

**Molekulare Interaktionen von Milchsäurebakterien mit
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* und humanen
Darmepithelzellen**

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

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim



Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie

Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie

vorgelegt von

Helen Stöber

aus Hamburg

2011

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person und Prüfer:	Prof. Dr. Herbert Schmidt
2. berichtende Person und Prüfer:	Prof. Dr. Lutz Graeve
3. Prüfer:	Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth
Eingereicht am:	10.02.2011
Tag der Disputation:	01.06.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 06.04.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Die Darmflora des Menschen	1
1.2 Das humane Immunsystem	2
1.2 Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	8
1.2.1 Pathogenitätsfaktoren.....	9
1.2.2 Reservoir und Übertragung	12
1.2.3 Krankheitsverlauf / Klinik	12
1.2.4 Therapie.....	13
1.3 Probiotika	16
1.3.1 Taxonomische Einordnung	16
1.3.2 Mechanismen der probiotischen Wirkung.....	18
1.3.3 Anwendung und Wirkungsweisen von Probiotika	22
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien für Bakterienkulturen.....	26
2.1.2 Chemikalien für Zellkulturen	26
2.1.3 Bakterienstämme.....	27
2.1.4 Nährmedien und Puffer.....	29
2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden.....	33
2.2.1 Kultivierung von HT29 Zellen.....	33
2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	33
2.2.3 Durchführung von Infektionsversuchen mit lebenden Bakterien	34
2.2.4 Durchführung von Infektionsversuchen mit inaktivierten Bakterien und Kulturüberständen.....	35
2.3 Untersuchung der Zellkulturüberstände.....	36
2.3.1 Bestimmung der Interleukin-8 Konzentration mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	36
2.3.2 Bestimmung von organischen Säuren mittels High Performance Liquid Chromatography	37
2.3.3 Einfluss von organischen Säuren auf die Sekretion von IL-8	38
2.4 Transporter-Gen-Assay zur Bestimmung von NF- κ B	38
2.4.1 Plasmidgewinnung.....	38
2.4.2 Transfektion der HT29 Zellen mit ExGen 500	39

2. 4. 3	Durchführung von Infektionsversuchen zur Bestimmung der Aktivierung von NF- κ B.....	40
2. 4. 4	Analyse der Zelllysate zur Bestimmung der Aktivierung von NF- κ B.....	40
2. 5	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung der Genexpression der Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 9.....	42
2. 5. 1	Herstellung von Standards für die qRT-PCR.....	42
2. 5. 2	Durchführung von Infektionsversuchen zur Bestimmung der Expression von TLRs in HT29 Zellen	44
2. 5. 3	RNA-Isolierung	45
2. 5. 4	Denaturierende Gelelektrophorese.....	45
2. 5. 5	c-DNA-Synthese	45
2. 5. 6	Messung der Genexpression.....	46
2. 6	Statistische Methoden	48
3.	Ergebnisse	49
3. 1	Untersuchungen zur IL-8 Modulation von infizierten HT29 Zellen	49
3. 1. 1	Co-Infektion von HT29 Zellen mit verschiedenen Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen und EDL933	50
3. 1. 2	Co-Infektion von HT29 Zellen mit verschiedenen EHEC-Stämmen unterschiedlicher Virulenzprofile und Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen	52
3. 1. 3	Co-Infektion von HT29 Zellen mit dem EHEC-Stamm EDL933 und Zelllysaten von benignen Bakterien bzw. deren Kulturüberständen	56
3. 1. 4	Untersuchung des Einflusses von organischen Säuren auf die IL-8 Sekretion von EHEC-infizierten HT29 Zellen	57
3. 1. 5	Untersuchungen zur IL-8 Sekretion von HT29 Zellen nach Infektion mit Deletionsmutanten des EHEC-Stammes PMK5	61
3. 2	Einfluss von Milchsäure- und Bifidobakterien-Stämmen sowie <i>S. pasteurii</i> LTH 5211 auf die EHEC-induzierte NF- κ B Aktivierung	63
3. 3	Untersuchungen zur Genexpression von Toll-like Rezeptoren nach Infektion mit EDL933 und / oder Milchsäurebakterien	67
4.	Diskussion.....	74
5.	Zusammenfassung.....	91
6.	Anhang.....	95
7.	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACTB	β-Aktin
A/E-Läsionen	Attaching and Effacing Läsionen
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATCC	American Type Culture Collection
BFE	Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDT-V	Cytolethal Distending Toxin
CpG	Nichtmethylierte repetitive Cytosin-Guanin-Einheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolysaccharide
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gb3	Globotriaosylceramid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HC	Hämorrhagischen Kolitis
HUS	Hämolytisch-urämische Syndrom
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KbE	Koloniebildende Einheit
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LPS	Lipopolysaccharid

LRR	Leucine Rich-repeats
LTH	Lebensmitteltechnologie Hohenheim
M	Mol/l
MAMP	Microbe Associated Molecular Patterns
MAP	Mitochondrium Assoziiertes Protein
mMRS-Medium	Modifiziertes de Man-Rogosa-Sharpe-Medium
MOI	Multiplicity of Infection
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MBS	Milchsäurebakterien, Bifidobakterien und <i>S. pasteurii</i> LTH 5211
n	Nano
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuklearer Faktor kappa B
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OptiMEM	Modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PRR	Pattern Recognition Receptors
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung per Minute
stx	Shiga Toxin
T	Thymin
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIR	Toll / Interleukin 1 (IL-1) Rezeptor
Tir	Translocated Intimin Receptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura
U	Unit

1. Einleitung

1.1 Die Darmflora des Menschen

Der Darm des Menschen ist ein ca. 4 - 6 m langer, muskulöser Schlauch, der im Inneren von der Darmschleimhaut (Mukosa) ausgekleidet ist, welche aus mehreren sehr dünnen Schichten besteht. Im Dünndarm bildet die Mukosa Kerkring-Falten (Plicae circulares), Zotten und Krypten aus, was zu einer vergrößerten Oberfläche von ca. 100 m² führt und eine optimale Nährstoffresorption gewährleistet. Die Resorption von Ionen und Wasser erfolgt hauptsächlich im Dickdarm, hier werden von der Mukosa nur Krypten gebildet. Die Grenze zwischen Darmwand und -lumen wird vom intestinalen Epithel gebildet, es ist durch einen hohen Zellumsatz mit einem Austausch der Epithelzellpopulation innerhalb von 24 – 96 h gekennzeichnet. Das intestinale Epithel weist einen Mikrovillisaum auf und ist eine hochselektive Barriere, die einerseits die Passage potentiell toxischer Stoffe verhindert und andererseits den Transport von Nährstoffen und Ionen in den Blutkreislauf ermöglicht (Benninghoff & Drenckhahn; 2008; Fanghänel et al., 2003).

Der Darm wird von Mikroorganismen aus den Gruppen der Bacteria, Archeae und Eukarya besiedelt. Die Bakterien bilden die mit Abstand größte Gruppe, wobei sich die höchste Bakteriendichte im Kolon (bis zu 10¹² KBE/g Fäzes) befindet (O'Hara & Shanahan; 2006). Durch Substratkonkurrenz, Metabolithemmung, aktive Bakteriozimbildung und mikrobielle Sukzession ist die Zusammensetzung der Mikroflora wesentlich von bakteriellen Interaktionen beeinflusst. Etwa 400-500 Bakterienspezies kommen im Darm vor, wobei die Identifizierung abhängig von der verwendeten Technik ist. So wurden mit der 16S-rDNA-Methode auch bisher nicht kultivierbaren Bakterienspezies nachgewiesen (80 % der bakteriellen Sequenzen), wovon die meisten Phylotypen den *Firmicutes* und den *Bacteroidetes* zugeordnet werden konnten. Dabei gehören die meisten Spezies der *Firmicutes* zu den Klassen der *Clostridia* (95 %), *Mollicutes* (4,5 %) und *Bacilli* (0,2 %) (Eckburg et al., 2005).

Für die kommensalen Mikroorganismen stellt der Darm ein geschütztes Habitat mit gleichbleibender Temperatur und kontinuierlichem Substratangebot dar. Ebenfalls werden die morphologisch-anatomischen Verhältnisse des Darms und das darmassoziierte Immunsystem von der Mikroflora geprägt (Sharma et al., 2010). Die

kommensalen Mikroorganismen des Darmes haben für den Wirt wichtige Funktionen, unter anderem bilden sie eine Barriere, die vor Besiedelung mit pathogenen Mikroorganismen schützt, indem alle Nischen des Darmes besetzt und antimikrobielle Substanzen produziert werden (Hart et al., 2002). Sie verstoffwechseln unverdauliche Nahrungsbestandteile, beeinflussen durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren positiv die Differenzierung und Proliferation der Darmepithelzellen und vermitteln weitere metabolische Effekte, wie beispielsweise die Synthese von Vitaminen wie Biotin, Folsäure und Vitamin K (O'Hara & Shanahan; 2006). Die Mikrobiota gilt als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems, da eine intakte intestinale Bakterienflora ein übermäßiges Wachstum, sowie die Adhäsion von pathogenen Keimen an das Darmepithel verhindert und schädliche Stoffwechselprodukte metabolisiert (Tlaskalova-Hogenova et al., 2004).

1.2 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem muss zwischen apathogenen kommensalen Mikroorganismen, pathogenen Keimen, sowie harmlosen Nahrungsbestandteilen differenzieren. Pathogene werden durch eine adäquate Immunantwort bekämpft, auf apathogene Mikroorganismen und Nahrungsbestandteile sollte das Immunsystem jedoch mit „oralen Toleranz“ reagieren, da sich der Organismus sonst selbst durch eine überflüssige, unkontrollierte und chronische Entzündungsreaktion schädigt (Atkins & Furuta; 2010).

Das humane Immunsystem wird nach dem Abwehrmechanismus in ein spezifisches („erworbenes“) Immunsystem und in ein unspezifisches („angeborenes“) Immunsystem unterteilt, wobei sich die Immunreaktionen der beiden Systeme überlagern. Das spezifische Immunsystem wird im Wesentlichen durch lymphatisches Gewebe, sowie durch Antigen-präsentierende Zellen, T- und B-Lymphozyten, repräsentiert (Murphy et al., 2009). Die Erkennung von Mikroorganismen erfolgt durch Antigenrezeptoren, welche eine genau definierte Antigenspezifität aufweisen und klonal auf B- und T-Zellen verteilt sind. Sie stellen das Gedächtnis des Immunsystems dar und lösen komplexe Immunreaktionen aus. Diese verlaufen im Vergleich zur unspezifischen Immunantwort langsamer und benötigen meist einige Tage (>96 h). Zu dem unspezifischen Immunsystem zählen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Epithelzellen. Mikroorganismen werden über sogenannte Pattern recognition

receptors (PRR) erkannt, diese besitzen eine sehr breite Spezifität für konservierte und invariante Merkmale von Mikroorganismen und vermitteln schnelle, stereotype Immunreaktionen, die innerhalb weniger Stunden ablaufen (Murphy et al., 2009).

Das darmassoziierte Immunsystem (Gut associated lymphoid tissue, GALT) zählt mit Milz und Lymphknoten zu den peripheren lymphatischen Organen, es lässt sich funktionell in einen afferenten sowie einen efferenten Schenkel unterscheiden. Der afferente Schenkel besteht aus Peyer'schen Plaques, Lymphfollikeln, M- sowie Epithelzellen. Zum efferenten Schenkel gehören intraepitheliale und mukosale Lymphozyten (Atkins & Furuta; 2010; Dignass; 2001). Die Interaktion der Epithelzellen mit diesen Lymphozyten ist ein integraler Teil der angeborenen und adaptiven Immunantwort im Darm. Die Expression von Haupthiston-Kompatibilitätsmolekülen befähigt intestinale Epithelzellen zur Stresskommunikation und Antigenpräsentation. Darüber hinaus findet man co-stimulatorische Moleküle, Mustererkennungsrezeptoren, polymere Immunglobulin (Ig)-Rezeptoren, neonatale Fc-Rezeptoren und Zytokinrezeptoren. Sie besitzen außerdem die Fähigkeit Zytokine, Chemokine oder auch Lipidmediatoren zu produzieren, so dass diesen Grenzflächenzellen eine hohe Immunkompetenz zugeschrieben wird (Clavel & Haller; 2007). Das GALT enthält zudem als spezifische zelluläre Komponenten noch Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen. Diese können chemotaktisch Zellen des spezifischen Immunsystems anlocken und durch die Präsentation von Antigenen die Phagozytoseeffizienz von den Zellen des unspezifischen Immunsystems verbessern (Wittig & Zeitz; 2003).

Pattern recognition receptors (PRR)

PRRs sind eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, sie erkennen pathogene Mikroorganismen über spezifische Strukturen, die sogenannten Pathogen associated molecular patterns (PAMP), welche ausschließlich in Mikroorganismen und nicht auf körpereigenen Zellen vorkommen. Auf apathogenen Bakterien werden diese als Microbe associated molecular patterns (MAMP) bezeichnet (Lavelle et al., 2010). PRRs sind als Auslöser einer komplexen Signalkaskade wesentlich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt. Lösliche PRRs wie z. B. Mannose-bindendes Lektin, C-reaktives Protein und Serum-Amyloid Protein werden von der Leber als akute Immunantwort in der frühen Phase der Infektion produziert und sekretiert (Janeway,

Jr. & Medzhitov; 2002). PRRs können des Weiteren oberflächengebunden oder intrazellulär vorliegen, wie beispielsweise die sogenannten Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Rezeptoren, welche bakterielles Peptidoglykan erkennen (Meylan et al., 2006).

Toll-like Rezeptoren

Die am besten untersuchten oberflächengebundenen PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLR). Diese Typ-I-integralen Glykoproteine liegen an der Zelloberfläche der Plasmamembran oder intrazellulär im endosomalen Kompartiment vor. Sie weisen in unterschiedlicher Ausprägung Leucin-reiche Wiederholungssequenzen (Leucine rich repeats (LRR)) auf. Bisher wurden 11 humane TLRs beschrieben, die Spezies-unabhängig virale Nukleinsäuren, unterschiedliche bakterielle Bestandteile oder Bestandteile von Pilzen erkennen (siehe Tabelle 1. 1; (Kumar et al., 2009; Mogensen; 2009)). Die Liganden von TLR10 sind bisher jedoch unbekannt.

Tabelle 1. 1 Erkennung von mikrobiellen Komponenten durch humane Toll-like Rezeptoren, modifiziert nach Mogensen (2009) und Kumar et al. (2009).

Rezeptor	Ligand	Zelluläres Kompartiment
TLR1	Tri-Acyl-Lipopeptide	Plasmamembran
TLR2	Lipoproteine, Glykolipide, Lipoglykane, Zymosan	Plasmamembran
TLR3	doppelsträngige RNA	Endosomales Kompartiment
TLR4	Lipopolysaccharide, Mannan, Hüllglycoproteine	Plasmamembran
TLR5	Flagellin	Plasmamembran
TLR6	Lipoteichonsäuren, Di-Acyl- Lipopeptide,	Plasmamembran
TLR7	einzelsträngige RNA	Endosomales Kompartiment
TLR8	einzelsträngige RNA	Endosomales Kompartiment
TLR9	unmethylierte CpG-DNA	Endosomales Kompartiment
TLR11	bakterielles Profilin	Plasmamembran

Eine Untergliederung der TLRs kann aufgrund ihrer zellulären Lokalisierung und den zugehörigen Liganden erfolgen. Eine Gruppe besteht aus den TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11, welche alle auf der Zelloberfläche exprimiert werden und hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten wie Lipide, Lipoproteine und Proteine erkennen. Dabei liegt bei TLR2 die Besonderheit vor, dass dieser Rezeptor mit TLR1 oder TLR6 ein Heterodimer ausbildet, sodass TLR1/TLR2 bzw. TLR6/TLR2 Komplexe entstehen. Die andere Gruppe der TLRs beinhaltet die TLRs 3, 7, 8 und 9, welche ausschließlich in intrazellulären Vesikeln im endosomalen Kompartiment exprimiert werden und mikrobielle Nukleinsäuren erkennen (Kawai & Akira; 2010).

TLRs besitzen eine cytoplasmatische Signaldomäne, die konserviert zur Signaldomäne des Toll / Interleukin 1 (IL-1) Rezeptors (TIR-Domäne) ist (Bowie & O'Neill; 2000). Die über die LRR-Domäne erkannten PAMPs werden somit über die TIR-Domäne als immunstimulierende Signale an die intrazelluläre Umgebung übermittelt (Abb. 1. 1). Mit Ausnahme von TLR3 interagiert die TIR-Domäne des TLR mit der TIR-Domäne von MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88). MyD88 aktiviert die IL-1-Rezeptor-assoziierten-Kinasen (IRAK) 4, 1, 2 und M, was zur Aktivierung des Tumornekrosefaktor- α -assoziierten-Faktors-6 (TRAF6) führt (Kawai & Akira; 2010). TRAF6 aktiviert die beiden Kinasen I κ K α und I κ K β , diese bilden ein Dimer (I κ K), welches das inhibitorische Protein I κ B α phosphoryliert. Dieses Protein ist im Cytosol in einem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa B) gebunden und hemmt dessen Wirkung, indem es ihn dort festhält. Wird I κ B phosphoryliert, dissoziiert es von dem Komplex und wird schnell von Proteasomen abgebaut. Das nun freigegebene NF- κ B dringt in den Zellkern ein, bindet an verschiedene Promotoren der DNA und initiiert die Transkription proinflammatorischer Proteine, wie beispielsweise verschiedene Zytokine, Chemokine oder Adhäsionsmoleküle für die Migration von Entzündungszellen aus der Gefäßbahn. I κ B α wird resynthetisiert, um erneut seine inhibitorische Kontrollfunktion von NF- κ B aufzunehmen (Karin & Ben-Neriah; 2000; Kawai & Akira; 2010).

TRAF6 aktiviert über eine weitere Signalkaskade ebenfalls den MAPK (mitogen-activated protein-Kinase) Signalweg, der u. a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivatorprotein (AP)-1 und somit zur Bildung proinflammatorischer Proteine führt (Mogensen; 2009). TLR3 initiiert einen MyD88-unabhängigen, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)-abhängigen Signalweg, der außer-

dem auch noch bei TLR4 nachgewiesen werden konnte. TRIF aktiviert über eine Signalkaskade Interferon- und Interferon-induzierbare-Gene, sowie zusätzlich MAPK und das sogenannte „late phase“ NF- κ B (Kawai & Akira; 2010).

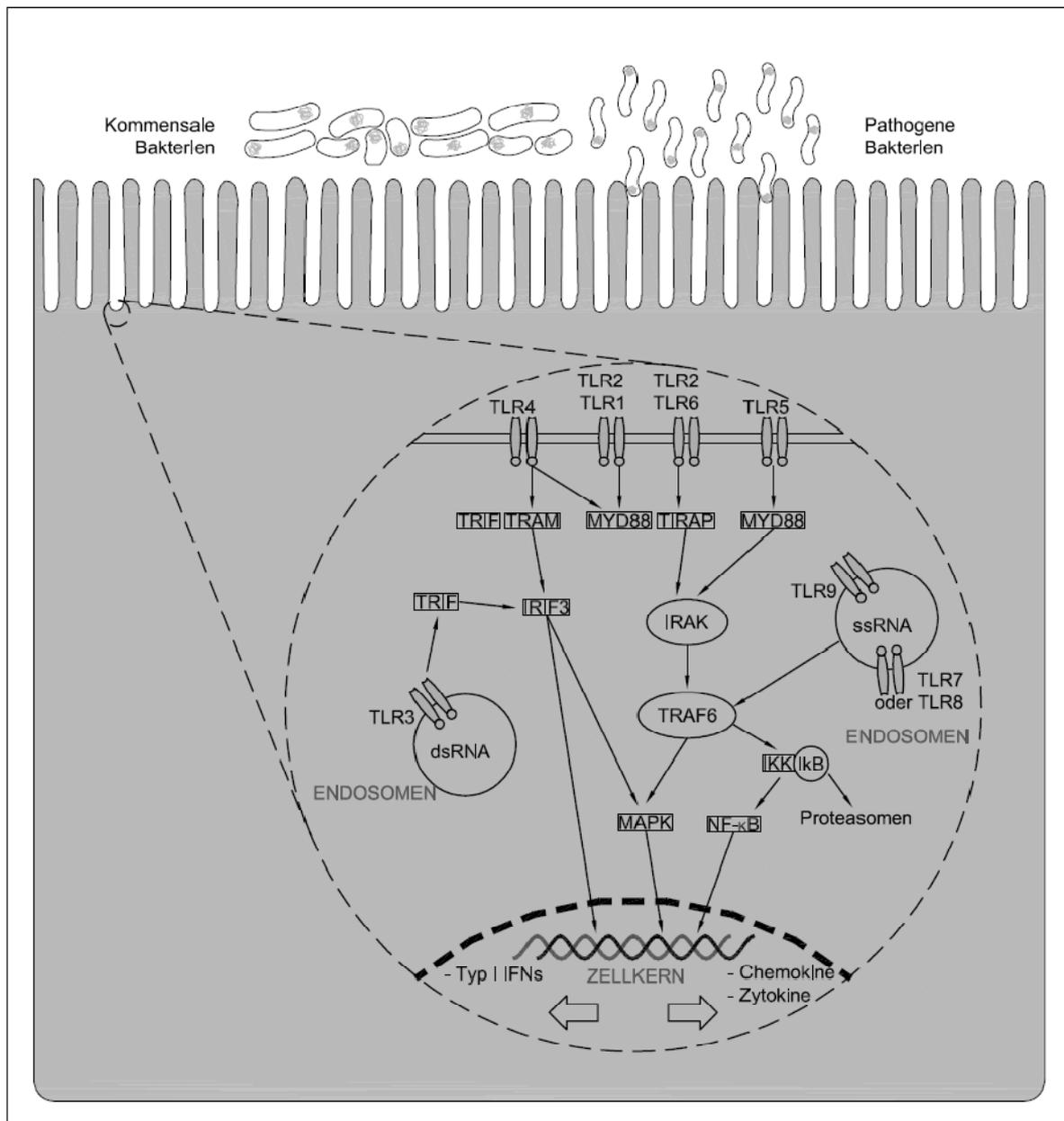


Abbildung 1. 1 Erkennung von Mikroorganismen auf der Oberfläche humaner Zellen durch TLRs. Die über die TLRs erkannten Liganden werden als immunstimulierende Signale an die intrazelluläre Umgebung übermittelt (modifiziert nach: Karin & Ben Neriah; 2000; Kawai & Akira; 2010; O'Hara & Shanahan; 2006).

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), IRAK (IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinasen); TRAF6 (Tumornekrosefaktor- α -assoziierten-Faktors-6); NF- κ B (Nuklearer Faktor kappa B); MAPK (mitogen-activated protein-Kinase); TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) IFNs (Interferone)

MAMPs kommensaler Bakterien aktivieren unter normalen Umständen nicht das humane Immunsystem, wobei die Ursache dafür bisher unbekannt ist. Eine Möglichkeit liegt im strukturellen Aufbau der MAMPs. Obwohl PAMPs und MAMPs, welche in konservierten Klassen bakterieller Makromoleküle präsent sind, eine gleiche Grundstruktur aufweisen, existieren zwischen den verschiedenen Bakterien-spezies feine strukturelle Variationen dieser Makromoleküle. Dies gilt insbesondere für Rezeptoren, die auf der bakteriellen Zellwand lokalisiert sind (Lebeer et al., 2010). Diese Variationen führen zu Unterschieden in der Interaktion von PRRs und potentiellen Co-Rezeptoren. Das bedeutet, dass ein Makromolekül einer Spezies als Agonist für einen bestimmten PRR gilt, wohingegen das gleiche Makromolekül einer anderen Spezies Antagonist für den gleichen PRR sein kann (Andersen-Nissen et al., 2005). So werden beispielsweise Fimbrien über den PRR TLR4 erkannt. Die Co-Rezeptoren des als probiotisch geltenden Stammes *E. coli* Nissle 1917 sind Mannose-Glykoproteine, wohingegen die Co-Rezeptoren des uropathogenen *E. coli* Stamm S1918 Glykosphingolipide sind (Fischer et al., 2006; Lebeer et al., 2010). Eine andere mögliche Ursache dafür, dass MAMPs kommensaler Bakterien das Immunsystem nicht aktivieren, könnte die Produktion antimikrobieller Proteine (durch Paneth'sche Zellen der Mukosa) und die Sekretion von Kommensalen-spezifischem IgA in das intestinale Lumen sein. Ebenfalls wird die Möglichkeit diskutiert, dass die bisher unzureichend charakterisierte kommensale Mikroflora eine geringere Konzentration an MAMPs exprimiert oder deren Rezeptoren eine geringere biologische Potenz aufweisen (Didierlaurent et al., 2002).

