275: C932-C939
- Zhang, MH, KJ Tracey.** Tumor necrosis factor. In: Thomson A, ed. *The Cytokine Handbook*. 3<sup>rd</sup> edition. San Diego: Academic Press; 1998: 517-48.
- Ziegler-Heitbrock, HW, H Pechumer, I Petersmann, JJ Durieux, N Vita, MO Labeta, M Strobel.** CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur.J.Immunol.* 1994; 24: 1937-1940.

## DANKSAGUNG

Bei allen Personen, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Ch. Bode, unter deren Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde, für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die konstruktiven Gespräche und vielfältigen Ratschläge.

Bei Herrn PD Dr. A. Parlesak für seine intensive Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Anregungen, seine Hilfestellungen in statistischen Fragen, sowie für die gründliche Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Bei der Blutzentrale des Klinikums Stuttgart bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung der Buffy Coats.

Dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Eberhard Karls Universität Tübingen danke ich für die Bereitstellung der *Bacteroides* sp.. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Dr. J. Frick, die mich in die Kunst der Anzucht von *Bacteroides* eingewiesen hat.

Beim FG für Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten *Lactobacillen* sp..

Herrn Prof. Dr. Dirk Haller, FG Experimentelle Ernährungsmedizin des Wissenschaftszentrums Weihenstephan der TUM, gilt mein Dank für fachlichen Support und die Bereitstellung des *E. faecalis*.

Frau Michaela Bock und Frau Stefanie Ackermann danke ich für die viele Arbeit, die sie mir durch ihre Diplomarbeiten abgenommen haben. Für die Fertigstellung der qRT-PCR Messungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Anja Hild.

Den Mitarbeiterinnen des FG Ernährungsphysiologie danke ich für das nette Arbeitsklima, die laborpraktische und v. a. die moralische Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

## DANKSAGUNG

Bei meiner Freundin Dr. Angelika Notzon möchte ich mich ganz herzlich für die verständnisvolle Begleitung während der Entstehung dieser Arbeit und besonders für die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während dieser Arbeit vielfältig unterstützt, durch alle Hochs und Tiefs begleitet und immer wieder motiviert hat. Ganz besonders danken möchte ich meinem Mann Matthias, der immer für mich da war, ein offenes Ohr für alle meine Probleme und meistens eine Lösung zur Hand hatte. Mein Dank gilt auch unserer kleinen Tochter Louisa, die in letzter Zeit viel auf mich verzichten musste und sich darauf freut endlich wieder mehr von ihrer Mama zu haben.

## CURRICULUM VITAE

### Zur Person

---

Annette Christine Bäuerlein geb. Grünefeld  
 geboren am 12.01.1977 in Nürnberg  
 verheiratet seit 15.11.2003 mit Herrn Matthias Bäuerlein  
 Tochter: Louisa Katharina Bäuerlein geb. 14.09.2005

### Schulbildung

---

1983 - 1987 Grund- und Teilhauptschule Wiggensbach  
 1987 – 1996 Hildegardis-Gymnasium Kempten im Allgäu  
 JUNI 1996 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

---

1996 - 2001 Studium der Ökotrophologie an der TUM – Weihenstephan  
 Vertiefungsfächer: Lebensmittelmikrobiologie,  
 Lebensmitteltechnologie,  
 Präventivmedizin

06-11/2002 Diplomarbeit: „Nachweis von *Listeria monocytogenes* mittels  
 Real-Time-PCR“  
 Betreuer: Prof. Dr. Johann Bauer

11/2001 Abschluss: Diplom Ökotrophologin

### Dissertation

---

seit 05/02 Promotion am Institut für Biologische Chemie und Ernährungs-wissenschaft,  
 FG Ernährungsphysiologie Prof. Dr. Ch. Bode

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und der zitierten Literatur angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.