1.2 Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) Stämme sind Verursacher einer oft hämorrhagischen Kolitis (HC), wobei zusätzlich schwere extraintestinale Komplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auftreten können (Nataro & Kaper; 1998). Infektionen mit EHEC O157:H7 wurden erstmals Anfang 1980 im Zusammenhang mit zwei Ausbrüchen von HC in den USA beschrieben. Die Erkrankung konnte auf den Verzehr von nicht durchgegartem Hamburgern zurückgeführt werden (Riley et al., 1983).

EHEC bilden Zytotoxine, da diese zytopathisch auf Verorzellen (Nierenzellen der grünen afrikanischen Meerkatze) wirken, entstand der Begriff der Verotoxinproduzierenden *E. coli* (VTEC). Aufgrund der Verwandtschaft des Toxins mit dem Exotoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 werden EHEC heute als eine Untergruppe der Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) bezeichnet. Die Bezeichnung EHEC umfasst alle humanpathogenen Stämme, welche eine HC oder ein HUS verursachen, die Fähigkeit besitzen Shiga Toxin zu produzieren und sogenannte „Attaching and Effacing“ (A/E)-Läsionen an Epithelzellen auszubilden, sowie ein ca. 60 MDa großes Plasmid tragen, welches weitere Virulenzfaktoren kodiert (Nataro & Kaper; 1998).

Die EHEC-Erkrankung ist charakterisiert durch die sehr enge Anhaftung der Erreger an die Darmenterozyten mit lokaler Veränderung der Struktur und nachfolgender toxinbedingter Sekretion von Elektrolyten und Flüssigkeit. Neben anderen Signalprozessen induzierten EHEC die Aktivierung von MAP-Kinasen und von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B und AP-1), dies führt zur Bildung und Sekretion von Chemokinen wie beispielsweise Interleukin-8 (IL-8) welches positiv chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt (Ceponis et al., 2005).

In den letzten beiden Jahrzehnten verursachten vor allem EHEC vom Serotyp O157:H7 weltweit viele Krankheitsausbrüche, aber auch andere Serotypen einschließlich O26:H11, O103:H2, O111:NM und O145:NM sind potentielle Verursacher von lebensmittelübertragenen Infektionen und HUS (Zoja et al., 2010). In Deutschland kommt es zudem häufig zur Ausbildung eines HUS nach Infektion mit dem Sorbitol-fermentierenden Serotyp O157:NM (Karch & Bielaszewska; 2001). Das Robert Koch Institut hat für das Jahr 2009 835 EHEC-Erkrankungen (ohne HUS-

Fälle) in Deutschland registriert, dabei betrafen 44 % der Erkrankungen Kinder unter 5 Jahren. In 263 Fällen wurden Angaben zum Serotyp der Erreger gemacht, davon gehörten 20 % zum Serotyp O26, 17 % zum Serotyp O157 und 13 % zum Serotyp O103. Zusätzlich wurden 66 Fälle von EHEC-induziertem HUS registriert, dabei betraf 71 % der Erkrankungen Kinder unter 5 Jahren. Bei 36 Fällen ist der Serotyp bekannt, in 26 Fällen (72 %) wurden EHEC der Serogruppe O157 nachgewiesen, in 4 Fällen O145 und in 3 Fällen O26. Die Serogruppen O57, O111 bzw. „andere/sonstige“ wurden in jeweils einem Fall nachgewiesen (Robert Koch Institut; 2010).

1. 2. 1 Pathogenitätsfaktoren

Für die hohe Virulenz von EHEC sind sowohl extrazelluläre Produkte, als auch die sehr enge Anheftung des Erregers durch sogenannte „Attaching and Effacing“ (A/E)-Läsionen an Epithelzellen zu benennen (Nataro & Kaper; 1998).

Shiga Toxine

Shiga Toxine (Stx) gelten aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität als Hauptvirulenzfaktoren der EHEC. Sie werden in Stx-1, welches bis auf eine veränderte Aminosäure identisch zum Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ I ist, und in Stx-2, welches eine 50 %ige Homologie zu Stx-1 aufweist, unterschieden (Noris & Remuzzi; 2005). Trotz ihrer Sequenzähnlichkeit verursachen Stx-1 und Stx-2 verschiedene Grade und Arten der Gewebeerstörung. So werden Stx-2 bildende EHEC häufiger bei Patienten mit HUS nachgewiesen, als Stx-1 Varianten (Taylor; 2008).

Stx sind Holotoxine, die aus einer A-Untereinheit (32 kDa) und fünf identischen B-Untereinheiten (je 7,7 kDa) aufgebaut sind. Die A-Untereinheit setzt sich zusammen aus der enzymatisch aktiven A1-Untereinheit und der A2-Untereinheit, welche die nicht-kovalente Bindung an die B-Untereinheiten vermittelt. Die B-Untereinheiten bilden zusammen ein Pentamer, welches an Oberflächenstrukturen von Wirtszellen binden kann. Die für das Stx kodierenden Gene sind im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen (ca. 42,6 bis 62,7 kb) lokalisiert und können, stimuliert durch Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Antibiotika oder UV-Licht, von dem lysogenen in den lytischen Lebenszyklus übergehen (O'Loughlin & Robins-Browne; 2001).

Stx werden im Darm von polarisierten gastrointestinalen Zellen über transzellulären Transport aufgenommen. Die B-Untereinheiten der Stx-Moleküle binden an den eukaryontischen Membranrezeptor Globotriaosylceramid (Gb3), welcher auf der Oberfläche von renalen glomerulären Endothelzellen, und tubulären Epithelzellen, aber auch Monozyten, polymorph-kernigen Zellen und Thrombozyten, exprimiert wird. Dies ermöglicht den Transport des Stx über den Blutkreislauf zu den verschiedenen Organen. In der Zelle gelangt Stx durch retrograden Transport über das Golgi-System zum Endoplasmatischen Retikulum, wobei die A- und B-Untereinheiten dissoziieren (Noris & Remuzzi; 2005). Die A-Untereinheit gelangt über Translokation in das Zytoplasma, dort inhibiert sie die Proteinbiosynthese durch Hydrolyse eines Adenins aus dem 28S rRNA-Fragment der ribosomalen 60S-Untereinheit (Scheiring et al., 2008). Es kommt zum programmierten Zelltod der Wirtszelle durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, der Aktivierung von Caspasen und der Degradierung des DNA-Reparaturenzyms Poly ADP Ribose Polymerase (PARP). Als Folgeschäden treten kapillare Endothelschäden auf, hiervon besonders betroffen ist die humane Niere. Durch die Bildung großer Mengen des Rezeptors Gb3 gilt dieses Organ als Hauptangriffsort für Stx, so dass es zu akutem Nierenversagen kommen kann. Bei Monozyten und polymorph-kernigen Zellen wird durch Stx die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, vor allem Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimuliert. TNF- α führt dabei zur erhöhten Expression von Gb3, wodurch eine höhere Bindungskapazität für Stx entsteht (O'Loughlin & Robins-Browne; 2001).

Attaching und Effacing (A/E)-Läsionen

EHEC O157:H7 besitzt ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), welches auf einer Pathogenitätsinsel kodiert ist, dem sogenannten "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE). Bei der Infektion der eukaryontischen Zelle werden zunächst A/E-Läsionen ausgebildet, wobei eine lokale Zerstörung des Bürstensaums des Darmepithels stattfindet (Frankel et al., 1998; Knutton et al., 1987). Die ebenfalls LEE-kodierten *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gene steuern die Bildung von Intimin, ein als Adhäsion fungierendes äußeres Membranprotein. Über das T3SS werden verschiedene Effektorproteine in das Cytosol der infizierten eukaryontischen Zelle injiziert. Eines dieser Effektorproteine ist Tir (translocated intimin receptor), welches in die Wirtszellmembran integriert wird und als Rezeptor für Intimin fungiert. Es entsteht

eine irreversible Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle. Zusätzlich bewirkt Tir durch Interaktion mit Komponenten des Cytoskeletts und durch Veränderung des Metabolismus der Wirtszelle eine Umorganisation des Zytoskeletts, so dass eine aktinreiche, sockelartige Struktur unterhalb des Bakteriums gebildet wird (Dean et al., 2005; Garmendia et al., 2005). Weitere Effektorproteine sind beispielsweise das Mitochondrium assoziierte Protein (Map), welches Mitochondrien schädigt, sowie EspF, welches zu einer erhöhten Permeabilität der Darmmukosa führt und bei Mitochondrien Apoptose auslösen kann.

Weitere Virulenzfaktoren

Ein weiteres phagencodiertes Toxin ist das „Cytolethal distending toxin“ V (CDT-V), es wirkt direkt im Zellkern und unterbricht die Mitose von humanen Endothelzellen in der G2/M-Phase. Durch die Hemmung der Zellteilung kommt es zum Tod der Wirtszelle (Bielaszewska et al., 2005; Janka et al., 2003).

Alle EHEC O157:H7 Isolate klinischen Ursprungs tragen ein hoch konserviertes Virulenzplasmid (pO157), in der Größe von 92 – 104 kb (Lim et al., 2010). Einer der plasmidkodierten Virulenzfaktoren ist Enterohämolysin, wobei das Gen *hlyA* innerhalb der verschiedenen EHEC-Serogruppen weit verbreitet ist (Prager et al., 2005). Durch die Ausbildung von Ionenkanälen im Phospholipidbilayer der eukaryontischen Zellmembran entstehen Poren und es kommt zur Lyse der Erythrozyten (Schmidt et al., 1996). Dadurch steht den EHEC freies Häm als Eisenquelle zur Verfügung, welches vermutlich für verbessertes Wachstum genutzt werden kann (Nataro & Kaper; 1998).

Das Gen *katP* liegt ebenfalls auf dem pO157 und codiert für eine Katalase-Peroxidase (Brunner et al., 1996), deren enzymatische Aktivität sowohl im Zytoplasma als auch im periplasmatischen Raum nachgewiesen werden konnte. Durch die Reduzierung von oxidativem Stress und durch die Nutzung des als Nebenprodukt anfallenden Sauerstoffs wird vermutlich die Kolonisierung von EHEC im sauerstoffarmen Darm des Wirts gefördert (Lim et al., 2010).

Ein weiteres pO157 codiertes Gen ist *EspP*, welches für eine Serinprotease codiert (Brunner et al., 1997). Dieses extrazelluläre Enzym kann sowohl Pepsin A als auch den humanen Koagulationsfaktor V spalten, was zu einer verzögerten Blutgerinnung und somit zu mucosalen Blutungen, welche oft bei Patienten mit hämorrhagischer Kolitis beobachtet werden, führen kann.

Weiterhin werden auf dem pO157 unter anderem Gene für ein Typ-II-Sekretions-system (*etp*), für Metalloproteasen (*stcE*) und für weitere Adhäsionsfaktoren wie z. B. *toxB* codiert, welche zu der hohen Virulenz der EHEC beitragen (Lim et al., 2010).

1. 2. 2 Reservoir und Übertragung

Als Hauptreservoir von EHEC gelten Wiederkäuer, vor allem Rinder, wobei die Tiere im Allgemeinen asymptomatisch sind. Ebenfalls wurde bei Schafen, Ziegen, Schweinen und Truthähnen *E. coli* O157:H7 in den Fäzes nachgewiesen (Lim et al., 2010). Die Übertragung von EHEC erfolgt hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel. In einer Studie über 350 Fälle von *E. coli* O157 Infektionen in den USA im Zeitraum von 1982-2002, wurden 52 % der Fälle durch kontaminierte Lebensmittel, 14 % durch Schmierinfektionen, 6 % durch Badewasser und jeweils 3 % durch Trinkwasser oder Tierkontakt verursacht (Rangel et al., 2005). In 21 % der Fälle konnte der Übertragungsweg nicht festgestellt werden. Vor allem Hackfleisch (41 %) sowie unzureichend gegartes Rindfleisch (6 %), Rohmilch und Rohmilchprodukte (4 %) sind häufig mit *E. coli* O157:H7 kontaminiert. Bei 21 % der Fälle, sind Produkt-assoziierte Ausbrüche, wobei vor allem kontaminierter Salat und Apfelsaft als Ursache angegeben wurden. Bei Produkt-assoziierten Fällen ist die Ursache häufig auf unzureichende Hygiene bei der Speisenzubereitung zurückzuführen, so dass es zu Kreuzkontaminationen kommt. Des weiteren wurde von Mensch zu Mensch, sowie von Tier zu Mensch-Übertragungen berichtet (Rangel et al., 2005).

In der Literatur wird für EHEC O157 eine sehr geringe Infektionsdosis von <100 Keimen angegeben (Nataro & Kaper; 1998). Zudem besitzen EHEC eine ausgeprägte, stammabhängige Säureresistenz und überleben pH-Werte von 1,5 bis 2,5, wie sie beispielsweise im menschlichen Magen vorkommen (Foster; 2004).

1. 2. 3 Krankheitsverlauf / Klinik

Durchschnittlich 2-5 Tage nach oraler Infektion mit EHEC treten nicht-blutige, wässrige Durchfälle auf, welche von Übelkeit, Erbrechen, schmerzhaften Darmkoliken und seltener leichtem Fieber begleitet werden. Der wässrige Durchfall heilt in leichteren Fällen unbehandelt innerhalb einer Woche ab, bei 10-20 % der Patienten entwickelt sich jedoch eine hämorrhagische Kolitis mit krampfartigen Abdominalschmerzen, blutigem Stuhl und teilweise Fieber.

Die Symptome der EHEC-assoziierten HUS-Erkrankung beginnen ungefähr 7 Tage nach Erkrankungsbeginn und somit nach Abklingen der Darmsymptome. Etwa 10-15 % der Patienten, vor allem Kinder unter 6 Jahren und alte Menschen, entwickeln eine schwere Komplikation, das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). Es ist gekennzeichnet durch hämolytische Anämie, einer niedrigen Anzahl von Blutplättchen (Thrombozytopenie) und durch akutes Nierenversagen (Noris & Remuzzi; 2005; Scheiring et al., 2010; Taylor; 2008). Durch die glomeruläre Nierenschädigung kommt es zu einem starken Anstieg der harnpflichtigen Substanzen und somit zu einer Anurie und Elektrolytentgleisung. Dadurch kommt es häufig zu einer kurzzeitigen Dialysepflicht, seltener zum irreversiblen Nierenfunktionsverlust mit chronischer Dialyse. Die Letalität bei Kindern die an HUS erkranken liegt bei 3 – 5 % (Nataro & Kaper; 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass zwischen inflammatorischen Serumparametern und einem erhöhten HUS-Risiko Zusammenhänge bestehen. So gelten niedrige Mengen an Neopterin und Interleukin-10 sowie gleichzeitig erhöhte Mengen an Interleukin-8 bei EHEC-infizierten Kindern als Indikator dafür, HUS aus der vorhergehenden Diarrhö zu entwickeln (Westerholt et al., 2000).

Weitere Merkmale einer HUS-Erkrankung sind die Fragmentierung der Erythrozyten, der dadurch bedingte akute Abfall von Häm- und Haptoglobin und ein deutlicher Anstieg der Lactatdehydrogenase im Blut (Scheiring et al., 2008).

Die Schädigung kapillärer Endothelzellen mit Bildung intravaskulärer Mikrothromben kann auch in anderen Organen auftreten und zur thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) führen. Dabei tritt TTP häufiger bei Erwachsenen als bei Kindern auf. Die pathologischen Merkmale von TTP sind im wesentlichen mit denen von HUS identisch, jedoch sind die Patienten häufiger fiebrig und zeigen neurologische Symptome, es kommt zu zerebralen Krampfanfällen mit bleibenden neurologischen Schäden (Paton & Paton; 1998).

1. 2. 4 Therapie

Zur Behandlung von EHEC-Infektionen steht gegenwärtig keine kausale Therapie zur Verfügung. Der Einsatz von Antibiotika wird kontrovers diskutiert (Goldwater; 2007), da diese zur verstärkten Toxinfreisetzung von im Darmlumen vorhandenen EHEC führen kann. Durch die Schädigung der kommensalen Darmflora kann es zudem zu einer erhöhten systemischen Absorption von Toxinen kommen und extraintestinale

Komplikationen begünstigen. Das Risiko ein ausgeprägtes HUS zu entwickeln steigt um das 17-fache (Noris & Remuzzi; 2005). Als ebenfalls kontraindiziert gelten Medikamente, welche die Darmmotilität hemmen und dadurch zu einer verlängerten Ausscheidung der Pathogenen führen.

Die Behandlung erfolgt daher symptomatisch. Vor allem der Ausgleich der Flüssigkeits- und Elektrolyt-Defizite gilt als wichtig, um der späteren Dialysenotwendigkeit vorzubeugen. Bei 70 % der HUS-Patienten ist eine Transfusion mit Erythrozyten notwendig, 50 % benötigen Dialyse und 25 % zeigen neurologische Symptome einschließlich Schlaganfall, Epilepsie und Koma. Bei Patienten mit extra-renalen Komplikationen stellt die Therapie durch Plasmapherese oder mit gefrorenem Frischplasma eine Alternative dar, allerdings sind hierzu bisher keine klinischen Studien vorhanden. (Noris & Remuzzi; 2005; Scheiring et al., 2010; Taylor; 2008). Zu den wichtigsten Spätfolgen des HUS gehören Nierenerkrankungen. Bei einer Studie mit 45 Kindern, welche über 9-11 Jahre nach der HUS-Erkrankung begleitet wurden, zeigten sich durch die frühe Einschränkung von Proteinen und der Einsatz von Angiotensin-konvertierenden Enzym-Inhibitoren positive Effekte. Es wurden weniger Rückfälle bzw. Neigungen beobachtet, Nieren-Spätfolgeschäden zu entwickeln (Caletti et al., 2004).

Durch das Fehlen einer geeigneten Therapie zur Behandlung von EHEC-Infektionen, stellt die Prävention die wichtigste Maßnahme dar. Die Einhaltung von Hygienemaßnahmen bei der Herstellung, der Lagerung, dem Transport, dem Verkauf und der Zubereitung von Lebensmitteln und Speisen tierischer Herkunft, sowie von anderen landwirtschaftlichen Produkten die fäkal kontaminiert sein könnten, ist unerlässlich. Der Verzehr von Rohmilch und unzureichend gegartem oder rohem Rindfleisch stellt vor allem für Kleinkinder, ältere Menschen, Schwangere und immunsupprimierte Personen eine Risiko-Infektionsquelle dar. Um Schmierinfektionen vorzubeugen, ist bei Kontakt mit infizierten Personen eine strikte Händehygiene notwendig. Der Nachweis von EHEC, sowie der Krankheitsverdacht, die Erkrankung oder der Tod an HUS sind entsprechend des deutschen Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig. Des Weiteren dürfen Personen unter EHEC-Verdacht keine Tätigkeiten in Gemeinschaftsküchen ausüben (Robert Koch Institut; 2008).

Es werden verschiedene neue Therapieansätze zur Bekämpfung von EHEC-Infektionen erforscht, vor allem zur Inaktivierung von Shiga Toxinen im Darm. Mittels humaner monoklonaler Antikörper, welche spezifisch die A-Untereinheit des Stx-2 erkennen, konnte in Zellkulturversuchen (HeLa) sowie in Mäuseversuchen die RNA-N-Glykosidaseaktivität des Stx-2 neutralisiert werden (Jeong et al., 2010). Weitere Möglichkeiten können in der Entwicklung von synthetischen, toxinbindenden Substanzen oder in dem Einsatz von probiotische Bakterien liegen (Britton & Versalovic; 2008; Zoja et al., 2010). Auch gentechnisch veränderte probiotische Bakterien präsentieren eine neue vielversprechende Therapie. Durch das Einbringen eines Lipopolysaccharides in einen nicht-pathogenen *E. coli*-Stamm, konstruierten Paton et. al (2000) einen Bakterienstamm, welcher in der Lage ist Shiga Toxin zu binden. Dieser gentechnisch veränderte Stamm weist eine Shiga Toxin-Rezeptor-imitierende terminale Trisaccharidsequenz auf, so dass Mäuse, welche mit diesem Stamm kolonisiert wurden, vor Infektionen mit den Shiga Toxin 2-bildenden EHEC Stämmen 97MW1 und 98NK2 (O113:H21) geschützt waren (Paton et al., 2000; Paton et al., 2001).

1.3 Probiotika

Probiotika sind definiert als lebende Mikroorganismen, die wenn sie in adäquaten Mengen aufgenommen werden, einen gesundheitsfördernden Effekt auf den Wirt ausüben (FAO/WHO; 2001). Obwohl bei bestimmten Probiotika die Wirksamkeit festgestellt werden konnte, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch unzureichend erforscht. Potentielle Wirkungsmechanismen probiotischer Bakterien bestehen beispielsweise in der Stärkung der epithelialen Barrierefunktion, in metabolischen Effekten, in einer Veränderung in der Zusammensetzung der mikrobiellen Flora im Darm oder auch in immunmodulatorischen Effekten (Sherman et al., 2009).

Probiotika lassen sich nach ihrer Herkunft in zwei Gruppen unterteilen, zum einen in Mikroorganismen, die eine lange Tradition der Anwendung als Starterkulturen besitzen und zum anderen in Mikroorganismen, die aus der Darmflora gesunder Probanden isoliert wurden. Sie finden vielfältige Anwendung beispielsweise in der medizinischen Anwendung, im Lebensmittel- und im Tierfuttermittelbereich (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro; 2010).

Im Handel erhältliche Probiotika besitzen ein hohes Sicherheitsprofil, sie entsprechen dem sogenannten GRAS (generally regarded as safe)-Status. Dabei ist unter anderem entscheidend, dass Probiotika nicht die Fähigkeit zur Translokation besitzen und keine Virulenzfaktoren aufweisen. Die Wirtstoleranz ist normalerweise exzellent, wobei jedoch in seltenen Fällen bei immunsupprimierten Patienten über Infektionen berichtet wurde, welche durch probiotische Bakterien der Genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, und *Bifidobacterium* verursacht wurden (Liong; 2008).

1.3.1 Taxonomische Einordnung

Die meisten der im Handel befindlichen probiotischen Bakterienstämme gehören zu der Gruppe der Milchsäurebakterien (Ordnung *Lactobacillales*), wobei insbesondere bestimmte Stämme der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Enterococcus* mit probiotischen Effekten in Verbindung gebracht werden. Außerhalb der Gruppe der Milchsäurebakterien wurden vor allem für bestimmte Stämme der Gattung *Bifidobacterium* probiotische Effekte gezeigt. Des Weiteren sind einzelne

Stämme verschiedener Spezies als probiotisch wirksam bekannt wie beispielsweise der Stamm *Saccharomyces boulardii* oder auch *Escherichia coli* Nissle 1917 (Iannitti & Palmieri; 2010).

Milchsäurebakterien

Der Begriff Milchsäurebakterien umfasst eine heterogene Gruppe grampositiver, meist unbeweglicher, kokken- und stäbchenförmiger Bakterien. Sie weisen einen niedrigen GC-Gehalt auf, sind Katalase-negativ, bilden keine Endosporen aus und bilden als Stoffwechselhauptprodukt Milchsäure (Hammes & Hertel; 2009). Die Ordnung der *Lactobacillales* umfasst die Familien *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae* und *Leuconostocaceae* (Ludwig et al., 2009), wobei die drei erstgenannten zu den wichtigen im menschlichen Darm vertretenen Milchsäurebakteriengattungen zählen. Da ihnen Porphyrine und Cytochrome in der Atmungskette fehlen, ist die Energiegewinnung nur über Gärung möglich. Homofermentative Arten vergären Zucker ausschließlich zu Milchsäure. Heterofermentative Arten vergären Zucker zu Milchsäure, Ethanol und/oder Acetat und CO₂, da durch das Fehlen der Enzyms Aldolase und Triosephosphat-Isomerase Zucker nicht über die Glykolyse, sondern über den Phosphoketolase-Weg umgesetzt werden (Kandler; 1983).

Milchsäurebakterien sind ubiquitär verbreitet. Schon seit der Jungsteinzeit werden sie zur Konservierung, aber auch zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet. In der modernen Lebensmitteltechnologie finden Sie in vielen verschiedenen Bereichen bewusst als Starterkulturen Einsatz, beispielsweise in der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen und Sauerkraut, bei der Silageproduktion oder auch bei der Konservierung von Fleisch und Fisch (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro; 2010).

Bifidobakterien

Die Gattung *Bifidobacterium* besitzt eine starke physiologische Verwandtschaft zu den Milchsäurebakterien, ist aber auf phylogenetischer Basis mit den eigentlichen Milchsäurebakterien nur entfernt verwandt. Milchsäurebakterien zählen zu der Abteilung der *Firmicutes*, Bifidobakterien jedoch zu der Abteilung der *Actinobacteria*. Die grampositiven, unbeweglichen, häufig keulenförmigen Stäbchen, weisen einen hohen GC-Gehalt auf und bilden keine Sporen aus (Lee & O'Sullivan; 2010). Da sie das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nicht besitzen, werden Zucker über

den sogenannten „Bifidum Pathway“ zu Essigsäure und Milchsäure abgebaut (de Vries & Stouthamer; 1968). Bifidobakterien gelten als typische Mikroflora des humanen und tierischen (Säugetiere, Vögel, Honigbiene) Intestinaltrakts (Ventura et al., 2004). Dabei dominieren Bifidobakterien vor allem die Darmflora von gestillten Säuglingen, wobei sich diese Dominanz auf besondere Inhaltsstoffe der Muttermilch zurückführen lassen. Diese enthält eine Oligosaccharid-Mischung hoher struktureller Diversität (human milk oligosaccharides), welche bevorzugt das Wachstum der Bifidobakterien stimuliert. Durch die von den Bifidobakterien gebildeten Abbauprodukte Acetat und Lactat entsteht im Darm ein saures Milieu, welches den Bakterien einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen verschafft (Zivkovic et al., 2010).

1. 3. 2 Mechanismen der probiotischen Wirkung

Um ihre gesundheitsfördernde Wirkung für den Wirt entfalten zu können, müssen probiotische Bakterien verschiedene Anforderungen erfüllen. Sie müssen zunächst einmal die Passage durch den Magen-Darm-Trakt überleben und damit eine hohe Säure- und Gallentoleranz aufweisen. Anschließend müssen sie eine hohe Anpassungsfähigkeit an das Darmepithel aufweisen und sollten in der Lage sein, im Darm zu kolonisieren, so dass sie die ihnen zugeschriebenen Effekte ausüben können (Pineiro & Stanton; 2007). Dabei spielt die Fähigkeit an das Darmepithel bzw. den Mucus zu adhären eine große Rolle. Hierbei sind vor allem an der Zelloberfläche vorhandene Proteine (sortase-abhängige Proteine, Mucus-bindende Proteine, Surface-(S)-Layer-Proteine), Lipoteichonsäuren (LTS) und Exopolysaccharide (EPS) von Bedeutung (Lebeer et al., 2008).

Die gesundheitsfördernden Effekte der Probiotika können in drei Hauptmechanismen unterteilt werden, in (I) Bakterien-Bakterien-Interaktionen, in den (II) Schutz der epithelialen Barrierefunktion und in (III) immunomodulatorische Effekte. Die molekularen Grundlagen dieser Wirkmechanismen sind bisher nur ansatzweise verstanden, zumal viele Erkenntnisse auf *in vitro* durchgeführten Experimenten beruhen und durch entsprechende Studien *in vivo* auf ihre Validität geprüft werden müssen.

Bakterien-Bakterien-Interaktionen

Die Wirkung probiotischer Bakterien kann auf einem direkten Effekt auf andere, sowohl kommensale als auch pathogene, Mikroorganismen beruhen. Manche

Stämme bilden antimikrobielle Faktoren wie beispielsweise Bacteriocine, wodurch das Wachstum und die Virulenz von Pathogenen gehemmt werden (Sherman et al., 2009). Einige der probiotischen Stämme sind in der Lage, Antibiotika zu synthetisieren. Für *L. reuteri* ATCC55730 beispielsweise konnte die Produktion von Reuterin gezeigt werden. Dieses besitzt ein breites Wirkspektrum und ist sowohl gegen Gram-positive, als auch gegen Gram-negative Bakterien aktiv (Cleusix et al., 2007).

Bei Stämmen des Genus *Lactobacillus* nimmt die Bildung von Milchsäure eine Schlüsselstellung ein. So konnte beispielsweise die starke antimikrobielle Aktivität von *L. rhamnosus* GG gegen *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium auf die Anreicherung von Milchsäure zurückgeführt werden (De Keersmaecker et al., 2006). Der genaue, hierbei zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt, wobei jedoch sicher ist, dass sowohl das Wachstum als auch die Expression von Virulenzfaktoren von *Salmonella* durch die Säure beeinflusst werden (Durant et al., 2000). Eine weitere Wirkungsweise der Milchsäure ist, neben der vor allem im Lebensmittelbereich zur Haltbarmachung eingesetzten pH-Wert Absenkung, die Permeabilisierung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, wodurch weitere Komponenten synergistisch mit der Milchsäure agieren können (Alakomi et al., 2000). Außerdem können organische Säuren für das Wachstum essentielle Elemente, wie beispielsweise Eisen, durch ihre komplexbildende Eigenschaft binden (Presser et al., 1997).

Eine weitere Bakterien-Bakterien Interaktion stellt das Quorum sensing dar, ein Mechanismus, bei dem einzellige Organismen miteinander kommunizieren. Es wird vermutet, dass Quorum sensing, die Genexpression von mikrobiellen Pathogenen beeinflusst und dadurch deren Virulenzpotential reduziert (Sherman et al., 2009). In Experimenten mit dem Stamm *L. acidophilus* LA-5 konnte gezeigt werden, dass durch von diesem Stamm sekretierte Faktoren, die Virulenz-Genexpression von EHEC O157:H7 beeinflusst wird. So wurde die Sekretion des Autoinducer-2 Moleküls des EHEC-Stammes durch die von *L. acidophilus* LA-5 sekretierten Faktoren reduziert, was wiederum in einer reduzierten Expression von LEE-kodierten Genen resultierte und somit die Ausbildung von A/E-Läsionen verhindert (Medellin-Pena et al., 2007; Russell et al., 2007).

Des Weiteren sind bestimmte probiotische Bakterien in der Lage, so genannte antimikrobiell wirksame, dekonjugierte Gallensäuren zu produzieren (Begley et al.,

2006) und durch die Bildung von H_2O_2 Einfluss auf Pathogene auszuüben (Cadieux et al., 2009). Ein anderer Mechanismus der diskutiert wird, ist der sogenannte Konkurrenzausschluss. In Zellkulturmodellen können probiotische Bakterien an Epithelzellen adhären und dadurch möglicherweise die Adhäsion von Pathogenen blockieren. Intestinale Pathogene wie Typ-1 begeißelte *E. coli* nutzen beispielsweise Oligosaccharid-Rezeptoren zur Adhäsion im Darm (Le Bouguenec; 2005), welche ebenfalls von probiotischen Bakterien genutzt werden. Bei der präventiven Einnahme von Probiotika könnten Pathogene sich daher nicht anlagern und die Invasion in die Darmzellen könnte verhindert werden (Lebeer et al., 2008).

Schutz der epithelialen Barriere

Probiotische Bakterien können die epitheliale Barriere durch mehrere Faktoren vor pathogenen Bakterien schützen. Der probiotische Stamm *L. helveticus* Stamm R0052 besitzt eine relativ hydrophobe Zelloberfläche. Durch sogenannte S-Layer, membranartige, aus Proteinen gebildete Oberflächenstrukturen, kann er unspezifisch an die Oberfläche von Epithelzellen binden und dadurch Effekte von bakteriellen Enteropathogenen auf die Wirtszelle reduzieren (Johnson-Henry et al., 2007).

Tight junction Proteine wie Beispielsweise Zona Occludin (ZO)-1 und Claudin-1 werden von Probiotika stabilisiert und verhindern sowohl die Aufnahme intakter Makromoleküle sowie die Translokation von lebenden Organismen zu den mesenterischen Lymphknoten. Der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 beispielsweise konnte in Experimenten die Epithelzellbarriere zerstörende Wirkung des enteropathogenen *E. coli* (EPEC) -Stamm E2348/69 verhindern, indem eine Änderung des Proteinkinase C-Signallings, das zu einer verstärkten Expression und einer Neuverteilung von ZO-2 in T84-Zellen führt, bewirkt wurde (Zyrek et al., 2007). ZO-2 ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt der Tight junction-Funktion im Darmepithel. Diese im Zellkulturmodell gezeigte Wirkung konnte im Tiermodell mit gesunden Mäusen und *E. coli* Nissle 1917 bestätigt werden, hier zeigte sich ebenfalls eine Induktion der Expression von ZO-2 sowie außerdem auch von ZO-1 (Ukena et al., 2007).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass der als probiotisch anerkannte Stamm *L. rhamnosus* GG die Internalisierung von EHEC O157:H7 in eine humane Epithelzelllinie unterdrückt (Hirano et al., 2003) und die Epithelzellen vor EHEC-induzierten Umlagerungen von Tight-junction-Proteinen schützt (Johnson-Henry et

al., 2008). Andere probiotische Bakterien wie der Stamm *L. acidophilus* A4 sind in der Lage, die Produktion und Sekretion von Muzinen in Darmepithelzellen (HT29) zu erhöhen. In den Zellkulturversuchen wurde dadurch die Adhäsion von *E. coli* O157:H7 an die HT29-Zellen signifikant inhibiert (Kim et al., 2008b).

Immunmodulation

Ein drittes Wirkprinzip von Probiotika ist die Modulation von Abwehrmechanismen des Wirts, sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Beeinflusst wird das Immunsystem durch verschiedene Komponenten wie Metabolite, Zellwandbestandteile oder DNA (Oelschlaeger; 2010). So haben einige probiotische Stämme zum Beispiel die Fähigkeit, die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen zu fördern und die Produktion von sekretiertem IgA zu steigern. IgA heftet sich an die Mucusschicht und bindet an pathogene Mikroorganismen, wodurch ihre Fähigkeit an das Darmepithel zu adhären gemindert wird (Corthesy et al., 2007).

Probiotika können ebenfalls die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B verhindern, was in einer herabgesetzten Chemokin-Sekretion resultiert. Es wurden sowohl in Zellkultur- als auch in Tiermodellen mehrere unterschiedliche Mechanismen beschrieben, durch welche probiotische Bakterien den NF- κ B Signalweg verändern können. Dazu gehört die Blockierung des Abbaus des Inhibitors I κ B durch die Blockierung der Ubiquitinierung desselben, durch Inhibition der epithelialen Proteasom-Funktion oder durch die nukleare Ausschleusung der NF- κ B -Untereinheit p65 durch einen Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) γ -abhängigen Weg (Kelly et al., 2004; Petrof et al., 2004). Gleichzeitig gibt es aber auch Berichte, dass einige probiotische Stämme hingegen NF- κ B aktivieren und dadurch erhöhte Mengen an pro-inflammatorischem IL-6 gebildet wurden (Boirivant & Strober; 2007) Nach Infektion mit enteropathogenen Keimen sezernieren Epithelzellen eine Reihe proinflammatorischer Zytokine (Eckmann et al., 1993; Jung et al., 1995). In einer Studie mit humanen Darmepithelzellen (HT29) konnte gezeigt werden, dass die Pathogen-induzierte Sekretion des Chemokins CCL20 durch den Einsatz von *B. infantis* 35624 verringert werden konnte (Sibartie et al., 2009).

Neben probiotischen Effekten auf Epithelzellen konnten zudem Effekte auf verschiedene Typen von Immunzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder auch

regulatorische T-Zellen gezeigt werden. Die angeborene Immunantwort schließt dabei die Produktion von antimikrobiellen Komponenten und die Sekretion von Zytokinen wie beispielsweise IL-8 mit ein (Lebeer et al., 2008).

1. 3. 3 Anwendung und Wirkungsweisen von Probiotika

Eine Vielzahl von probiotischen Anwendungen und Wirkungsarten sind beschrieben worden. In klinischen Studien zeigten beispielsweise *L. plantarum* DSM 15312 und *L. paracasei* DSM 13434 ihre Wirksamkeit gegenüber Erkältungssymptomen. Durch die Aufnahme von 10^9 KBE/Tag über 12 Wochen konnte die Häufigkeit an einer Erkältung zu erkranken signifikant verringert werden. Ebenfalls wurde die Anzahl an Tagen mit Erkältungssymptomen reduziert und zusätzlich der Proliferation von B-Lymphozyten entgegengewirkt (Berggren et al., 2010).

In einer Studie mit Kindern konnte die Wirkung von *L. rhamnosus* GG bei der Behandlung von akuter Diarrhö gezeigt werden. Bei Patienten, welche zusätzlich zur Rehydrierungsmaßnahme *L. rhamnosus* GG in Höhe von 10^{10} bzw. 10^{12} KBE/Tag über mindestens 7 Tage erhielten, sank die Häufigkeit und Dauer der Diarrhö signifikant ab. Zwischen den verschiedenen Dosierungen konnte dabei kein Unterschied festgestellt werden (Basu et al., 2009).

Weiter vielversprechende Ergebnisse wurden unter anderem in Studien mit verschiedensten probiotischen Bakterienstämmen zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Hedin et al., 2007), zur Behandlung von Lebererkrankungen (Gratz et al., 2010) und zur Prävention von Darmkrebs (Fotiadis et al., 2008; Rafter et al., 2007) gezeigt.

Eine Anwendungsmöglichkeit in der Kariesprophylaxe konnte für *L. paracasei* DSMZ 16671 gezeigt werden. In einer Studie mit dem Karieserreger *Streptococcus mutans* wurde durch Co-Aggregation der Bakterienstämme die orale Biofilmbildung auf Zahnoberflächen von Ratten signifikant verhindert, die Co-Aggregation konnte jedoch nicht mit *L. paracasei* DSMZ 16671 und oralen kommensalen Bakterien beobachtet werden (Lang et al., 2010; Tanzer et al., 2010).

Der genaue Wirkungsmechanismus und die molekularen Grundlagen der probiotischen Effekte sind dabei noch ungeklärt, aber höchst wahrscheinlich multifunktional und stammspezifisch (Borchers et al., 2009; Oelschlaeger; 2010). Kankainen et. al. (2009) konnten in einer komparativen Genomanalyse mit dem Stamm *L. rhamnosus* GG und einem nicht probiotischen *L. rhamnosus* LC705 Stamm zeigen, dass nur das

Genom von *L. rhamnosus* GG Gene zur Ausbildung von Mucus-bindenden Pili enthält. Die Autoren vermuten, dass diese Strukturen entscheidend für das bessere Adhäsionsvermögen des probiotischen Stammes im Vergleich zum nicht-probiotischen Stamm sind (Kankainen et al., 2009).

Des Weiteren kommt den Oberflächenstrukturen von Milchsäurebakterien wahrscheinlich nicht nur bei ihrer Adhäsionsfähigkeit, sondern auch bei ihrer probiotischen Wirksamkeit eine besondere Bedeutung zu. Prado *et al.* (2008) beschrieben eine Endopeptidaseaktivität von aufgereinigten Surface-Layer-Extrakten von *L. acidophilus* ATCC 4356, gegen die Zellwand von *Salmonella enterica* Serovar Newport. Hochaufgereinigte Lipoteichonsäuren (LTA) von *L. plantarum* KCTC10887BP zeigten antagonistische Effekte gegen die von *Staphylococcus aureus*-LTA induzierte TNF- α Produktion im Zellkulturmodell, wobei die Signaltransduktion über MyD88, NF- κ B und MAP-Kinasen stark reduziert wurde (Kim et al., 2008a).

Neben den beschriebenen probiotischen Mechanismen existiert zudem die Multi-Spezies-Probiotika-Hypothese. Multi-Spezies-Probiotika bestehen aus Stämmen verschiedener probiotischer Arten, die einer oder mehreren Gattungen angehören. Es wird vermutet, dass sich die stammspezifischen gesundheitsfördernden Wirkungen der einzelnen Stämme ergänzen und durch synergistische Effekte verstärkt werden. Dadurch ergibt sich ein breiteres Anwendungsspektrum der Probiotika bei der Behandlung bzw. Vorbeugung von Krankheiten (Timmerman et al., 2004). Famularo et al. (1999) konnten zeigen, dass andere Multi-Spezies-Probiotika erfolgreicher die Darmflora besiedeln, als einfache Probiotika. VSL#3, ein Präparat mit acht unterschiedlichen Milchsäurebakterien-Stämmen (*L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* und *S. thermophilus*), zeigte beispielsweise in klinischen Studien präventive Effekte auf die in der Krebsbehandlung durch Strahlentherapie-induzierte Diarrhoe (Visich & Yeo; 2010), sowie signifikant positive Effekte auf die Symptome des Reizdarmsyndroms bei Kindern (Guandalini et al., 2010). *In vivo* Versuche mit Darmepithelzellen zeigten, dass VSL#3 die durch eine Darmentzündung angegriffene epitheliale Barrierefunktion wiederherstellt, *in vitro* wird durch VSL#3 zudem die Bildung von TNF- α stimuliert und NF- κ B aktiviert (Pagnini et al., 2010).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkungen von 19 potentiellen probiotischen Bakterienstämmen der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Staphylococcus* mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) im Zellkulturmodell (HT29-Zellen). Dabei sollte zunächst der Einfluss der untersuchten Bakterien auf Darmepithelzellen im Infektionsversuch mittels ELISA gemessen werden. Als Messparameter sollte die Bildung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL) -8 herangezogen werden. Anschließend sollte in Co-Infektionsversuchen geprüft werden, ob die potentiellen probiotischen Stämme einen Effekt auf die IL-8 Sekretion der mit dem EHEC-Stamm EDL933 infizierten HT29-Zellen ausüben. Eine Auswahl der zu testenden Stämme sollte in weiteren Co-Infektionsversuchen mit vier EHEC-Stämmen anderer Virulenzprofile ebenfalls auf die IL-8 Modulationen hin untersucht werden.

Die bei diesen Untersuchungen beobachteten IL-8 Modulationen durch bestimmte protektive Teststämme sollten weiter untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die beobachteten Reduktionen der IL-8 Sekretion nur mit lebenden Bakterien erzielt werden können, oder ob auch abgetötete Bakterien oder ein löslicher Faktor im Kulturüberstand die IL-8 Sekretion von EDL933-infizierten HT29-Zellen beeinflussen können. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die im Versuch eingesetzten Milchsäurebakterien und *Staphylococcus pasteurii* LTH 5211 die Adhäsionsfähigkeit von EDL933 an die HT29-Zellen beeinflussen können.

Die während den Infektionsversuchen gebildeten Überstände der Zellkulturen sollten mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysiert werden und somit die im Infektionsversuch gebildeten organischen Säuren bestimmt und quantifiziert werden. Die dabei bestimmten Säuren sollten anschließend in Infektionsversuchen mit EDL933 im Zellkulturmodell eingesetzt werden und die IL-8 Produktion der Zellen bestimmt werden.

Es sollten Infektionsversuche mit vier Deletionsmutanten des Stammes EHEC-Stammes PMK5 durchgeführt werden, bei denen jeweils eines der Virulenzgene Intimin (*tir*), Attaching and Effacing (*eae*), EHEC-Hämolyisin (*ehly*) oder Shiga Toxin (*stx*), ausgeschaltet war. Dabei sollte geprüft werden, ob die zuvor von *S. pasteurii*

LTH 5211 gezeigte Reduktion der IL-8 Sekretion auf PMK5 infizierten HT29-Zellen auf einen einzelnen Pathogenitätsfaktor zurückgeführt werden kann.

Um den beobachteten protektiven Effekt weiter zu untersuchen, sollte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors "Nuklearer Faktor kappa B" (NF- κ B) in HT29-Zellen nach erfolgter Infektion bzw. Co-Infektion mit EHEC und/oder Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *Staphylococcus pasteurii* LTH 5211 mittels Reporter-Gen-Assay bestimmt. Mit der Methode der quantitativen real-time PCR sollte außerdem die Expression für die Gene der Toll-like-Rezeptoren 2, 4 und 9 analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien für Bakterienkulturen

Es wurden Feinchemikalien der Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und der Sigma-Aldrich GmbH (Selze) verwendet. Für Arbeiten mit DNA und RNA wurde steriles DNase- und RNasefreies, destilliertes Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH Karlsruhe) sowie – wenn nicht anders angegeben – ausschließlich Chemikalien der Sigma-Aldrich GmbH verwendet.

2.1.2 Chemikalien für Zellkulturen

Die Kultivierung der HT29-Zellen und die Zellkulturversuche wurden mit den in Tab. 2. 1 angegebenen Reagenzien durchgeführt.

Tabelle 2. 1 Für die Arbeit mit Zellkulturen verwendete Materialien

Produktname	Hersteller
Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung, 1 % Versen	BioChrom AG (Berlin)
EDTA-Trypsin (0,05 %)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Essigsäure (Rotipuran®, >99,8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ex-Gen 500	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Fetales Kälberserum (FKS)	BioChrom AG
OptiMEM (Modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium)	Invitrogen GmbH
Milchsäure (90 % Reinst.)	Merck KGaA
Phosphat-gepufferte Saline (PBS; Dulbecco)	BioChrom AG
Penicillin/Streptomycin (10.000 units/ml)	Invitrogen GmbH
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Sigma-Aldrich GmbH (Selze)
Trypan-Blau	Carl Roth GmbH & Co. KG

Für die Zellkultur benötigtes Reinstwasser wurde mittels Milli-Q Plus PF-Anlage (Millipore™, Billerica, USA) hergestellt und in sterile Gewebekulturflaschen abgefüllt.

2. 1. 3 Bakterienstämme

Für die Infektionsversuche wurden verschiedene *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen Virulenzprofilen aus der Stammsammlung des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, eingesetzt (Tab. 2. 2). Dabei handelt es sich bei den Stämmen EDL933 und TS18/08 um Lebensmittelisolate und bei den Stämmen PMK5, 2331/01 und 5791/99 um Humanisolate.

Zusätzlich wurden 4 Deletionsmutanten des *E. coli* O103:H2 Stammes PMK5 untersucht, bei denen jeweils eines der Virulenzgene Intimin (*tir*), Attaching and Effacing (*eae*), EHEC-Hämolyisin (*ehly*) oder Shiga Toxin (*stx*), deletiert war: PMK5 Δ tir, PMK5 Δ eae, PMK5 Δ ehly und PMK5 Δ stx1 (Stevens et al., 2002). Diese wurden freundlicherweise von Eric Oswald (INRA, Toulouse, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Zur Vervielfältigung von Plasmiden für Transkriptionsversuche, wurden die Stämme *E. coli* DH5- α / pNF- κ B (LTH-Nr. 6754) und *E. coli* DH5- α / pCMV β -gal (LTH-Nr. 6755) verwendet. Die Stämme wurden freundlicherweise von Julia-Stephanie Frick (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2. 2 Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Serotyp	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>hly</i>	<i>cdt-V</i>	Erkrankung	Referenz
EDL933	O157:H7	1/2	+	+	-	-	(O'Brien et al., 1984)
PMK5	O103:H2	1	+	+	-	HUS	(Mariani-Kurkdjian et al., 1993)
2331/01	O26:H-	1/2	+	+	-	HUS	(Creuzburg & Schmidt; 2007)
5791/99	O157:H-	2	+	+	+	HUS	(Friedrich et al., 2006)
TS 18/08	O113:H21	2	-	+	+	-	(Slanec et al., 2009)

+ = vorhanden; - = nicht vorhanden;

Für die Infektionsversuche wurden außerdem verschiedenen Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- und Staphylokokkus-Stämme aus der Stammsammlung des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim verwendet (Tab. 2. 3). Freundlicherweise wurden die Stämme *L. fermentum* DSMZ 20052 und *B. adolescentis* DSMZ 20086 von Julia-Stephanie Frick (Universität Tübingen) und der Stamm *L. rhamnosus* GG von Soile Tynkkynen (Valio Ltd, Helsinki, Finnland) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2. 3 Verwendete Milchsäurebakterien-; Bifidobakterien- und Staphylokokken-Stämm

Stamm	LTH-Nr.
Lactobacillen	
<i>L. acidophilus</i> BFE 704	5264
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSMZ 20081	1405
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	6590
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	1406
<i>L. intestinalis</i> DSMZ 6629	5210
<i>L. johnsonii</i> BFE 663	5261
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	5410
<i>L. paracasei</i> BFE 688	5263
<i>L. paralimentarius</i> DSMZ 13238	5450
<i>L. plantarum</i>	6724
<i>L. rhamnosus</i> GG	6749
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	2584
Bifidobakterien	
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	6394
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	6756
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	6395
<i>B. lactis</i> NCC 362	5477
Staphylokokken	
<i>S. carnosus</i> DSMZ 20501	6316
<i>S. pasteurii</i>	5211

2. 1. 4 Nährmedien und Puffer

Zur Herstellung der Nährmedien und Puffer für die Bakterienkultivierung wurden die angegebenen Chemikalien in entionisiertem Wasser gelöst und - wenn erforderlich - der pH-Wert mittels 1 N oder 4 N Salzsäure bzw. Natronlauge unter Verwendung des pH-Meters (pH 539, WTW, Weilheim) eingestellt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 15 g/l Agar-Agar beigefügt. Das Autoklavieren der Medien sowie der Puffer erfolgte für 20 min bei 121 °C und 1 bar (Technoklav, Integra Biosciences, Fernwald).

Nährmedien:

Standard-I

Casein-Pepton (Trypton)	15 g
Hefeextrakt	3 g
NaCl	6 g
Glukose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5 ± 0,1	

Luria-Bertani (LB)

Casein-Pepton (Trypton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5 ± 0,1	

Modifiziertes de Man-Rogosa-Sharpe (mMRS)

Casein-Pepton (Trypton)	10 g
Fleischextrakt	8 g
Hefeextrakt	4 g
Natriumacetat	5 g
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	2 g
Di-Ammoniumcitrat	2 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g

Modifiziertes de Man-Rogosa-Sharpe Fortsetzung:

MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,05 g
Glukose	10 g
Tween 80®	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 6,2 ± 0,1	

M58 (von der DSMZ empfohlenes Medium für Bifidobakterien, Stand 2008)

Casein-Pepton (Trypton)	10 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	5 g
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	3 g
Glukose	10 g
Tween 80®	1 g
Cystein-HCl	0,5 g
Sodium-Ascorbat	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 6,8 ± 0,1	

Puffer - allgemein:**10-fach konzentrierte Phosphat-gepufferte Saline (PBS)**

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2,4 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,0 ± 0,1	

Natriumchloridlösung (0,9 %)

NaCl	9 g
H ₂ O	ad 1000 ml

50-fach konzentrierter Tris-EDTA (TAE)-Puffer

Tris-HCl	242 g
EDTA	37,2 g
H ₂ O	800 ml
pH 8,0 ± 0,1 (mit 1 M Eisessig eingestellt)	

Puffer für IL-8 ELISA:**Adsorptionspuffer (0,1 M)**

Na ₂ HPO ₄	14,196 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 9,0 ± 0,1	

Blockierungspuffer

1× PBS	20 ml
10 % FKS	2 ml

Detektionspuffer

1× PBS	10 ml
0,05 % Tween 20	0,005 g
10 % FKS	1 ml

Waschpuffer

1× PBS	1000 ml
0,05 % Tween 20	0,5 g

Stopp-Lösung (2N H₂SO₄)

H ₂ SO ₄	53,3 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Puffer für NF-κB:**2-fach konzentrierter β-Galactosidase-Assay-Puffer**

Na ₂ HPO ₄	8,9 g
NaH ₂ PO ₄	13,8 g
MgCl ₂	9,5 g
D-Galaktose	13,5 g
Triton-X 100	10 ml
H ₂ O	ad 100 ml

Zu jeweils 4 ml des Puffers wurden direkt vor dem Gebrauch 4 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG) sowie 18 µl β-Mercaptoethanol (14 M) zugefügt.

Puffer für Arbeiten mit RNA:**10-fach konzentrierter 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) Puffer**

MOPS	41,8
Natriumacetat-Trihydrat	0,7
Na ₂ EDTA (0,5 M)	20 ml
pH 7,5 (1 M NaOH DEPC-behandelt)	
H ₂ O (Milli-Q Plus PF-Anlage, DEPC-behandelt)	ad 1000 ml

2. 2 Allgemeine Zellkulturmethoden

2. 2. 1 Kultivierung von HT29 Zellen

Die Zellen der Linie HT29 sind für Forschungszwecke eingesetzte Epithelzellen eines Adenocolonkarzinoms. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (NuAire Inc. Plymouth, USA) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen). Als Nährmedium wurden 10 ml DMEM (siehe 2. 1. 2) eingesetzt, welches bereits 4,5 g/l Glucose und 580 mg/l Glutamin enthielt. Zusätzlich wurden 10 % fetales Kälberserum (FKS), sowie 1 % einer Penicillin-/Streptomycin-Mischung zugegeben.

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens auf dem Flaschenboden, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium zunächst abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS (Dulbecco) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 2 min mit EDTA behandelt. Nach Absaugen des EDTA erfolgte ein Waschschriff mit 2 ml Trypsin-EDTA bevor die Zellen durch zwei- bis dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst wurden. Das Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine auf der Zelloberfläche, sodass die Zellen sich von dem Flaschenboden lösen. Durch die Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium wurde das Trypsin-EDTA inhibiert und die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (400 x g, 5 min., 20 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Zellkulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet, und zusammen mit jeweils 10 ml DMEM in neue Zellkulturflaschen überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte unter den oben genannten Bedingungen.

2. 2. 2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl an lebenden Zellen in der Zellsuspension zu ermitteln, wurde zunächst mit 0,1 %igem Trypan-Blau eine 1:10 Verdünnung hergestellt und anschließend die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden die lebenden (= nicht blau gefärbten) Zellen in allen vier Großquadraten (jeweils bestehend aus 16 Kleinquadraten) ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt. Dieses wurde mit dem Kammer- und dem Verdünnungsfaktor multipliziert um die Zellzahl pro ml Lösung zu bestimmen.

2. 2. 3 Durchführung von Infektionsversuchen mit lebenden Bakterien

Zur Durchführung von Infektionsversuchen wurden die benötigten Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. Es wurden nur Zellen der Passagen 3 - 30 verwendet. In 24-well Platten wurde pro well 1 ml Medium vorgelegt und jeweils 5×10^4 Zellen ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden bis zum folgenden Tag im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt.

Des Weiteren wurden die für die Infektionsversuche benötigten Bakterienstämme als Übernachtskulturen angeimpft. Von den zu testenden EHEC-Stämmen wurde jeweils eine Kolonie in 20 ml LB-Medium eingerieben und über Nacht schüttelnd im Erlenmeyerkolben inkubiert (37 °C, 180 rpm). Die zu testenden Milchsäurebakterien- und Bifidobakterien-Stämme sowie *S. pasteurii* LTH 5211 wurden aus der Glycerinkonserve in jeweils 10 ml mMRS, *S. carnosus* DSMZ 20501 wurde in 10 ml Standard-I-Bouillon geimpft und über Nacht bei 37 °C stehend inkubiert. Bifidobakterien wurden 40 h vor der Durchführung der Infektionsversuche aus der Glycerinkonserve in 10 ml M58-Bouillon angeimpft und ebenfalls bei 37 °C stehend inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die adhärennten Zellen in den Wells zunächst mit je 1 ml PBS (Dulbecco) gewaschen und anschließend mit neuem, antibiotikafreiem DMEM versorgt.

Der jeweils zu testende EHEC-Stamm wurde zunächst in frisches LB-Medium überführt (optische Dichte (OD) 0,04) und bis zu einer OD von 0,2 bei 37 °C und 180 rpm wachsen lassen. Die Übernachtskulturen der Milchsäurebakterien, Bifidobakterien und Staphylokokken-Stämme wurden direkt verwendet. Die Bakterienkulturen wurden bei $5.000 \times g$ und 4 °C für 5 min zentrifugiert, danach mit PBS (Dulbecco) gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS (Dulbecco) aufgenommen und die OD bestimmt (Photometer DU-640, Beckman Coulter, Krefeld). Als Leerwert diente PBS. Anhand der gemessenen OD konnte die Zellzahl und somit die *Multiplicity of infection* (MOI) festgestellt werden.

Bei einer Mono-Infektion wurden die Epithelzellen mit EHEC in einer MOI von 2 oder mit einem der anderen Bakterien-Stämme in einer MOI von 200 stimuliert. Bei der Co-Infektion wurden die Epithelzellen gleichzeitig mit einem EHEC-Stamm (MOI 2) und einem der zu testenden benignen Bakterienstämme (MOI 200) infiziert. Um

einen möglichst sofortigen Kontakt zwischen Bakterien und Zellen zu ermöglichen wurden die 24-well-Platten anschließend bei Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert ($300 \times g$, Plattenzentrifuge LMC3000, Kisker Biotech; Steinfurt). Nach 1 h Inkubationszeit im CO_2 -Brutschrank wurden die Zellen mit 1 ml PBS (Dulbecco) pro well gewaschen und frisches antibiotikafreies DMEM hinzugegeben, bevor die Zellen für weitere 5 h im CO_2 -Brutschrank inkubiert wurden.

Insgesamt 6 h nach erfolgter Stimulation wurde der Versuch beendet. Je nach nachfolgender Untersuchung wurden die Überstände der Zellkultur abgenommen oder die Zellen lysiert und bis zur weiteren Untersuchung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ oder $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Als Negativkontrolle diente PBS (Dulbecco). Als Positivkontrolle und zur Überprüfung der Viabilität der HT29-Zellen wurde in den Versuchen zur Untersuchung von Interleukin-8 (IL-8) oder NF- κ B zusätzlich Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α ; 50 ng/ml) eingesetzt, ein proinflammatorisches Zytokin, das als Mediator für Leukozyten fungiert. Die Viabilität der eingesetzten Bakterien wurde mittels Ausplattieren auf LB-, mMRS- Standard-I- oder M58-Agarplatten überprüft. Die Inkubation erfolgte bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, wobei die Inkubation der M58-Agarplatten (Bifidobakterien-Stämme) im Anaerobiertopf (Merck) erfolgte. Alle Infektionsversuche wurden als Dreifachansatz durchgeführt und zweimal wiederholt.

2. 2. 4 Durchführung von Infektionsversuchen mit inaktivierten Bakterien und Kulturüberständen

Zusätzlich zu den Infektionsversuchen mit lebenden Bakterien wurden mit den Stämmen *S. pasteurii* LTH 5211, *L. rhamnosus* GG und *L. johnsonii* DSMZ 10533 Infektionsversuche mit Kulturüberstand und mit abgetöteten Bakterien durchgeführt.

Für die Herstellung der Kulturüberstände wurden die Übernachtskulturen der drei Teststämme wie in Kapitel 2. 2. 3 beschrieben abzentrifugiert, das Pellet (die lebenden Bakterien) wie oben angegeben im Versuch verwendet und der Kulturüberstand steril filtriert ($0,2\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße). Es wurden 100 μl Kulturüberstand zu den HT29-Zellen bzw. zu den mit EDL933 (MOI 2) infizierten HT29-Zellen in den vorbereiteten 24-well Platten gegeben, als Kontrolle wurden 100 μl steriles mMRS-Medium zu den HT29-Zellen pipettiert. Der weitere Infektionsversuch verlief wie unter 2. 2. 3 beschrieben.

Für die Herstellung der Lysate der drei Teststämme, wurden die Übernachtskulturen wie oben beschrieben zunächst mit PBS gewaschen, anschließend in PBS aufge-

nommen und eine OD 2 bei 600 nm (entspricht 8×10^8 KBE/ml) eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde für mindestens 72 h bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde die Suspension zu je 1 ml aliquotiert, diese für 10 min mit Ultraschall (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) behandelt, für 10 min bei 30 Hz in der Kugelmühle (MM301, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) aufgeschlossen und anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Nicht-Viabilität des Zelllysats wurde mittels Ausplattieren auf mMRS-Agarplatten überprüft. In den Infektionsversuchen wurden 100 μl des Zelllysats zu den HT29-Zellen bzw. zu den mit EDL933 (MOI 2) infizierten HT29-Zellen gegeben, dies entsprach einer ursprünglichen MOI von 200. Der Infektionsversuch verlief weiterhin wie oben beschrieben.

2. 3 Untersuchung der Zellkulturüberstände

2. 3. 1 Bestimmung der Interleukin-8 Konzentration mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein quantitativer Immunoassay, bei welchem ein Enzym als Marker eingesetzt wird, um die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes zu bestimmen.

Zunächst wurde ein monoklonaler Antikörper (Mouse Anti-Human G265-5, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, BD Pharmingen, San Diego, CA) an den Boden einer 96-well Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ Surface; F-Bottom; Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) gebunden. Dazu wurden 5 ml Adsorptionspuffer mit 15 μl des Antikörpers gemischt und jeweils 50 μl der Lösung pro well pipettiert. Die abgedeckte und mit Parafilm verschlossene Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die beschichtete Mikrotiterplatte zunächst 3 \times mit Waschpuffer im ELISA-Washer (Columbus Plus, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) gewaschen (pro Waschschrift je 300 μl Waschpuffer pro well) bevor die unspezifischen Bindungsstellen mit je 200 μl Blockierungspuffer pro well blockiert wurden. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte erneut 3 \times mit Waschpuffer gewaschen, bevor die zu messenden Zellkulturüberstände hinzugegeben wurden (100 $\mu\text{l/well}$), so dass die zu detektierenden Moleküle an die Antikörper

binden. Ebenfalls wurde rekombinantes, humanes IL-8 in verschiedenen Konzentrationen (12,5 – 800 pg/ml, in DMEM verdünnt; BD Pharmingen), für die Erstellung einer Standardkurve pipettiert.

Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C wurde die Mikrotiterplatte insgesamt 6 × mit Waschpuffer gewaschen und anschließend der biotinylierte Detektionsantikörper (Biotin Mouse Anti-Human G265-8, 0,5 µg/ml, BD Pharmingen) zu dem Antikörper-Antigenkomplex dazugegeben. Hierfür wurden 5 µl des Detektionsantikörpers mit 10 ml Detektionspuffer gemischt und jeweils 100 µl der Lösung pro well pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem 3-maligem Waschen der Mikrotiterplatte wurden 50 µl der Enzymlösung (Streptavidin HRP; BD Pharmingen; 10 %ig in PBS) pro well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut 3 × gewaschen. Je 5 ml der Lösungen A und B (TMB Substrate Reagent Set; BD Pharmingen) wurden gemischt und je 100 µl als Substratlösung in die wells pipettiert. Die abschließende Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte für 30 min im Dunkeln. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung pro well wurden die Proben photometrisch bei 450 nm im Plattenlesegerät (infinite M200, Software Magellan V 6.3. Tecan) vermessen. Die Intensität der hervorgerufenen Farbreaktion verhält sich proportional zu der Konzentration des zu messenden Moleküls, so dass unter Berücksichtigung der Standardkurve die absolute Konzentration ermittelt werden konnte.

2. 3. 2 Bestimmung von organischen Säuren mittels High Performance Liquid Chromatography

Um die Menge an organischen Säuren in den Zellkulturüberständen 6 h nach erfolgter Inkubation zu analysieren wurden die Überstände der Dreifachbestimmung (je 1 ml) in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm ($20.800 \times g$) für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden steril filtriert (Cellulosefilter, 0,45 µm; Merck, Darmstadt) und je 700 µl mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in Doppelbestimmung analysiert. Als Eluent wurde 5 mM H₂SO₄ (Durchflussrate 0,4 ml/min) verwendet.

Die Standardermittlung erfolgte mit 100 mM Stammlösungen von Acetat, Propionat, Ethanol (alle Merck) und Lactat, Formiat (beide Sigma-Aldrich), welche in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 0,7 und 1,0 mM als externe Standards mit einer 4-Punkt-Kalibrierung vermessen wurden. Die HPLC-Anlage bestand aus den Komponenten

einer Säule (Rezex ROA-Organic Acid H⁺ column (8 %), 300 × 7.8 mm, 8 micron Phenomenex Inc., Torrance, USA), einem Autosampler (728 auto sampler; Bischoff, Leonberg, Germany), einer Pumpe (Σ871; IRICA, Japan), einem Ventil (RheodyneMX 7900-000; Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Germany), einem Säulenofen (70 °C Bischoff) sowie einem RI-Detektor (model 8100; Bischoff).

Die Chromatogramme wurden mit der Software McDACq Integrator v1.5 (Bischoff) ausgewertet, wobei die in der Messung erhaltenen Peaks mit denen der Standards verglichen wurden.

2. 3. 3 Einfluss von organischen Säuren auf die Sekretion von IL-8

Um den Einfluss von den zuvor bestimmen organischen Säuren auf die IL-8 Sekretion von EDL933 infizierten Zellen zu testen, wurde die Durchführung der Infektionsversuche gemäß Kapitel 2. 2. 3 abgeändert. Die am Vortag eingesäten, adhärennten Zellen wurden mit PBS (Dulbecco) gewaschen und mit frischem DMEM versorgt, welchem 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 15 mmol/l Milchsäure oder Essigsäure zugesetzt war. Die Anzucht des EHEC-Stammes EDL933 sowie die Infektion der Epithelzellen erfolgte wie in Kapitel 2. 2. 3 beschrieben.

Nach 1 h Inkubationszeit im CO₂-Brutschrank wurden die Zellen mit 1 ml PBS (Dulbecco) pro well gewaschen und frisches, antibiotikafreies DMEM hinzugegeben, welches ebenfalls die entsprechende Molarität an Milch- oder Essigsäure enthielt. Die Zellen wurden für weitere 5 h im CO₂-Brutschrank inkubiert, nach insgesamt sechsständiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen und bis zur Bestimmung der IL-8 Konzentration bei -20 °C gelagert.

Die Viabilität der Zellen wurde mittels TNF-α (50 ng/ml) überprüft (Positivkontrolle), als Negativkontrolle wurde neben PBS (Dulbecco), mit 10 mmol/l Milch- bzw. Essigsäure versetztes DMEM eingesetzt.

2. 4 Transporter-Gen-Assay zur Bestimmung von NF-κB

2. 4. 1 Plasmidgewinnung

Die für die Transfektion benötigten Plasmide pNF-κB-(5×)-luc (Stratagene, La Jolla, CA) und pCMVβ-Gal (Clontech, Mountain View, CA) wurden zunächst in den Stämmen *E. coli* DH5-α pNF-κB und *E. coli* DH5-α pCMVβ-gal vervielfältigt und

anschließend mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben.

Da beide Plasmide eine Ampicillin-Resistenz aufweisen, wurden die Stämme zunächst auf LB-Amp-Agar (100 µg/µl Ampicillin) ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Jeweils eine Kolonie wurde von der Platte in LB-Medium+Amp (100 µg/µl Ampicillin) überimpft und für 8 h bei 37 °C inkubiert. Je 100 ml LB-Amp-Medium wurden mit jeweils 200 µl dieser Bakteriensuspensionen inokuliert und über Nacht für 14 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation der Übernachtskulturen bei 4 °C und 6000 × g. Die Zellen wurden anschließend gemäß dem Protokoll des Herstellers resuspendiert und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Das filtrierte Lysat wurde auf eine Anion-Austauschersäule gegeben, nach einem Waschschrift wurde die Plasmid-DNA eluiert, durch Isopropanol-Fällung aufkonzentriert und abschließend in endotoxin-freiem Puffer gelöst. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260 nm vermessen (Photometer GeneQuant 1300; Biochrom, Cambridge, United Kingdom), die Konzentration bestimmt und Stocklösungen (250 µg/ml) hergestellt.

2. 4. 2 Transfektion der HT29 Zellen mit ExGen 500

Zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB wurden Transfektionsversuche durchgeführt. Dazu wurde in 24-well Platten pro well 1 ml DMEM vorgelegt und jeweils 2×10^5 Zellen ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das DMEM durch 500 µl OpitMEM pro well ersetzt und die Zellkulturen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion der HT29-Zellen mit jeweils 125 ng der Plasmide pNF-κB-(5×)-luc und pCMVβ Gal unter der Verwendung von ExGen500 in vivo Transfection Reagent (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland). Nach Plasmidzugabe wurden die Zellkulturplatten bei 300 × g bei Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert und für 4 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und frisches DMEM auf die Zellkulturen gegeben. Die Zellkulturplatten wurden für 20 h im CO₂-Inkubator bebrütet.

2. 4. 3 Durchführung von Infektionsversuchen zur Bestimmung der Aktivierung von NF- κ B

Die Durchführung der Infektionsversuche erfolgte gemäß Kapitel 2. 2. 3. Nach der insgesamt 6-stündigen Inkubationszeit wurden die Monolayer zunächst mit 1 ml kaltem PBS (Dulbecco) gewaschen, anschließend mit je 100 μ l Lysispuffer aus dem Luciferase Reporter Gene Assay (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim) lysiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

2. 4. 4 Analyse der Zelllysate zur Bestimmung der Aktivierung von NF- κ B

Die aufgetauten Zelllysate wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte mit V-Boden übertragen, für 5 min bei 400 $\times g$ zentrifugiert und die Überstände für die Ermittlung der Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivität sowie des Proteingehaltes eingesetzt. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Ergebnisse der β -Galactosidase-Aktivität und des Proteingehaltes normalisiert (relative Lichteinheiten). Für die Messungen wurde ein Plattenlesegerät (infinite M200) sowie die Software i-control V 1. 3 der Firma Tecan eingesetzt.

Luciferase-Assay

Je 25 μ l Zelllysate der zu untersuchenden Probe wurden in eine weiße Mikrotiterplatte (96-well) pipettiert. Die Platte wurde in das Plattenlesegerät eingelegt, mittels eines Injektors wurden je 50 μ l Substrat aus dem Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Roche) zu den Proben gegeben und die Lumineszenz gemessen.

β -Galactosidase-Assay

Je 5 μ l Zelllysate der zu untersuchenden Probe wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ Surface; Nunc A/S) mit je 45 μ l Millipore-H₂O gegeben und mit 50 μ l 2 \times Galactosidase-Assay-Puffer versetzt. Die Platte wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die optische Dichte im Plattenlesegerät bei 420 nm bestimmt.

Proteinbestimmung

Zunächst wurde ein Proteinstandard mit bovinem Serumalbumin (BSA; 2 mg/ml) erstellt. 20 μ l dieses Standards wurden mit 480 μ l Millipore-H₂O gemischt und verschiedene Verdünnungsstufen (0,625 μ g/ml - 40 μ g/ml) in Doppelbestimmung in

eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Proteinbestimmung der Proben wurden 100 μl Millipore- H_2O in die wells vorgelegt und je 2 μl Zelllysate dazu pipettiert. Das Bradford-Reagenz Roti®-Quant (Roth) wurde im Verhältnis 1:2,5 mit Millipore- H_2O verdünnt und jeweils 100 μl zu den verdünnten Proben gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend im Plattenlesegerät bei 590 nm vermessen und der Proteingehalt mit Hilfe des Standards berechnet.

2.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung der Genexpression der Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 9

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf der Messung von Fluoreszenzsignalen. Im Gegensatz zur konventionellen PCR kann hierbei die Entstehung spezifischer PCR-Produkte während der Amplifikation durch die proportionale Zunahme der detektierten Fluoreszenz direkt verfolgt werden.

2.5.1 Herstellung von Standards für die qRT-PCR

Als Standards für die qRT-PCR wurden PCR-Produkte der zu untersuchenden Genabschnitte der genomischen DNA von HT29 Zellen eingesetzt.

Die Präparation der genomischen DNA von HT29 Zellen erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen; Hilden). Es wurden 2×10^6 Zellen in DMEM eingesetzt, für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und das Pellet in 200 μ l PBS resuspendiert. Danach wurden 20 μ l Proteinase K, 200 μ l AL-Puffer sowie zusätzlich 0,4 mg RNase (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 56 °C inkubiert, anschließend mit 200 μ l Ethanol (Rotipuran®, >99,8 % Roth) versetzt und auf die DNeasy-Säule pipettiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Bestimmung der Konzentration sowie die Reinheit der erhaltenen DNA wurden die Proben 1:10 verdünnt und in einer Quarzküvette (10 mm; Soul Sub Micro) photometrisch bei 260 nm (Photometer GeneQuant 1300; Biochrom, Cambridge, United Kingdom) vermessen.

Für die Auswahl der Primer zur Herstellung der Standards wurden die Sequenzen der qRT-Primer (cDNA-Primer, Tabelle 2. 7) herangezogen. Das sich daraus ergebende DNA-Fragment wurde mit den in der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) hinterlegten Sequenzen mit der Software BioEdit Sequence Alignment V 7. 0. 9. 0 (Hall; 1999) rekonstruiert. Dieses DNA-Fragment wurde zu beiden Seiten entsprechend der bekannten Sequenz um ca. 100 bp verlängert. In diesem Bereich wurden komplementäre Primer unter Verwendung der Software Oligo Explorer V 1.2 (GeneLink™; USA) gewählt. Dabei wurde Self-annealing und Loop-Bildung ausgeschlossen. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland.

Die isolierte DNA wurde in eine PCR eingesetzt und die gesuchten Gene TLR2, TLR4, TLR9 und β -Aktin (ACTB) also sogenanntes Haushaltsgen mit den jeweiligen Primerpaaren (Tabelle 2. 4) amplifiziert. Der Reaktionsansatz der PCR und das verwendete Amplifikationsprogramm sind in Tabelle 2. 5 und 2. 6 dargestellt. Es wurden Reagenzien von der Firma Genaxxon verwendet.

Tabelle 2. 4 Verwendete Primer für die Standarderstellung der qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	PCR-Produktlänge	Annealing-Temperatur	Referenz
ExACTB-2	f: GAGACCTTCAACACCCCAGC r: CTCGTAGCTCTTCTCCAGGG	331 bp	55 °C	diese Arbeit
Ex-TLR2	f: GGAACCTAGGACTTTATCGC r: GCATGTGCTGTGCTCTGTTC	563 bp	54 °C	diese Arbeit
Ex-TLR4	f: GGAACTACAGCATTTTCCAAG r: GCTCATTCCCTTACCCAGTCC	372 bp	53 °C	diese Arbeit
Ex-TLR9	f: CCTCTGGTACTGCTTCCACC r: CCAGCACAAACAGCGTCTTG	267 bp	57 °C	diese Arbeit

f = forward-Primer; r = reverse-Primer; bp = Basenpaare

Tabelle 2. 5 Reaktionsansatz PCR zur Standardherstellung der qRT-PCR

Bezeichnung	Volumen (50 μ l)
10 \times Puffer (S) [15 mM MgCl ₂ , 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄]	5,0 μ l
dNTP-Mix [je 10 mM]	1,0 μ l
Primer-f [10 pmol/ μ l]	2,0 μ l
Primer-r [10 pmol/ μ l]	2,0 μ l
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,6 μ l
Template-DNA	2,0 μ l
steriles Reinstwasser	37,4 μ l

Tabelle 2. 6 PCR-Programm für die Standardherstellung der qRT-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 × Denaturierung	94°C	240 s
35 × {	Denaturierung	94°C
	Annealing	siehe Tabelle 2. 4
	Elongation	72°C
1 × Elongation	72°C	300 s
1 × Kühlen	10°C	∞

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igem (wt/vol) Agarosegel bei konstanter Spannung von 130 V und 1-fach TAE-Puffer aufgetrennt und durch 10-minütiges Färben in Ethidiumbromid (10 mg/ml) unter UV Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Zur Größenabschätzung wurde ein 100 bp-Marker, zur Konzentrationsabschätzung ein λ HindIII-Marker (beide Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen. Die Digitalisierung erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (Herolab, Wiesbaden, Deutschland).

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega GmbH (Mannheim) nach Herstellerangaben. Die Konzentration (OD_{260nm}) und die Reinheit ($OD_{260/280}$) wurden anschließend photometrisch ermittelt.

2. 5. 2 Durchführung von Infektionsversuchen zur Bestimmung der Expression von TLRs in HT29 Zellen

Die Durchführung der Infektionsversuche erfolgte mit geringfügigen Änderungen gemäß Kapitel 2. 2. 3. Es wurden 1×10^6 Zellen pro well einer 6-well Platte eingesät. Es erfolgte die Infektion wie oben angegeben. Nach der insgesamt 6-stündigen Inkubationszeit wurden die Monolayer zunächst mit 2 ml kaltem PBS gewaschen, anschließend mit je 300 μ l RLT-Lysispuffer aus dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) + 10 % β -Mercaptoethanol lysiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert. Die Versuchsdurchführung erfolgte im Doppelansatz.

2. 5. 3 RNA-Isolierung

Die gefrorenen Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit Hilfe von QIAshredder Säulchen (Qiagen) homogenisiert. Dazu wurden die Proben auf die Säulen überführt, diese in ein 2 ml Sammelgefäß platziert und für 2 min bei $14.196 \times g$ zentrifugiert. Um die genomische DNA aus den Proben zu entfernen, wurde das homogenisierte Lysat auf eine gDNA Eliminator-Säule gegeben und für 30 s bei $8.400 \times g$ zentrifugiert. Die anschließende RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasyPlus Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben. Dabei wurde der Durchfluss mit Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Säule gegeben. Die RNA bindet an die Membran, verunreinigende Substanzen werden durch Waschen entfernt und die hochreine RNA in 100 µl hochreinem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNA wurde anschließend photometrisch bei 260 und 280 nm (Photometer Ultrospec 3100 pro; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in einer Quarzküvette vermessen.

2. 5. 4 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft. Um eine korrekte Größendarstellung der RNA im Gel zu erreichen, müssen die Sekundärstrukturen aufgehoben werden. Dazu werden die Proben (je 300 ng RNA + 2 µl Probenpuffer + 15 µl H₂O) für 10 min bei 70 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt, bevor sie auf das Gel geladen werden. Die Herstellung der denaturierenden Gele erfolgte durch das Lösen von 1,2 % Agarose in MOPS und 2 % Formaldehyd. Als Laufpuffer wurde MOPS verwendet. Als Größenstandard wurde ein RNA-Marker (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, ready-to-use Fermentas) mitgeführt. Da der Probenpuffer (Loading Dye, Fermentas) bereits Ethidiumbromid enthält, entfällt das anschließende Anfärben der Proben. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage (Alpha-Imager; Alpha Innotech / Cell Biosciences, Santa Clara, CA)

2. 5. 5 c-DNA-Synthese

Die c-DNA-Synthese erfolgte mit dem First Strand Synthesis Kit (Invitrogen). Dazu wurden 1000 ng RNA mit 1 µl Random-Primer gemischt, für 10 min bei 65 °C inkubiert, anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und für 2 min auf Eis abgekühlt.

Es folgte die Zugabe von 2 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP; Genaxxon), 4 µl Reaktionspuffer (5 ×), 2 µl 10 mM DTT und 1 µl Superscript II reverse Transkriptase (alle Invitrogen). Der Reaktionsansatz wurde mit Reinstwasser auf 20 µl aufgefüllt und bei 42 °C für 90 min inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 5 µl 1 M NaOH und einer Inkubation bei 65 °C. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 5 µl 1 M HCl sowie 200 µl TE-Puffer.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Die synthetisierte cDNA wurde mit 700 µl PB-Puffer gemischt, auf eine QIAquick Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Die an die Säulenmembran gebundenen cDNA wurde in 40 µl Elutionspuffer (Qiagen) eluiert und die Reinheit sowie die Konzentration der erhaltenen cDNA photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Da die reverse Transkriptase einzelsträngige DNA synthetisiert, wurde bei der Berechnung der Konzentration der Multiplikationsfaktors 37 berücksichtigt.

Um zu prüfen, ob bei der cDNA-Synthese eventuell vorhandenen Reste genomischer DNA vervielfältigt werden, wurden für alle untersuchten Proben sogenannte RT⁻ - Proben mitgeführt. Diese Reaktionsansätze enthalten alle oben genannten Komponenten, mit Ausnahme der reversen Transkriptase.

2. 5. 6 Messung der Genexpression

Die relative Quantifizierung der zu untersuchenden Gene erfolgte mit dem MyiQ2 real-time-PCR-Detektionssystem und der Software iQ5 V (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green eingesetzt, ein Cyaninfarbstoff der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und nach Anregung durch Lichtsignale fluoresziert.

Es wurden 2,8 ng bzw. für die Untersuchung von TLR9 5,6 ng der synthetisierten cDNA in die qRT-PCR eingesetzt, mit 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) sowie 0,75 µl der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer [10 pmol/µl] für das zu untersuchende Gen gemischt und der Reaktionsansatz mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Von den erhaltenen RT⁻ -Proben sowie von den seriellen Verdünnungen des Standards wurden jeweils 2 µl in den Reaktionsansatz gegeben.

Die Messung der Proben erfolgte als Triplett. Die Erstellung der Standards und die Effizienzberechnungen erfolgten aus seriellen Verdünnungen der PCR-Produkte

(siehe 2. 5. 1). Die jeweiligen Primerpaare sowie das verwendete Amplifikationsprogramm sind in den Tabellen 2. 7 und 2. 8 dargestellt. Die Spezifitätsprüfung erfolgte über eine Schmelzkurvenanalyse.

Tabelle 2. 7 Verwendete Primer für die Genexpressionsmessung der qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	PCR-Produktlänge	Annealing-Temperatur	Referenz
IntACTB-2	f: CTATCCCTGTACGCCTCTGG r: GTCACGCACGATTTCCCGC	197 bp	56 °C	diese Arbeit
Int-TLR2	f: GCAGAAGCGCTGGGGAATGG r: GGATGCCTACTGGGTGGAGAA	280 bp	52 °C	(Vizoso Pinto et al., 2009)
Int-TLR4	f: GGTGGAAGTTGAACGAATGG r: CCAGCAAGAAGCATCAGGTG	182 bp	54 °C	(Vizoso Pinto et al., 2009)
Int-TLR9	f: GAGCGCAGTGGCAGACTGGGTG r: CACAGGTTCTCAAAGAGGGT	132 bp	54 °C	(Vizoso Pinto et al., 2009)

Tabelle 2. 8 qRT-PCR-Programm

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 × Denaturierung	95 °C	180 s
35 × {	Denaturierung	95 °C
	Annealing	siehe Tabelle 2. 7
	Elongation	72 °C

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand von Cycle threshold (Ct)-Werten, diese beschreiben den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über das Grundrauschen (Hintergrundrauschen) ansteigt. Um eine relative Quantifizierung der Genexpression durchführen zu können, wurde als interne Kontrolle das Haushaltsgen (nicht-reguliertes Gen) β -Aktin mitgeführt und die gemessenen Ct-Werte der untersuchten Proben mittels der Software iQ5 auf dieses normiert. Ebenfalls wurden Negativkontrollen sowie Extraktionskontrollen (RT⁻-Proben) mitgeführt.

2. 6 Statistische Methoden

Die Daten aus den Versuchen wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die Berechnung erfolgte mit der Software Excel (MS Office 2007).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-test für unabhängige Proben. Ein p-Wert $< 0,05$ gilt als signifikant, die Überschreitungswahrscheinlichkeit der aus den Daten berechneten Prüfstatistik liegt somit unter 5 %.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur IL-8 Modulation von infizierten HT29 Zellen

Es wurden die Wechselwirkungen von EHEC-Stämmen (siehe Tab. 2. 2.) mit verschiedenen Stämmen der Genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Staphylococcus* (siehe Tab. 2. 3) im Zellkulturmodell untersucht. Dabei wurden humane Kolonkarzinomzellen (HT29) wie in Kapitel 2. 2. 3 beschrieben, sowohl mono- als auch co-infiziert.

Als Marker für die Infektionsstärke wurde die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 gemessen, welches 6 h nach erfolgter Infektion im Zellkulturüberstand mittels eines ELISAs quantifiziert wurde (siehe Kapitel 2. 3. 1). Im menschlichen Körper wirkt IL-8 als Lockstoff für phagozytierende Zellen, welche über einen chemischen Gradienten aus der Blutbahn an den Infektionsherd gelockt werden und somit eine Entzündung initiieren können. Als Positivkontrolle wurde TNF- α (50 ng/ml), als Negativkontrolle PBS eingesetzt.

Die Infektion von HT29-Zellen mit verschiedenen pathogenen *E. coli*-Stämmen unterschiedlicher Virulenzprofile (siehe Tab. 2. 2) löste die Sekretion von hohen, jedoch nur geringfügig voneinander abweichenden Mengen an IL-8 aus (siehe Tab. 6. 1). So führte die Infektion von HT29 Zellen mit den HUS-Isolaten PMK5, 2331/01 und 5791/99 zu IL-8 Sekretionen in Höhe von 207,3, 224 und 213 pg/ml (Abb. 3. 1). Die ursprünglich aus Lebensmitteln isolierten Stämme EDL933 und TS18/08 verursachten bei Infektion der Darmepithelzellen ähnliche Mengen an IL-8 Sekretion in Höhe von 210,4 bzw. 246,1 pg/ml.

Die Stimulation der HT29 Zellen mit Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen (siehe Tab. 2. 3; eingesetzte MOI 200) führte hingegen bei keinem der untersuchten Stämme zur Sekretion von IL-8. Die untersuchten Stämme zeigten IL-8 Stimulationen in einem Bereich von 23,8 pg/ml (*B. breve* DSMZ 20213) bis 36,8 pg/ml (*L. johnsonii* DSMZ 10533; siehe Tab. 6. 1. 1). Die Mittelwertberechnung der mit benignen Stämmen durchgeführten Epithelzellstimulationen zeigte, dass im Durchschnitt 31,5 pg/ml IL-8 gebildet wurden und somit in einem mit der Negativkontrolle PBS vergleichbaren Bereich von 36,1 pg/ml IL-8 liegt (Abb. 3. 1).

Infolgedessen stellten die eingesetzten, nicht-pathogenen Teststämme keinen über die IL-8-Sekretion messbaren inflammatorischen Reiz für die Epithelzellen dar.

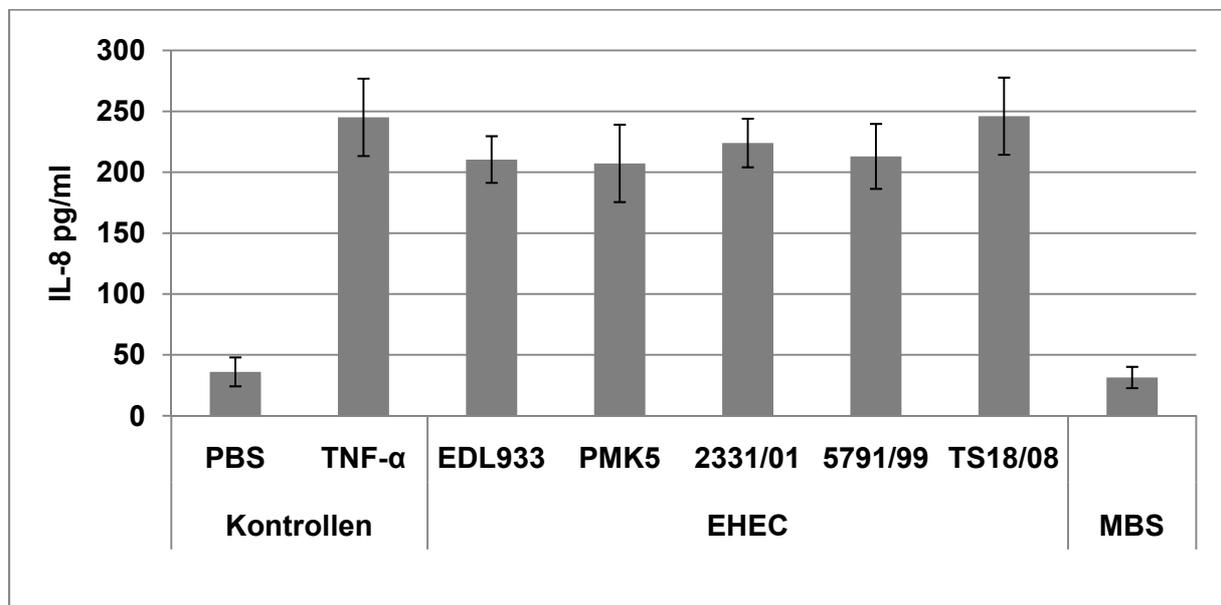


Abbildung 3. 1 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion von HT29 Zellen mit EHEC (MOI 2) oder Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Negativkontrolle: PBS; Positivkontrolle: TNF- α (50 ng/ml). MBS: Mittelwertberechnung aller Ergebnisse von Mono-Infektionen mit Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211.

3. 1. 1 Co-Infektion von HT29 Zellen mit verschiedenen Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen und EDL933

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien und Staphylokokkus-Stämme die IL-8-Sekretion von EDL933-infizierten Zellen modulieren können, wurden parallel zu den Mono-Infektionsversuchen Co-Infektionsversuche durchgeführt. Dabei wurden HT29-Zellen gleichzeitig mit EDL933 (MOI 2) und Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- bzw. Staphylokokkus-Stämmen (Tab. 2. 3; eingesetzte MOI 200) infiziert und die sekretierte IL-8 Menge nach sechsstündiger Inkubation im Zellkulturüberstand analysiert. Dabei zeigten die einzelnen Stämme eine deutlich unterschiedliche Reaktion (Tab. 3. 1). Von den insgesamt 19 getesteten Stämmen konnten 12 Stämme nur geringe Effekte (< 30 % Reduzierung) auf die IL-8 Sekretion der mit EDL933 infizierten Zellen ausüben. Sieben Stämme reduzierten die IL-8 Menge um mehr als 30 %, die stärkste Absenkung zeigte der Stamm *B. breve*

DSMZ 20213 mit 73,2 %. Ebenfalls sehr gute Effekte zeigten die Stämme *S. pasteurii* LTH 5211, *L. rhamnosus* GG und *B. adolescentis* DSMZ 20086 mit Reduktionen im Bereich von 57,8 bis 50,1 %.

Tabelle 3. 1 Reduktion der von EDL933-induzierten IL-8 Sekretion von HT29 Zellen 6 h nach erfolgter Co-Infektion mit Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen. Die IL-8 Sekretion nach Monoinfektion von HT29 Zellen mit EDL933 entspricht 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm	IL-8 Reduktion [%]
Reduktion der IL-8 Sekretion > 30 %:	
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	73,2 ± 2,6
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	57,8 ± 10,0
<i>L. rhamnosus</i> GG	56,3 ± 7,4
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	50,1 ± 7,9
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	43,0 ± 8,4
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	42,8 ± 5,1
<i>B. lactis</i> NCC 362	32,9 ± 7,9
Reduktion der IL-8 Sekretion < 30 %:	
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSMZ 20081	17,4 ± 7,8
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	15,5 ± 8,3
<i>L. paracasei</i> BFE 688	13,3 ± 11,1
<i>L. paracasei</i> BFE 675	13,2 ± 13,7
<i>L. acidophilus</i> BFE 704	12,1 ± 5,3
<i>L. paralimentarius</i> DSMZ 13238	9,8 ± 5,1
<i>L. johnsonii</i> BFE 663	8,4 ± 11,9
<i>L. intestinalis</i> DSMZ 6629	6,5 ± 5,6
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	5,2 ± 7,4
<i>L. plantarum</i> LTH 6724	4,9 ± 11,6
<i>S. carnosus</i> DSMZ 20501	3,9 ± 3,1
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	0,5 ± 1,1

Somit konnten bestimmte Stämme unterschiedlicher Genera eine Reduzierung der EDL933-induzierten IL-8 Bildung und somit einen anti-proinflammatorischen Effekt bei HT29 Zellen hervorrufen. Bei der Betrachtung der anti-proinflammatorischen Effekte auf Stamm-Ebene zeigten sich deutlich verschiedene IL-8 Reduktionen. In Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und dem Stamm *B. adolescentis* DSMZ 20086 konnte eine IL-8 Reduktion von 50,1 % erzielt werden, wohingegen der Stamm *B. adolescentis* DSMZ 20083 im Co-Infektionsversuch mit EDL933 eine Reduktion der IL-8 Menge von 15,5 % zeigte. In Co-Infektionsversuchen mit *L. johnsonii* DSMZ 10533 und EDL933 konnte die IL-8 Sekretion um 43 % abgesenkt werden, in Co-Infektionen mit *L. johnsonii* BFE 663 wurde hingegen eine IL-8 Reduktion von 8,4 % erzielt. Somit ist von einem stammspezifischen Effekt auszugehen.

3. 1. 2 Co-Infektion von HT29 Zellen mit verschiedenen EHEC-Stämmen unterschiedlicher Virulenzprofile und Milchsäurebakterien-, Bifidobakterien- oder Staphylokokkus-Stämmen

In weiteren Co-Infektionsversuchen wurden die pathogenen *E. coli*-Stämme PMK5, 2331/01, 5791/99 und TS18/08 eingesetzt. Von den Milchsäurebakterien, Bifidobakterien und Staphylokokken wurden die Stämme mit der stärksten IL-8-reduzierenden Aktivität ausgewählt: *B. breve* DSMZ 20213, *L. rhamnosus* GG, *S. pasteurii* LTH 5211, *B. adolescentis* DSMZ 20086, *L. johnsonii* DSMZ 10533, *L. reuteri* ATCC 55730 und *B. lactis* NCC 362. Die Stämme *L. fermentum* DSMZ 20052 und *L. helveticus* DSMZ 20075 wurden als Kontrollen eingesetzt. Der Stamm *B. adolescentis* DSMZ 20083 wurde für den direkten Vergleich mit dem Stamm *B. adolescentis* DSMZ 20086 ebenfalls in weiteren Co-Infektionsversuchen eingesetzt.

Es zeigte sich, dass der protektive anti-inflammatorische Effekt bestimmter Milchsäurebakterien-, und Bifidobakterien-Stämme sowie von *S. pasteurii* LTH 5211 auf EHEC-infizierte HT29-Zellen bei unterschiedlichen EHEC-Pathotypen verschieden ausgeprägt ist (Tab. 6. 2). In allen Co-Infektionsversuchen konnte beobachtet werden, dass die protektiven Effekte der getesteten Milchsäurebakterien und Staphylokokkus-Stämme pathogen-abhängig waren (Abb. 3. 2. und Abb. 3. 3.).

In Co-Infektionsversuchen mit *B. breve* DSMZ 20213 und EDL933 war die IL-8 Sekretion der HT29 Zellen um 73,2 % reduziert, mit PMK5 noch um 44,5 % (Abb. 3. 2 A). Mit den weiteren EHEC-Stämmen sank die IL-8 Sekretion zwischen 54,4 %

und 18,2 %. Der nicht zu den Milchsäurebakterien zählende, koagulase-negative Stamm *S. pasteurii* LTH 5211 zeigt in Co-Infektionsversuchen mit EHEC ebenfalls eine Reduzierung der EHEC-induzierten IL-8 Sekretion der HT29-Zellen. Bei der Co-Infektion mit EDL933 konnte eine Reduzierung von 57,8 %, bei der Co-Infektion mit PMK5 eine Reduzierung von 39,9 % gezeigt werden. In Co-Infektionsversuchen mit dem Stamm 5791/99 konnte *S. pasteurii* LTH 5211 als einziger der getesteten nicht-pathogenen Stämme eine Reduktion der IL-8 Sekretion der infizierten Zellen über 40 % erzielen, die Absenkung betrug 63,4 % im Vergleich zur Monoinfektion. In Co-Infektion mit 2331/01 und TS18/08 konnten nur leichte Effekte in Höhe von 27,2 % bzw. 18,3 % Reduktion beobachtet werden. *L. rhamnosus* GG zeigte ebenfalls eine stärkere IL-8 Reduktion in Co-Infektionsversuchen mit EDL933 (56,3 % Absenkung), als in Co-Infektionsversuchen mit PMK5 (39,5 %), 2331/01 (11,7 %), 5791/99 (24,2 %) oder TS18/08 (19,9 %). *B. adolescentis* DSMZ 20086 erzielte die stärkste Absenkung der EHEC-induzierten IL-8 Sekretion in Co-Infektion mit dem Stamm 2331/01 (56,7 %), in Co-Infektion mit EDL933 und PMK5 konnten Reduzierungen in Höhe von 50,1 % und 42,3 % erzielt werden. Die Effekte in Co-Infektionsversuchen mit 5791/99 und TS18/08 lagen < 30 % (29,7 % und 23,1 %). Der Stamm *L. johnsonii* DSMZ 10533 erzielte in Co-Infektion mit EDL933 und PMK5 Reduktionen in Höhe von 44,7 % bzw. 46,3 %. In Co-Infektionsversuchen mit den weiteren EHEC-Stämmen wurden Reduktionen in Höhe von 22,6 % bis 20,1 % gemessen.

Der Stamm *L. reuteri* ATCC 55730 konnte die IL-8 Bildung der Epithelzellen nach Co-Infektionen mit den Stämmen EDL933 und PMK5 um 42,8 % bzw. um 35 % absenken, in Co-Infektion mit den anderen EHEC-Stämmen wurden Reduktion zwischen 11 % bis 4,3 % gemessen (Abb. 3. 2 B). *B. lactis* NCC 362 konnte in Co-Infektionsversuchen mit den verschiedenen EHEC-Stämmen nur geringe Effekte zeigen. Wurde die IL-8 Sekretion bei Stimulation der Epithelzellen mit dem Stamm EDL933 noch um 32,9 % reduziert, konnten in Co-Infektionsversuchen mit den anderen EHEC-Stämmen nur noch Reduktionen in Höhe von 28,2 % bis 13,2 % gemessen werden.

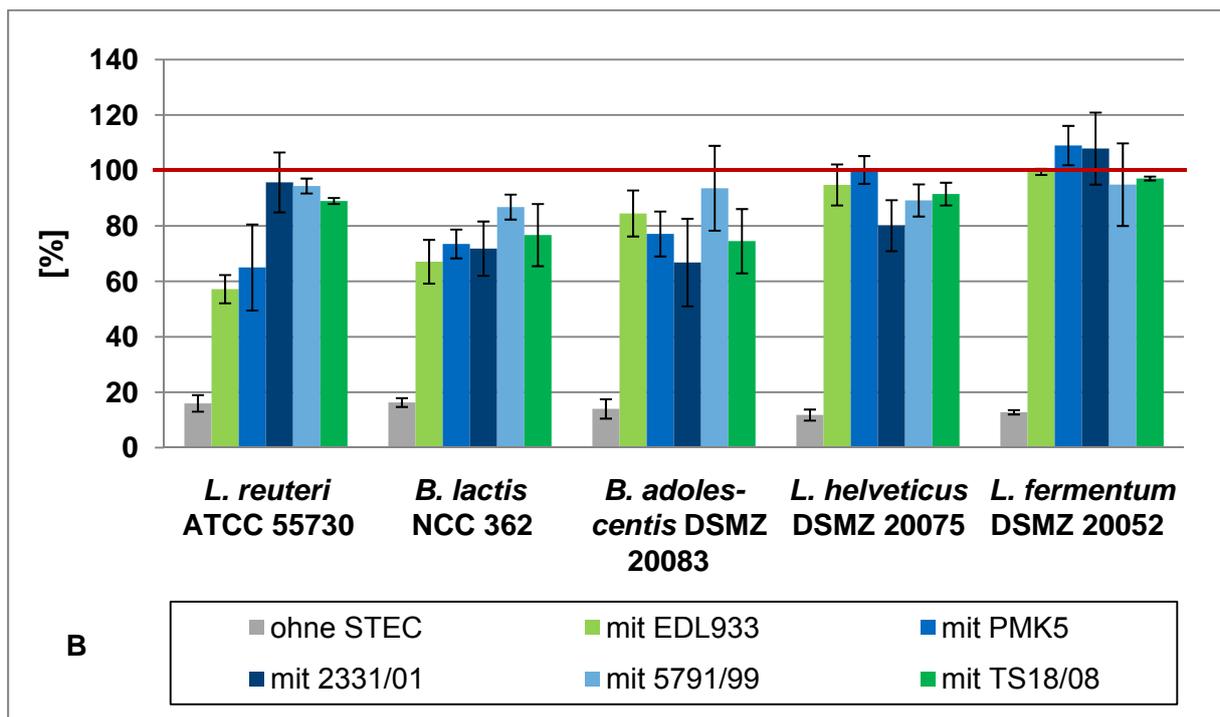
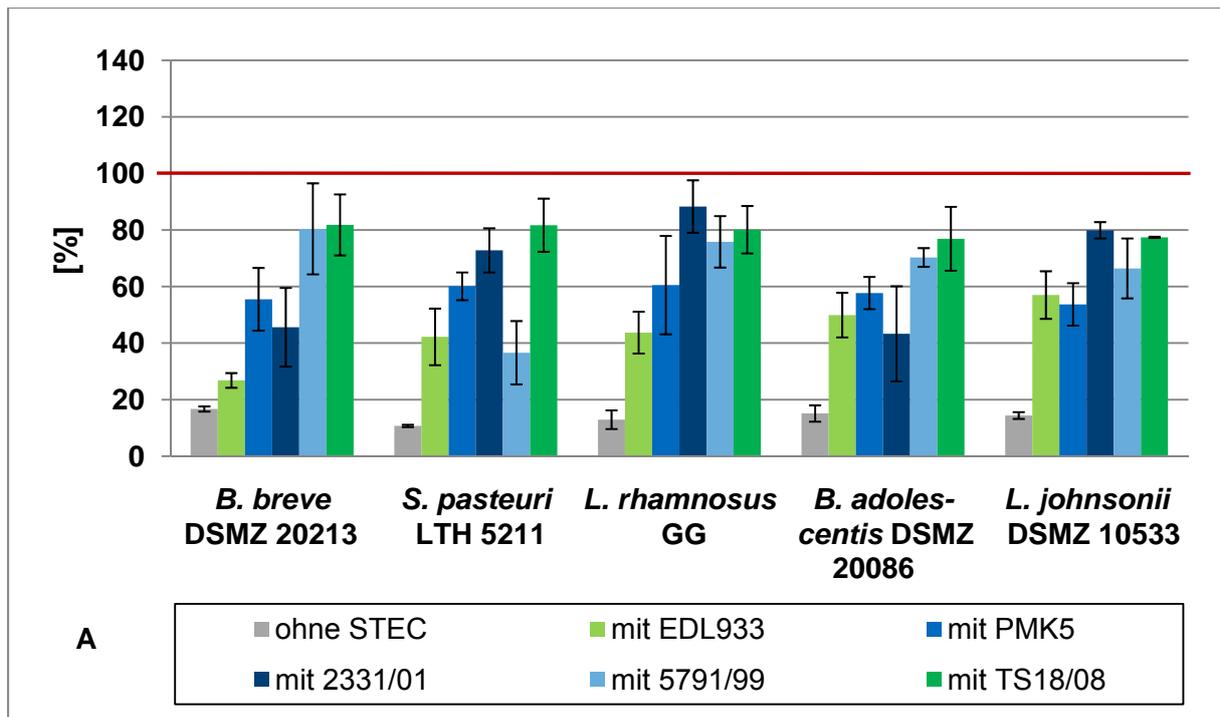


Abbildung 3. 2 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit EHEC (MOI 2) und/oder Milchsäurebakterienstämmen, Bifidobakterienstämmen bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200); Negativkontrolle: PBS; Positivkontrolle: TNF- α (50 ng/ml). Die Mono-Infektion mit EHEC ist als absolut = 100 % dargestellt (rote Linie). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen abgebildet. Bei den in grün dargestellten EHEC-Stämmen handelt es sich um Lebensmittelisolate, bei den in blau dargestellten EHEC-Stämmen um HUS-Isolate.

B. adolescentis DSMZ 20083 zeigte den besten IL-8 reduzierenden Effekt auf mit dem Stamm 2331/01 infizierte Zellen, die IL-8 Sekretion konnte um 33,2 % im Vergleich zur Monoinfektion verringert werden. In weiteren Co-Infektionsversuchen mit EHEC konnte die IL-8 Sekretion nur gering beeinflusst werden, bei EDL933, PMK5 und TS18/08 infizierten Zellen wurden Reduktionen in Höhe von 25,5 % bis 15,5 % gemessen, bei Infektion mit dem Stamm 5791/99 konnte die IL-8 Sekretion jedoch nur um 6,4 % reduziert werden.

Die Stämme *L. helveticus* DSMZ 20075 und *L. fermentum* DSMZ 20052 zeigten in den Infektionsversuchen mit EDL933 (siehe Kapitel 3. 1. 1) keinen protektiven Effekt und wurden daher für die Versuche mit den weiteren EHEC-Pathotypen als Kontrollstämme mitgeführt. In Co-Infektionsversuchen mit den verschiedenen EHEC-Stämmen zeigten *L. helveticus* DSMZ 20075 und *L. fermentum* DSMZ 20052 ebenfalls keinen reduzierenden Effekt, es wurden Reduktionen in Höhe von 19,9 % bis 0,5 % gemessen. *L. fermentum* DSMZ 20052 zeigte in Co-Infektionsversuchen mit PMK5 und 2331/01 sogar eine höhere IL-8 Sekretion, als bei der Monoinfektion der HT29 Zellen mit diesen EHEC-Stämmen gemessen wurde (Abb. 3. 3 B).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die beobachteten Reduktionen der IL-8 Sekretion durch eine verminderte Viabilität der doppelt infizierten HT29-Zellen verursacht wurde, wurden Positivkontrollen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit dem EHEC-Stamm EDL933 und den Teststämmen, *B. breve* DSMZ 20213, *S. pasteurii* LTH 5211, *L. rhamnosus* GG und *B. adolescentis* DSMZ 20086 co-infiziert und zusätzlich mit TNF- α (50 ng/ml) stimuliert. Als Vergleich wurden nur mit TNF- α stimulierte HT29-Zellen mitgeführt. Durch die Zugabe von TNF- α müssten viable Zellen wieder zur Bildung von IL-8 angeregt werden. Sechs Stunden nach der erfolgten Stimulation der HT29 Zellen mit den Bakterienstämmen wurden im Vergleich zu TNF- α stimulierten HT29-Zellen IL-8 Sekretionen in Höhe von 95,3 % (*B. breve* DSMZ 20213) bis 100,4 % (*L. rhamnosus* GG) gemessen (Tab. 3. 2). Die Stimulation der Zellen durch das TNF- α wurde von den verschiedenen Bakterienstämmen nicht beeinflusst, somit ist die Viabilität der Zellkultur gewährleistet und die vielfach verringerte IL-8 Sekretion nicht auf die Anwesenheit der großen Zahl von Bakterien zurückzuführen.

Tabelle 3. 2 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Stimulation von HT29-Zellen mit EDL933 (MOI 2) + TNF- α (50 ng/ml) + Teststamm (MOI 200). Die IL-8 Induktion von HT29-Zellen nach Infektion mit TNF- α (50 ng/ml) beträgt 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm	IL-8 Induktion [%]
<i>L. rhamnosus</i> GG	100,4 \pm 8,9
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	96,1 \pm 5,9
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	95,3 \pm 1,5
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	96,1 \pm 1,2

3. 1. 3 Co-Infektion von HT29 Zellen mit dem EHEC-Stamm EDL933 und Zelllysaten von benignen Bakterien bzw. deren Kulturüberständen

Es wurde untersucht, ob die beobachteten, in Abschnitt 3. 1. 1 beschriebenen Reduktionen der IL-8 Sekretion nur von lebenden Bakterien bewirkt werden können, oder ob auch lysierte Bakterien oder ein sekretierter Faktor eine Modulation der EHEC-induzierten IL-8 Sekretion auslösen. Dazu wurden wie in Kapitel 2. 2. 4 beschrieben, Kulturüberstände und Zelllysate von den Stämmen *S. pasteurii* LTH 5211, *L. rhamnosus* GG und *L. johnsonii* DSMZ 10533 hergestellt. HT29-Zellen wurden mit EDL933 (MOI 2) und inaktivierten Testbakterien (MOI 200), oder mit EDL933 und steril filtriertem Kulturüberstand der zu testenden Bakterien infiziert. Als Kontrollen wurden in den Versuchen ebenfalls lebende Testbakterien mitgeführt, sowie steril filtriertes mMRS-Medium (100 μ l).

Es zeigte sich, dass in Co-Infektionsversuchen nur die lebenden Testbakterien einen Einfluss auf die EDL933-induzierte IL-8 Sekretion der HT29-Zellen ausübten. Weder die inaktivierten Bakterienkulturen, noch die Kulturüberstände der lebenden Bakterien konnten die IL-8-Sekretion modulieren, die gemessenen Werte entsprachen den Werten der EDL933-Monoinfektion (91,5 – 103,4 %, Abb. 3. 3). Dabei wurde kein Unterschied zwischen *S. pasteurii* LTH 5211, *L. rhamnosus* GG und *L. johnsonii* DSMZ 10533 festgestellt. Keine IL-8 stimulierende Reaktion auf HT29-Zellen wurde bei dem alleinigen Einsatz von Kulturüberstand, inaktivierten Bakterienkulturen oder steril filtriertem mMRS-Medium beobachtet (12,3 – 26,2 %; siehe Tab. 6. 3), die Werte entsprachen den Ergebnissen der Negativkontrolle PBS

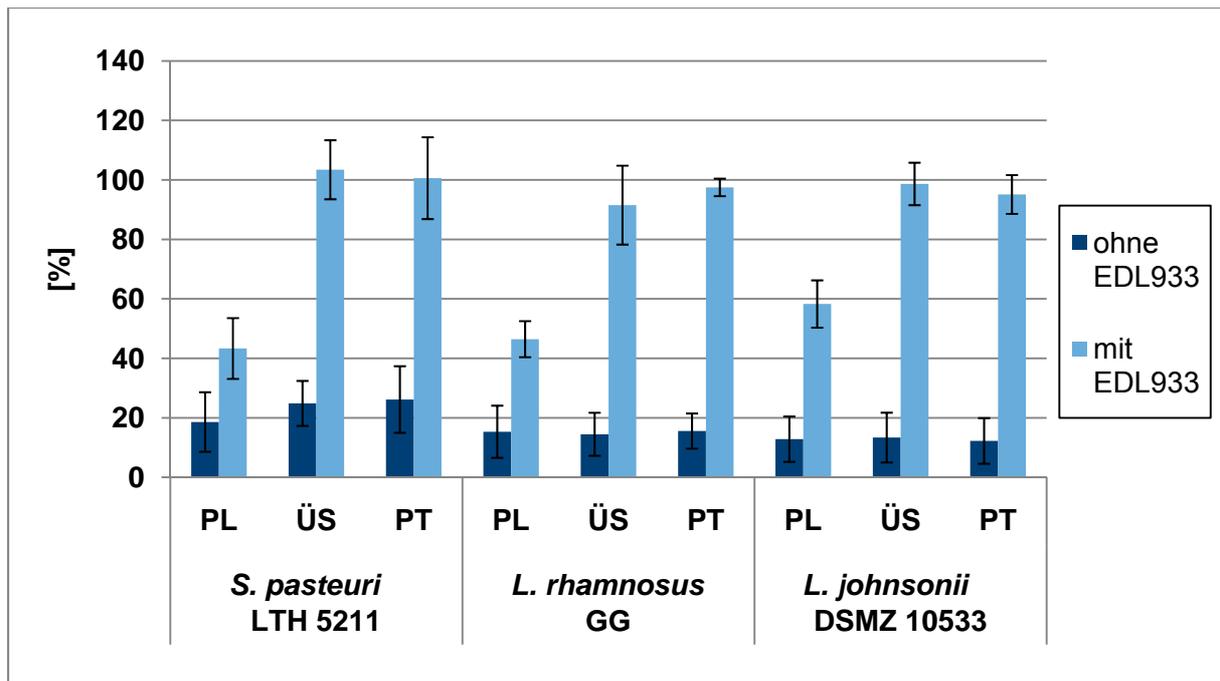


Abbildung 3.3 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2) und/oder MSB bzw. *S. pasteurii* (MOI 200); Negativkontrolle: PBS; Positivkontrolle TNF- α (50 ng/ml). Für die Zellstimulationen ohne EDL933 wurde die Stimulation mit TNF- α als absolut = 100 %. Für die Co-Infektionen mit EDL933 wurde die Monoinfektion mit EDL933 als absolut = 100 % als Berechnungsgrundlage herangezogen. PL = Pellet lebender Bakterien, ÜS = Überstand des Pellets lebender Bakterien; PT = Pellet abgetöteter Bakterien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

3.1.4 Untersuchung des Einflusses von organischen Säuren auf die IL-8 Sekretion von EHEC-infizierten HT29 Zellen

Es wurde der Einfluss von organischen Säuren auf die IL-8-Sekretion von EDL933-infizierten HT29-Zellen untersucht. Milchsäurebakterien, *S. pasteurii* LTH 5211 und EDL933 bilden unter Zellkulturbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) aus Glucose Säure. In dem eingesetzten Zellkulturmedium DMEM waren 4,5 g/l Glucose enthalten.

In den Überständen der Zellkulturen wurden 6 h nach erfolgter Mono- bzw. Co-Infektion mit EDL933 und/oder *L. fermentum* DSMZ 20052, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* DSMZ 10533 und *S. pasteurii* LTH 5211 die gebildeten Säuren mittels HPLC (siehe Kapitel 2.3.2) qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Auswertung der Chromatogramme ergab, dass bereits HT29-Zellen 2,6 mmol/l Milchsäure bilden (Abb. 3.5). Bei der Monoinfektion der HT29-Zellen mit EDL933 konnten Milch-, Propion-, Ameisen- und Essigsäure nachgewiesen werden (Abb. 3.4). In den Überständen der HT29-Zellen, welche mit Milchsäurebakterien und

S. pasteurii LTH 5211 stimuliert waren, wurden Milch- und Propionsäure nachgewiesen (Abb. 3. 5), wobei die Menge an detektierbarer Propionsäure stets geringfügig über der Nachweisgrenze von 1 mmol/l lag. Ameisensäure konnte nur bei Mono- bzw. Co-Infektionsversuchen mit EDL933 nachgewiesen werden. Detektierbare Mengen an Essigsäure wurden bei Infektions- bzw. Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und *S. pasteurii* LTH 5211 gemessen.

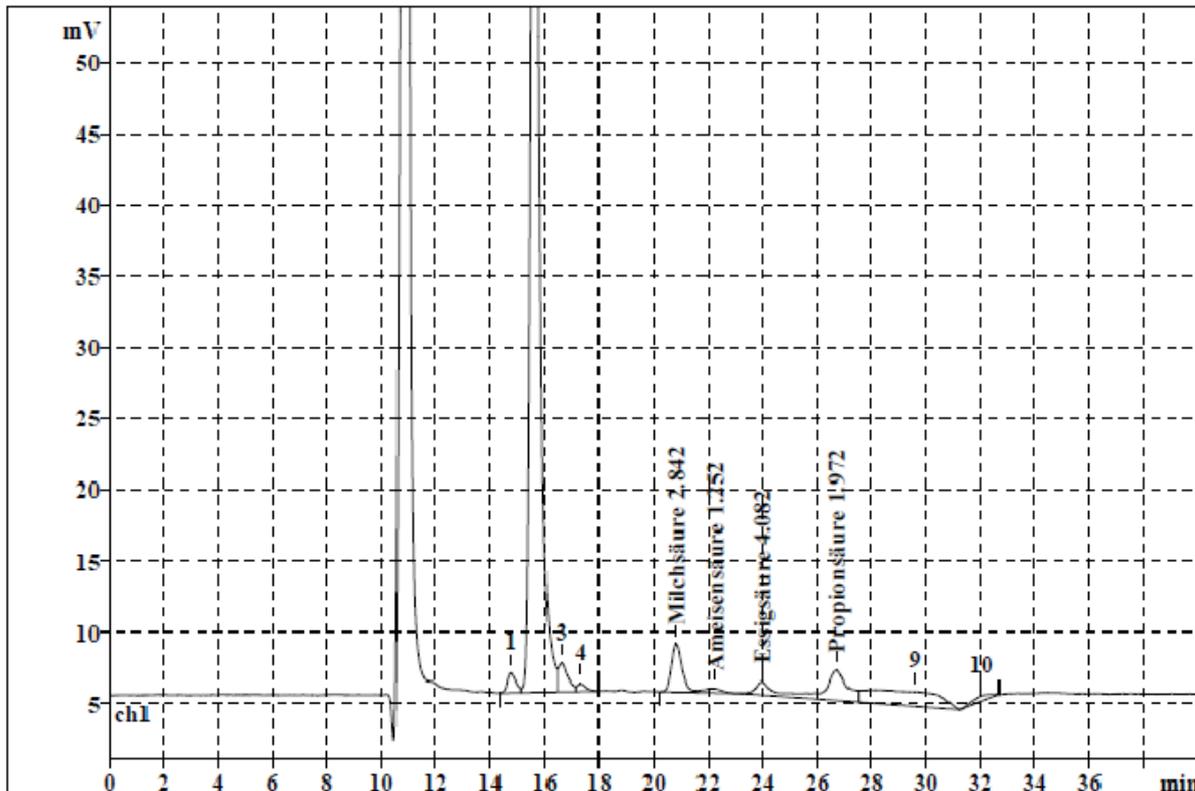


Abb. 3. 4 Detektion der gebildeten und in den Zellkulturüberstand sekretierten Säuren mittels HPLC. Dargestellt ist beispielhaft ein Chromatogramm der detektierten Säuren im Zellkulturüberstand 6 h nach Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2).

Die höchsten Werte an detektierbarer Milchsäure wurden in Versuchen mit *L. rhamnosus* GG gemessen (siehe Tab. 6. 4). In Mono-Infektionsversuchen wurden 5,9 mmol/l Milchsäure nachgewiesen, in Co-Infektion mit EDL933 stieg dieser Wert auf 6,8 mmol/l an. Ebenfalls eine hohe Milchsäurebildung zeigte *S. pasteurii* LTH 5211 mit 5,6 mmol/l, bei der Co-Infektion mit EDL933 wurden 6,2 mmol/l Milchsäure detektiert.

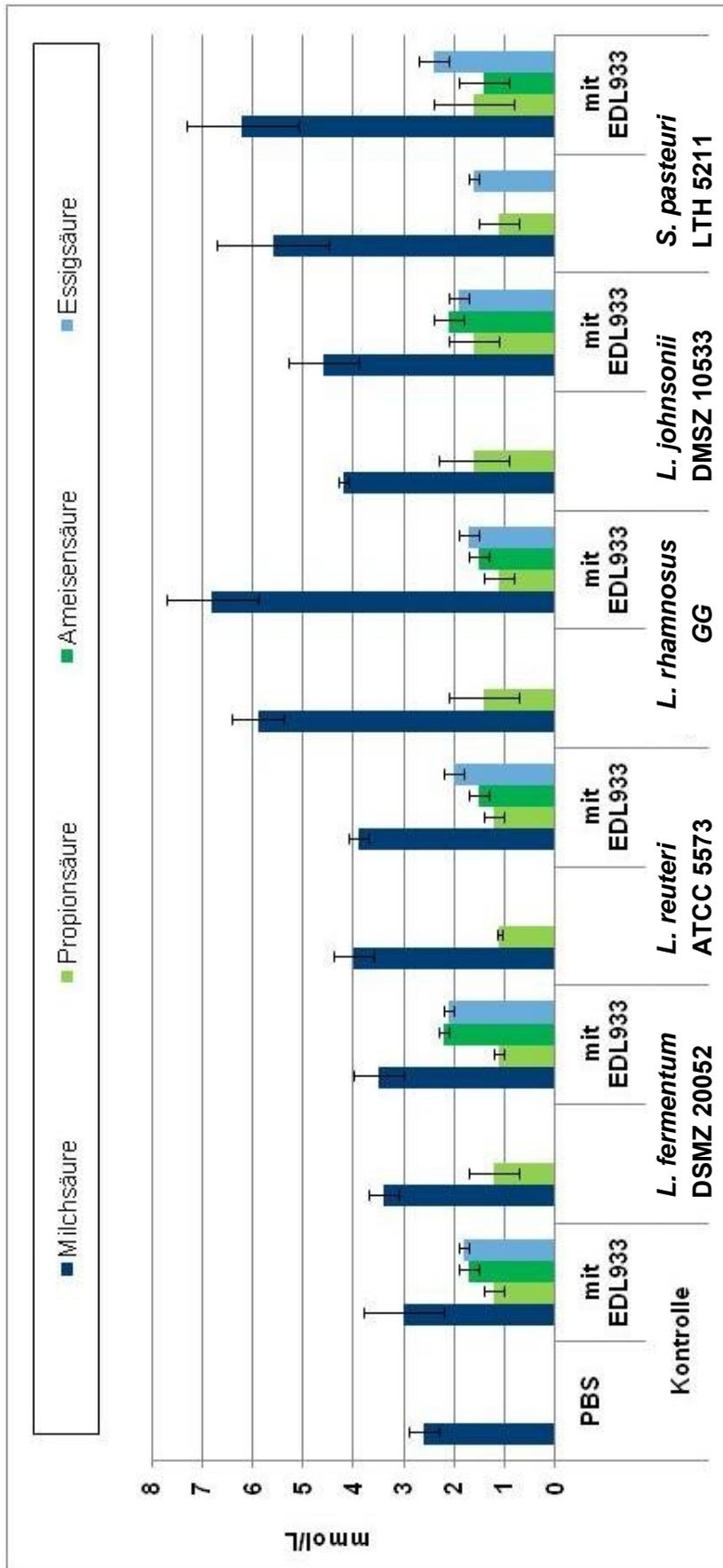


Abbildung 3. 5 Bildung von organischen Säuren im Zellkulturüberstand 6 h nach erfolgter Infektion- bzw. Co-Infektion mit EDL933 (MOI 2) und / oder Milchsäurebakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Negativkontrolle: PBS. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Bei den in grün gezeigten EHEC-Stämmen handelt es sich um Lebensmittelisolate, bei den in blau gezeigten EHEC-Stämmen um HUS-Isolate.

Des Weiteren wurde für *S. pasteurii* LTH 5211 die Bildung von 1,6 mmol/l Essigsäure nachgewiesen, zusammen mit EDL933 wurden 2,4 mmol/l Essigsäure detektiert. Im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit *L. johnsonii* DSMZ 10533 wurden 4,2 mmol/l Milchsäure, bei Co-Infektion mit EDL933 4,6 mmol/l Milchsäure nachgewiesen. Die Stämme *L. fermentum* DSMZ 20052 und *L. reuteri* ATCC 55730 bildeten im Zellkulturüberstand der HT29-Zellen 3,4 bzw. 4,0 mmol/l Milchsäure, wobei diese Werte bei der Co-Infektion mit EDL933 geringfügig anstiegen (3,5 und 3,9 mmol/l).

Um den Einfluss der gebildeten organischen Säuren auf die IL-8 Sekretion der EDL933-infizierten Zellen zu prüfen, wurden die HT29-Zellen in den 24well-Platten mit Zellkulturmedium versehen, welchem verschiedene Konzentrationen an Milchsäure oder Essigsäure zugesetzt wurde (siehe Kapitel 2. 3. 3). Die Zellen wurden mit EDL933 infiziert (MOI 2) und die IL-8 Sekretion im Überstand bestimmt. Zusätzlich zu der Negativkontrolle PBS wurden weitere Negativkontrollen mitgeführt, bei denen nicht-infizierte HT29-Zellen Zellkulturmedium mit 10 mmol/l Milchsäure oder Essigsäure ausgesetzt waren.

Die IL-8-Messung der Negativkontrollen ergab, dass weder die zugesetzte Milchsäure noch die Essigsäure einen Einfluss auf die HT29-Zellen ausübten. Im Vergleich zur Positivkontrolle TNF- α wurden 6,6 bzw. 6,1 % IL-8 detektiert, dieses entspricht dem Wert der Negativkontrolle PBS. Des Weiteren zeigte das mikroskopische Bild der Zellkulturen eine gleichmäßige, normale Zellmorphologie und kein Ablöseverhalten auf. In den Infektionsversuchen mit EDL933 zeigte sich, dass die Zugabe von Milch- oder Essigsäure nur einen geringen Einfluss auf die IL-8 Sekretion der Epithelzellen hatte. Wie oben beschrieben, bildeten die untersuchten Milchsäurebakterien-Stämme und *S. pasteurii* LTH 5211 im Versuchsverlauf bis zu 5,9 mmol/l Milchsäure. Bei der Monoinfektion mit EDL933 und einer Milchsäurekonzentration von 6 mmol/l konnte keine IL-8 Reduktion nachgewiesen werden (Abb. 3. 6).

Mit steigender Milchsäurekonzentration im Medium wurde eine geringe Abnahme der IL-8 Menge (um bis zu 19,2 % bei 15 mmol/l Milchsäure) beobachtet (siehe Tab. 6. 5). Bei der Zugabe von Essigsäure im Infektionsversuch zeigte der Einsatz von 10 mmol/l nur eine sehr geringe Reduktion der IL-8 Sekretion um 8,8 %. Die Zugabe von 15 mmol/l Essigsäure führte zu einem Anstieg der IL-8 Sekretion (104,4 %) im Vergleich zur Infektion ohne Säurezugabe. Die in den Co-Infektionsversuchen

erzielten IL-8 Reduktionen von bis zu 60 % konnten durch den Einsatz der organischen Säuren nicht erzielt werden.

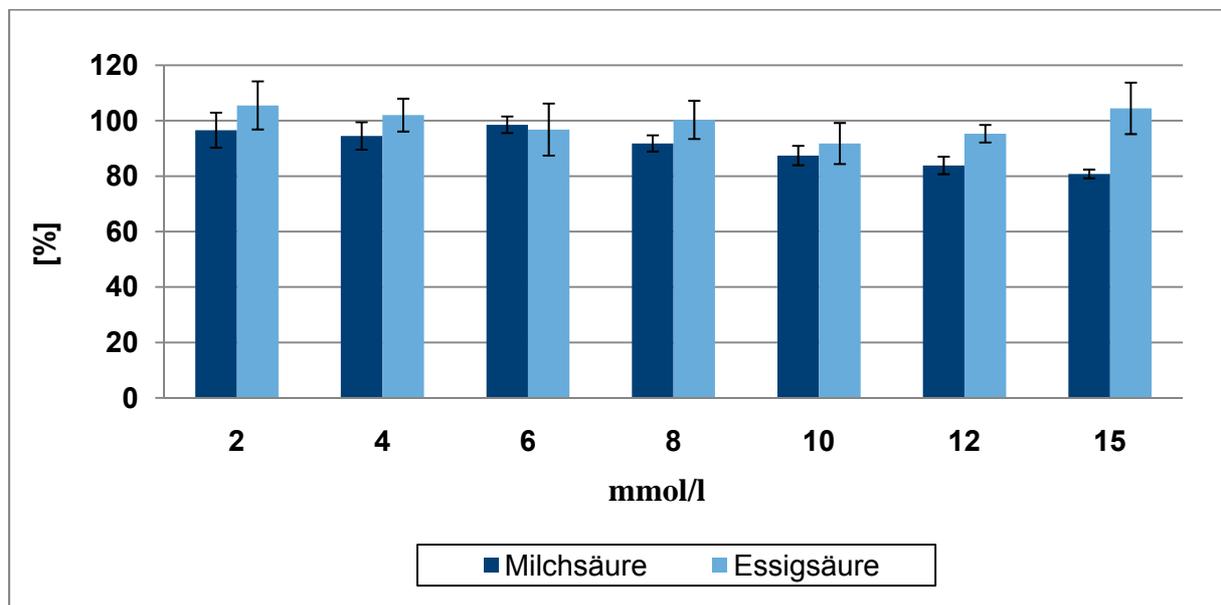


Abbildung 3. 6 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2) und 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 15 mmol/l Milchsäure bzw. Essigsäure im Medium. Negativkontrolle ohne Milch- bzw. Essigsäurezusatz: PBS. Die Infektion mit EDL933 ist als absolut = 100 % dargestellt. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt.

3. 1. 5 Untersuchungen zur IL-8 Sekretion von HT29 Zellen nach Infektion mit Deletionsmutanten des EHEC-Stammes PMK5

Es wurden Infektionsversuche mit 4 Deletionsmutanten des *E. coli* Stammes PMK5 durchgeführt, bei denen jeweils eines der Virulenzgene deletiert war: PMK5 Δtir , PMK5 Δeae , PMK5 $\Delta ehly$ und PMK5 $\Delta stx1$. Es sollte untersucht werden, ob die Deletion eines einzelnen PMK5-Virulenzgens die IL-8 Sekretion der infizierten HT29-Zellen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm moduliert. Ebenfalls wurden Co-Infektionsversuche mit den Deletionsmutanten und *S. pasteurii* LTH 5211 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2. 2. 3 beschrieben. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Stamm PMK5 in den Versuchen mitgeführt.

Die Bestimmung der IL-8 Mengen in den Zellkulturüberständen nach Monoinfektion der HT29-Zellen mit PMK5 und den mutierten Stämme zeigte die Bildung von 153 – 181,1 pg/ml IL-8 (Abb. 3. 7). Dabei konnten geringe, jedoch nicht signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm und den verschiedenen Mutanten-Stämmen

festgestellt werden (siehe Tab. 6. 6). So induzierten beispielsweise der Stamm PMK5 $\Delta ehly$ 181,1 pg/ml IL-8 und der Stamm PMK5 $\Delta stx1$ 176,9 pg/ml IL-8, der Wildtyp-Stamm PMK5 hingegen nur 153 pg/ml IL-8. Die durch PMK5 ausgelöste IL-8 Sekretionsstärke kann somit nicht allein auf eines der Virulenzgene *tir*, *eae*, *ehly* oder *stx1* zurückgeführt werden.

In Co-Infektionsversuchen mit *S. pasteurii* LTH 5211 und den Stämmen PMK5 Δtir oder PMK5 Δeae wurde die IL-8 Sekretion der infizierten Zellen im Vergleich zur Mono-Infektion mit diesen EHEC-Stämmen um 40,9 % bzw. 41,4 % abgesenkt (Abb. 3. 7). Die von den Stämme PMK5 $\Delta ehly$ und PMK5 $\Delta stx1$ hervorgerufenen IL-8 Sekretionen konnten durch die Co-Infektion mit *S. pasteurii* LTH 5211 jedoch nur um 28,6 % bzw. 27,7 % abgesenkt werden. Im Vergleich zu Co-Infektionsversuchen mit dem Wildtyp-Stamm PMK5 und *S. pasteurii* LTH 5211 (36,1 % Absenkung) sind diese Unterschiede jedoch nicht signifikant (Tab. 6. 7). Der protektive Effekt von *S. pasteurii* LTH 5211 war somit in allen Co-Infektionsversuchen vorhanden und weitgehend unabhängig von den untersuchten Genen.

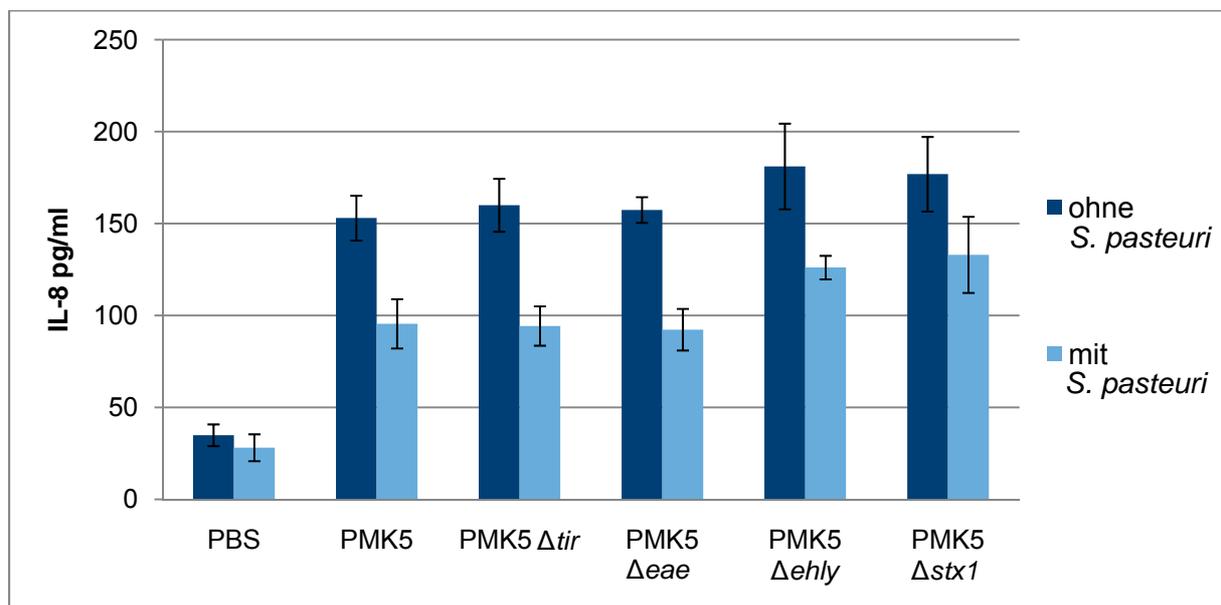


Abbildung 3. 7 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit PMK5/Mutanten von PMK5 (MOI 2) und/oder *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Negativkontrolle: PBS. Positivkontrolle: TNF- α (50 ng/ml). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt.

3.2 Einfluss von Milchsäure- und Bifidobakterien-Stämmen sowie *S. pasteurii* LTH 5211 auf die EHEC-induzierte NF-κB Aktivierung

Es wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuklearer Faktor-kappa B“ (NF-κB) in HT29-Zellen nach erfolgter Infektion bzw. Co-Infektion untersucht. Um die Effekte von *B. breve* DSMZ 20213, *L. rhamnosus* GG, *S. pasteurii* LTH 5211, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. johnsonii* DSMZ 10533, *L. fermentum* DSMZ 20052, *L. helveticus* DSMZ 20075, *B. lactis* NCC 362, *B. adolescentis* DSMZ 20083 und *B. adolescentis* DSMZ 20086 auf EHEC-infizierte HT29-Zellen zu untersuchen, wurden NF-κB Reporter-Gen-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 2. 4). Eine Vielzahl der von Darmepithelzellen als Reaktion auf eine bakterielle Infektion gebildeten Chemokine und Zytokine sind Zielgene von NF-κB. Dieser zentrale Regulator der angeborenen Immunantwort liegt, inaktiviert durch inhibitorische Proteine, im Cytoplasma der Zelle vor und kann durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise Zytokine (z. B. TNF-α) oder bakterielle Antigenstrukturen (z. B. LPS) aktiviert werden.

Wie in Kapitel 2. 4. 2 beschrieben, wurden die HT29 Zellen zunächst mit den Plasmiden pNF-κB-(5×)luc und pCMVβ-Gal transfiziert. Anschließend erfolgte die Durchführung der Infektionsversuche gemäß Kapitel 2. 4. 3 mit den EHEC-Stämmen EDL933, PMK5, 2331/01, 5791/99 und TS18/08 (alle MOI 2), sowie den oben genannten Milchsäure- und Bifidobakterien-Stämmen und *S. pasteurii* LTH 5211 (alle MOI 200). Als Negativkontrolle wurde PBS, als Positivkontrolle TNF-α mitgeführt.

Die Luciferaseaktivität der Zelllysate nach 6-stündiger Inkubation wurde auf die β-Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert. Die Grundaktivität der nichtinfizierten HT29-Zellen (Negativkontrolle PBS) wurde auf den Wert = 1 relative Lichteinheit (relative light unit = RLU) festgelegt und die weiteren Ergebnisse auf diesen Wert normiert.

Die Infektion der HT29-Zellen mit EHEC-Stämmen führte zu einem Anstieg an aktiviertem NF-κB, dabei konnten nur sehr geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen EHEC-Stämmen beobachtet werden. So zeigte der Stamm 2331/01 mit 1,55 RLU die niedrigste und der Stamm PMK5 mit 1,62 RLU die höchste NF-κB-Aktivität (Abb. 3. 8; Tab. 6. 8). Die Stämme EDL933, 5791/99 und TS18/08 lösten

alle eine identische NF- κ B-Aktivierung von 1,59 RLU aus. Bei der Stimulation der Epithelzellen mit Milchsäurebakterien, Bifidobakterien und *S. pasteurii* LTH 5211 zeigte sich, dass diese NF- κ B nicht aktivieren. Die gemessenen Aktivitäten lagen im Bereich von 0,64 RLU (*L. fermentum* DSMZ 20052) bis 0,83 RLU (*B. breve* DSMZ 20213; siehe Tab. 6. 8. 1) und somit unterhalb der NF- κ B-Grundaktivität von nicht-infizierten (Negativkontrolle PBS) HT29-Zellen.

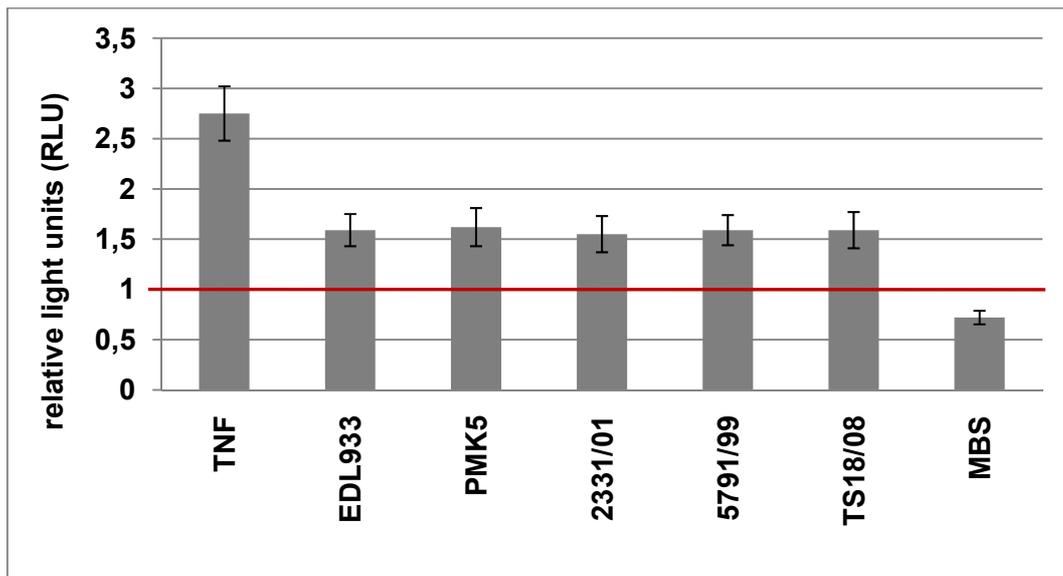


Abbildung 3. 8 Transfizierte HT29-Zellen nach Infektion mit EHEC (MOI 2). Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte wurden 6 h nach der Infektion auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert. Die Luciferaseaktivität nicht-infizierter Zellen (PBS) ist als absolut = 1 dargestellt (rote Linie). MBS: Mittelwertberechnung der Ergebnisse von Mono-Infektionen mit Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211. Negativkontrolle: PBS, Positivkontrolle: TNF- α (50 ng/ml). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt.

Bei der Co-Infektion der transfizierten Epithelzellen mit Milchsäurebakterien, Bifidobakterien, bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 und den verschiedenen EHEC-Stämmen zeigte der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine deutlich niedrigere Aktivität, als bei der EHEC-Mono-Infektion (Abb. 3. 9). Die Ergebnisse der Co-Infektionsversuche lagen deutlich unterhalb dem Wert der Negativkontrolle PBS. Alle eingesetzten Teststämme konnten die NF- κ B-Aktivität der EHEC-infizierten Zellen im Vergleich zur Mono-Infektion um 38,4 % - 67,6 % absenken (Tab. 6. 9).

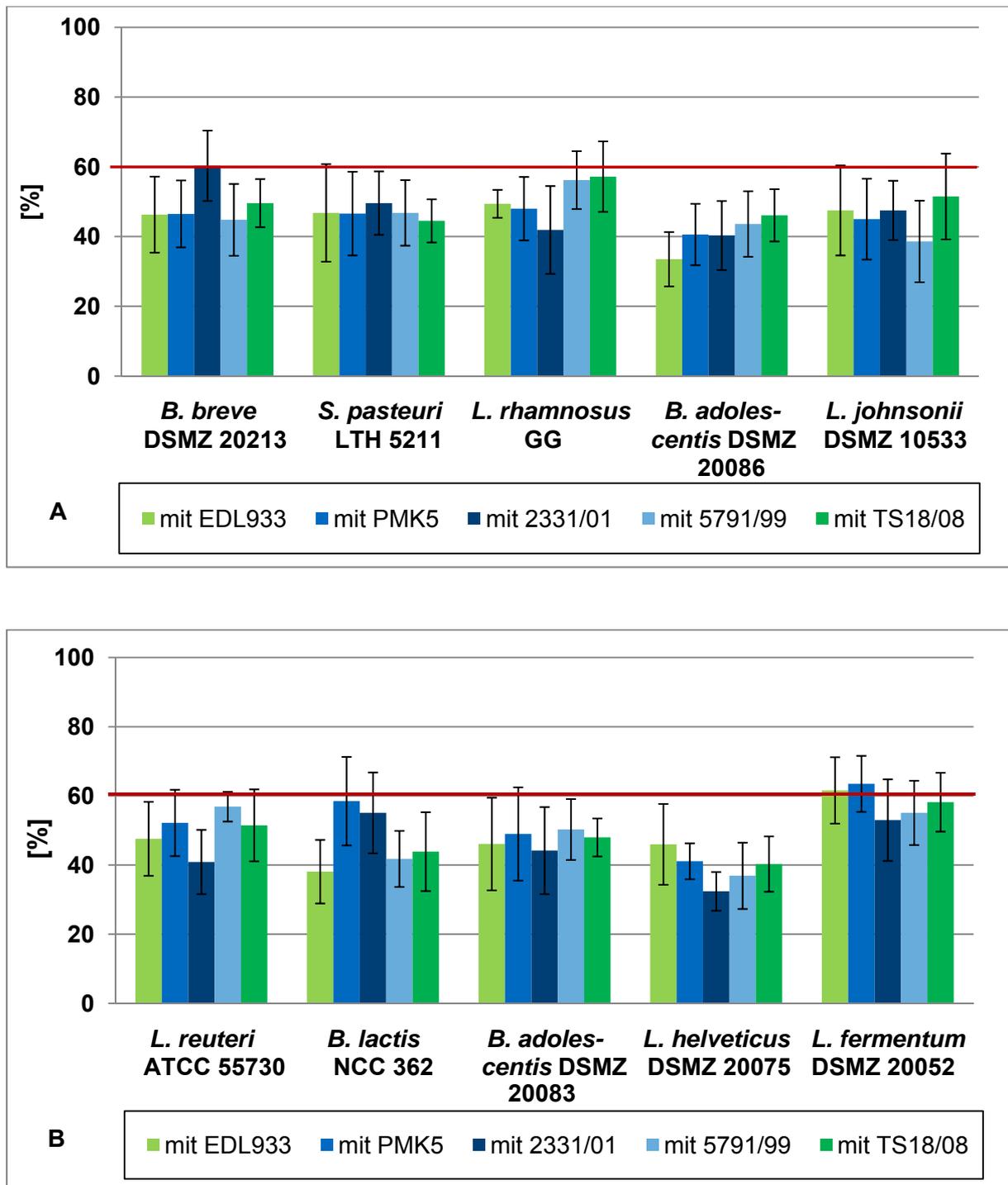


Abbildung 3. 9 Luciferaseaktivität transfizierter HT29-Zellen nach Co-Infektion mit verschiedenen EHEC-Stämmen und Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte wurden 6 h nach der Infektion auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert. Die Monoinfektion mit EHEC ist als absolut = 100 % dargestellt. Die Negativkontrolle PBS ist als rote Linie dargestellt (die Grundaktivität wurde auf den Mittelwert aller EHEC-Monoinfektionen = 1,62 RLU bezogen und in % umgerechnet) Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen abgebildet. Bei den in grün dargestellten EHEC-Stämmen handelt es sich um Lebensmittelisolate, bei den in blau dargestellten EHEC-Stämmen, um HUS-Isolate.

In Co-Infektionsversuchen mit EDL933 zeigten *B. adolescentis* DSMZ 20086 und *B. lactis* NCC 362 mit 66,5 % und 61,9 % die stärksten Reduzierungen der NF-κB Aktivierung. Die niedrigste Reduktion hingegen zeigte *L. fermentum* DSMZ 20052 mit 38,4 %. In Co-Infektionsversuchen mit PMK5 konnten die Stämme *B. adolescentis* DSMZ 20083 und *L. helveticus* DSMZ 20075 mit 59,4 % und 58,9 % die NF-κB Aktivierung am stärksten absenken. Hier zeigte wieder *L. fermentum* DSMZ 20052 die niedrigste Reduktion mit 36,5 %. Die NF-κB Aktivierung ausgelöst durch den EHEC-Stamm 2331/01 konnte wie bei dem Stamm PMK5 am stärksten durch *L. helveticus* DSMZ 20075 (67,6 %) und durch *B. adolescentis* DSMZ 20083 (59,7 %) reduziert werden. Die niedrigste Reduktion war hier jedoch bei Co-Infektion mit dem Stamm *B. breve* DSMZ 20213 zu beobachten, die NF-κB Aktivierung der HT29-Zellen verringerte sich um 39,7 %.

In Co-Infektionsversuchen mit dem Stamm 5791/99 konnten die Stämme *L. helveticus* DSMZ 20075 und *L. johnsonii* DSMZ 10533 mit 63,1 % bzw. 61,4 % die stärksten Reduktionen erzielen, die niedrigste Absenkung wurde für den Stamm *L. reuteri* ATCC 55730 gemessen (43,1 %).

Infektionen mit dem Lebensmittelisolat TS18/08 wurden am stärksten von den Stämmen *L. helveticus* DSMZ 20075 und *B. lactis* NCC 362 beeinflusst, die NF-κB Aktivierung verringerte sich um 59,7 % bzw. 56,1 %. Am wenigsten Einfluss zeigte *L. fermentum* DSMZ 20052 mit 41,8 % Reduktion.

Insgesamt konnte weder ein stammspezifischer noch ein pathogen-spezifischer Effekt festgestellt werden. Der Stamm *L. helveticus* DSMZ 20075 reduzierte die EHEC-induzierte NF-κB Aktivierung von transfizierten HT29-Zellen am stärksten. Der Stamm *L. fermentum* DSMZ 20052 hingegen zeigte insgesamt den geringsten Einfluss auf die NF-κB Aktivierung der Zellen.

3.3 Untersuchungen zur Genexpression von Toll-like Rezeptoren nach Infektion mit EDL933 und / oder Milchsäurebakterien

Es wurde die Genexpression von TLR2, -4 und -9 sechs Stunden nach erfolgter Infektion / Co-Infektion mit EDL933 und/oder *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* DSMZ 10533 und *L. fermentum* DSMZ 20052 mittels qRT-PCR quantifiziert. Dazu wurde die Gesamt-RNA von 1×10^6 HT29-Zellen wie in Kapitel 2. 5. 3 beschrieben isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die Expression der untersuchten Gene mittels qRT-PCR quantifiziert.

Zur Durchführung der Genexpressionsanalyse ist eine hohe Reinheit und Konzentration der isolierten RNA erforderlich. Um eine hohe RNA-Ausbeute zu erzielen, wurden die Zelllysate mittels QIAshredder-Säulchen homogenisiert, die DNA über gDNA-Eliminator-Säulchen entfernt und die Gesamt-RNA über RNeasy-Säulchen gewonnen. Über photometrische Messung der gewonnenen RNA wurde die Konzentration (OD_{260nm}) sowie die Reinheit ($OD_{260/280}$) ermittelt. Für alle untersuchten Proben wurden RNA-Konzentrationen zwischen 195 – 338 $\mu\text{g/ml}$ mit Ratios von 1,8 – 1,9 gemessen. Des Weiteren wurde mittels denaturierender Gelelektrophorese festgestellt, dass die mechanische Zellzerstörung keine Degradierung der Gesamt-RNA zur Folge hatte. Die Auswertung der Gelbilder ergab intakte Banden für die 28S rRNA (4,7 Kb) und 18S rRNA (1,8 Kb), so dass von qualitativ hochwertiger RNA ausgegangen werden konnte. Banden für die 5,8S rRNA und 5S rRNA konnten aufgrund ihrer geringen Größe (160 nt bzw. 120 nt) nicht visuell identifiziert werden (Abb. 3. 10).

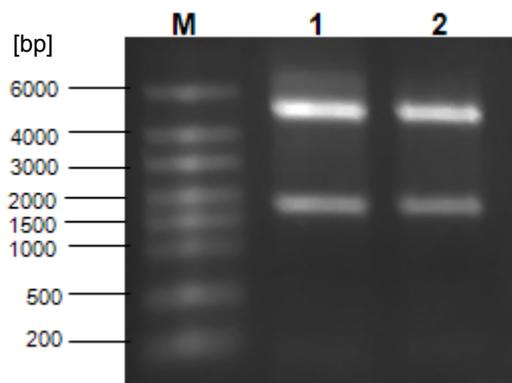


Abbildung 3. 10 Denaturierendes Agarosegel ausgewählter Proben mit jeweils 300 ng aufgereinigter Gesamt-RNA lysierter HT29-Zellen. M = Marker, 1 ng RNA-Ladder High Range (6000 – 200 kb); 1: Negativkontrolle PBS; 2: Monoinfektion mit EDL933 (MOI 2).

Je 1 µg der erhaltenen RNA wurden wie in Kapitel 2. 5. 5 beschrieben mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zur Detektion etwaiger Kontaminationen durch genomische DNA wurden zusätzlich RT⁻-Proben erstellt. Von der gewonnenen cDNA wurden 2,8 µg bzw. für die Untersuchung von TLR9 5,6 µg in die qRT-PCR eingesetzt.

Über Schmelzkurvenanalysen wurden die charakteristischen Schmelztemperaturen der PCR-Produkte bestimmt. Dazu wurde direkt im Anschluss eines real-time-PCR – Laufs die Temperatur kontinuierlich erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen. Wird die für das Fragment spezifische Schmelztemperatur erreicht, denaturieren die DNA-Doppelstränge und geben den SYBR Green Farbstoff frei, wodurch die Fluoreszenzaktivität abnimmt. Die dabei entstehende produktspezifische Schmelzkurve ermöglicht so eine Identifizierung von unspezifischen Primer-Dimeren. Alle verwendeten Primerpaare wurden mittels der Schmelzkurvenanalyse auf Dimer-Bildung überprüft. Es konnte keine Dimer-Bildung festgestellt werden, alle eingesetzten Primerpaare bildeten ausschließlich das für sie spezifische PCR-Produkt (Abb. 3. 11).

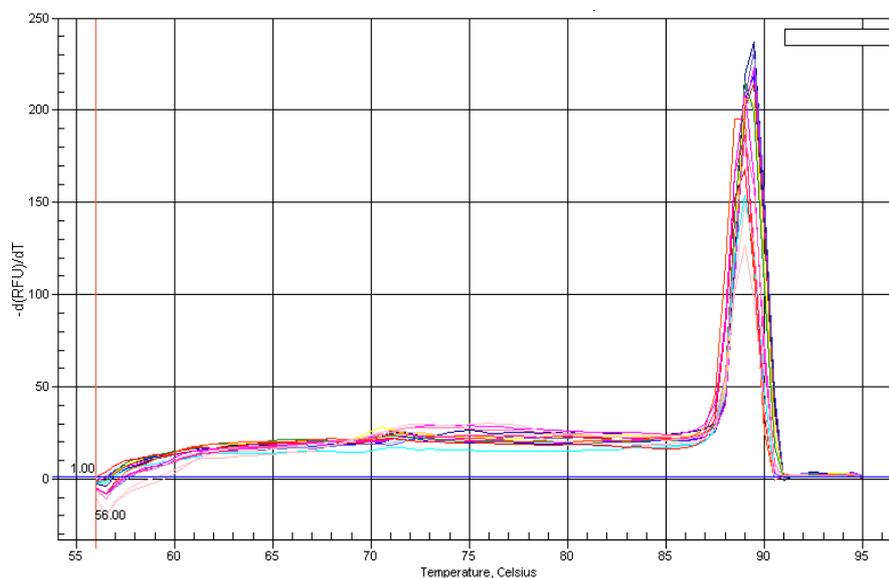


Abbildung 3. 11 Schmelzkurvenanalyse am Beispiel von β -Aktin, der Peak stellt die Bildung eines spezifischen Produkts dar, es konnten keine zusätzlichen Peaks und somit keine unspezifischen Produkte festgestellt werden.

Die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels real-time PCR stellt bis dato die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar (Pfaffl et al., 2004). Dazu werden zunächst die Expressionsraten der untersuchten Gene durch relative Quantifizierung ermittelt. Bei diesem Prinzip wird die Stärke der Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes Referenzgen (Haushaltsgen) bezogen. Diese Normalisierung der Expressionsergebnisse wird durch die Einbeziehung der unterschiedlichen real-time PCR Effizienzen der untersuchten Faktoren optimiert. Im Falle einer 100 % Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer Ct-Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzten cDNA; respektive mRNA Startmenge. In der Realität ist jedoch die Effizienz einer qRT-PCR nicht immer gleich, da sich die DNA-Menge nicht bei jeder PCR mit jedem Zyklus verdoppelt. Da bereits geringste Schwankungen in der Effizienz von Zielgen zu Referenzgen zu enormen Expressionsunterschieden führen, wurde für jede verwendete PCR die jeweilige Effizienz durch die Erstellung von Standardkurven bestimmt. Die Berechnung der jeweiligen Genexpression erfolgte anschließend unter Verwendung des „effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells“ nach folgender Formel:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Experiment})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Experiment})}}$$

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wurden die sogenannten Ct (oder CP = Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA.

Die Ermittlung der qRT-PCR Effizienzen erfolgte durch die Erstellung von Standardkurven. Wie in Kapitel 2. 5. 1 beschrieben, wurden PCR-Produkte der zu untersuchenden Genabschnitte der genomischen DNA von HT29 Zellen als Standards eingesetzt. Von diesen PCR-Produkten wurden serielle Verdünnungen hergestellt und mit der qRT-PCR quantifiziert. Die sich ergebenden Kurven, sollten steil und sigmoid verlaufen, um optimale, niedrige Ct-Werte zu erhalten. Aus diesem Kurven-

verlauf wurde die Standardkurve erstellt, indem die Ct-Werte in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl gestellt wurden (Abb. 3. 12). Idealerweise verlaufen die Kurven der verschiedenen Verdünnungsstufen dabei in einem gleichmäßigen, parallelen Abstand, so dass die Linearität der Standardkurve gewährleistet ist und die Anforderung $R^2 > 0,980$ erfüllt. Aus der Steigung der Standardkurven berechnete die Software iQ5 V die Effizienz für die qRT-PCR des jeweiligen Gens. Optimalerweise wird dabei eine hohe Amplifikationseffizienz von 90 – 105 % erreicht.

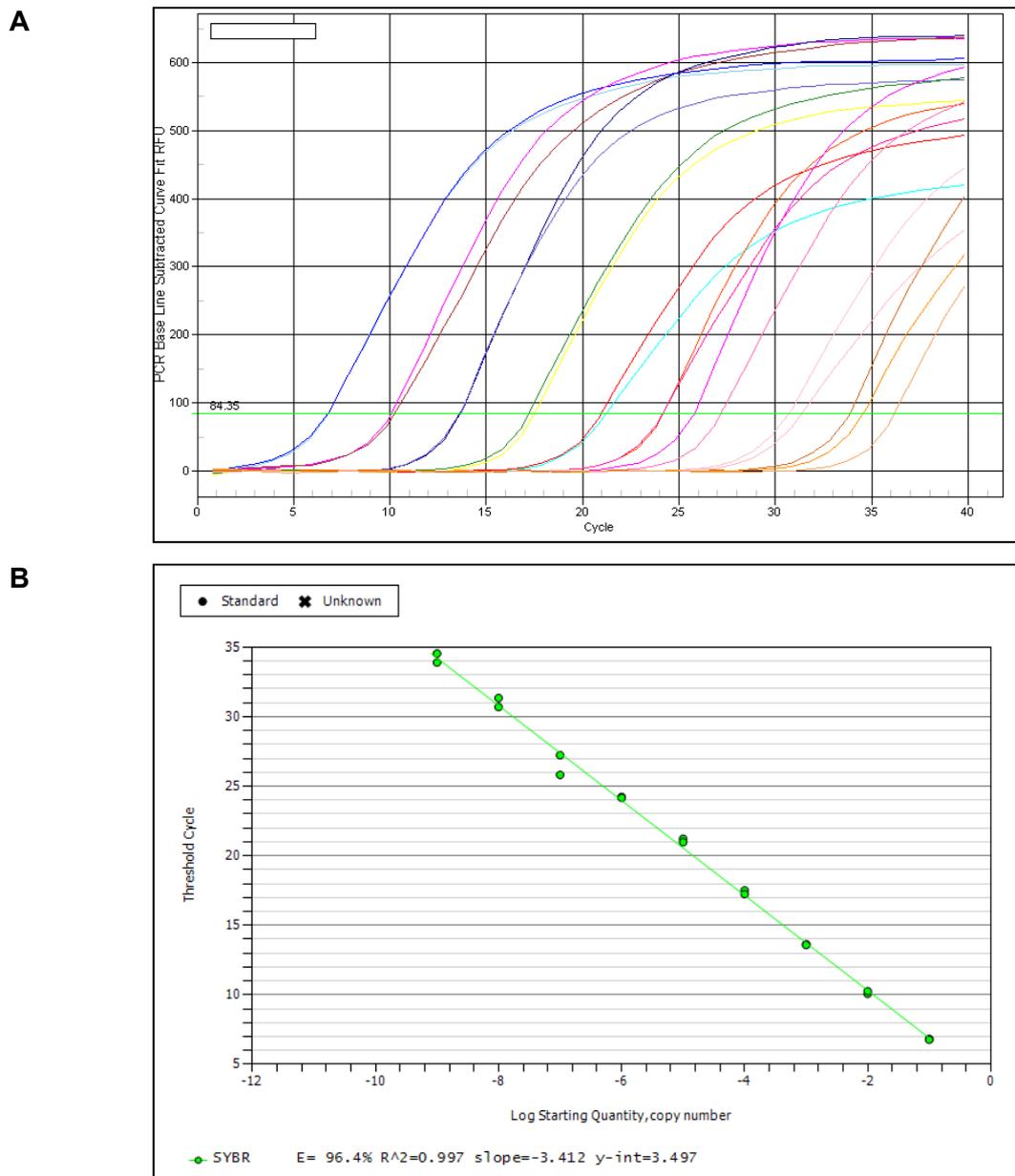


Abb. 3. 12 Erstellung der Standardkurven zur Effizienzberechnung der qRT-PCR. Dargestellt ist beispielhaft (A) die Verdünnungsreihe von β -Aktin mit der Ermittlung der Ct-Werte, sowie (B) die daraus ermittelte Standardkurve. Die berechnete Effizienz betrug 96,4 %, die Linearität der Standardkurve wurde mit $R^2=0,997$ angegeben.

Für jedes Gen wurden je drei Standardkurven angefertigt, aus den berechneten Effizienzen wurde der Mittelwert gezogen und dieser für die weiteren Berechnungen als Effizienz eingesetzt.

Tabelle 3. 3 Berechnete qRT-PCR Effizienzen für die untersuchten Gene

Gen	Effizienz [%]
β-Aktin	94,9
TLR2	97,7
TLR4	95,1
TLR9	97,1

Die aus einem Versuchsansatz gewonnenen Proben (Negativkontrollen, Monoinfektion der HT29-Zellen mit EDL933 und Co-Infektionen mit EDL933 und Milchsäurebakterien) wurden in einen Lauf der qRT-PCR eingesetzt, dabei wurde jede Probe dreifach vermessen. Um eine relative Quantifizierung der Proben zu erreichen, wurde zunächst von allen untersuchten Proben die Expression des Referenzgens bestimmt. Als Referenzgen wurde das nicht-regulierte Haushaltsgen β-Aktin gewählt. Anschließend wurde die Expressionen der TLR-Gene auf das Referenzgen normalisiert, wobei die unterschiedlichen qRT-PCR Effizienzen berücksichtigt wurden.

Die Messung der Genexpression des TLR2 von HT29-Zellen nach Infektion mit EDL933 oder nach Stimulation mit Milchsäurebakterien zeigte eine Tendenz zu einer verringerten Genexpression, wobei jedoch - unter Berücksichtigung der Standardabweichung – weder EDL933 noch die Milchsäurebakterien-Stämme eine signifikante Regulierung < 0,5-fach auslösten (Abb. 3. 13 A, Tab. 6. 10). Bei Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und Milchsäurebakterien konnte ebenfalls keine signifikante Regulation des TLR2 beobachtet werden, die Werte der Expression entsprachen denen der Mono-Infektion.

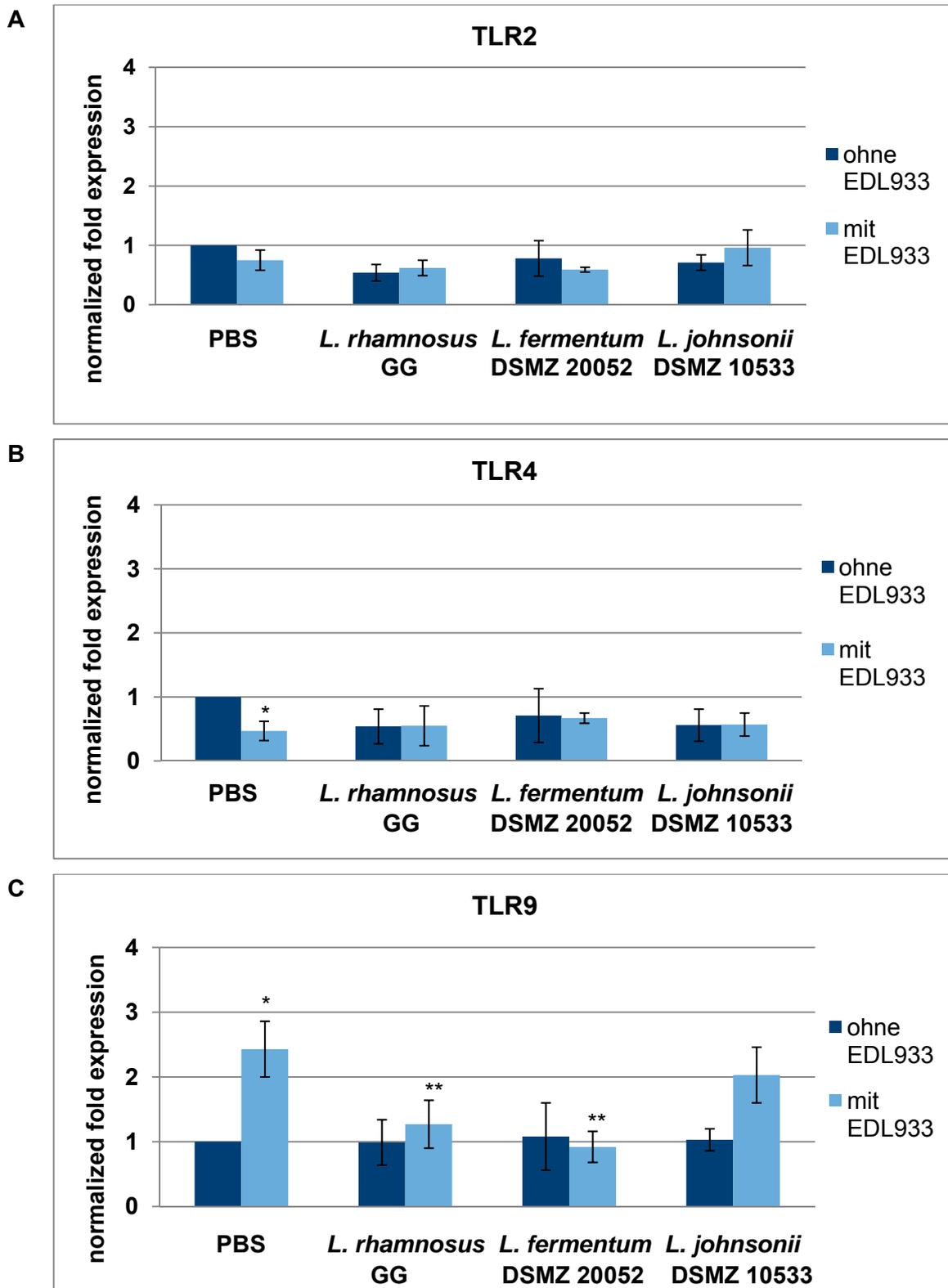


Abbildung 3. 13 Expression der Gene TLR2, -4 und -9 von HT29-Zellen 6 h nach Infektion/ Co-Infektion mit EDL933 (MOI 2) und/oder Milchsäurebakterien (MOI 200). Die relative Genexpression wurde auf das Haushaltsgen β -Aktin bezogen und die Effizienz berücksichtigt. Negativkontrolle: PBS. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

* = $p < 0,05$ Vergleich der Mono-Infektionen zu nicht-infizierte Zellen.

** = $p < 0,05$ Vergleich der EDL933-Mono-Infektion mit den jeweiligen Co-Infektionen.

Die Genexpression von TLR4 hingegen, wird durch die Infektion mit EDL933 statistisch signifikant (siehe Tab. 6. 11) herunter reguliert (0,47-fach; Abb. 3. 13 B). Ebenfalls zeigten die Zell-Stimulationen mit *L. rhamnosus* GG und *L. johnsonii* DSMZ 10533 eine Tendenz zu einer niedrigeren Genexpression an. Die Expressionen von TLR4 nach Zellstimulation mit *L. fermentum* DSMZ 20052 entsprach jedoch der PBS-Kontrolle und somit keiner Regulation. In Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und den verschiedenen Milchsäurebakterien wurden im Vergleich zu den Mono-Infektionen ähnliche Genexpressionen gemessen, es konnte keine weitere Regulation festgestellt werden (Abb. 3. 13 B).

Die Genexpression des TLR9 der HT29-Zellen wurde durch die Infektion mit EDL933 um den Faktor 2,4 statistisch signifikant (siehe Tab. 6. 11) hinauf reguliert (Abb. 3. 13 C). Bei der Stimulation der Zellen mit Milchsäurebakterien-Stämmen zeigte keiner der untersuchten Stämme eine Tendenz zur Genregulierung des TLR9. In Co-Infektionsversuchen mit Milchsäurebakterien und EDL933 zeigten sich insgesamt niedrigere Genexpressionen im Vergleich zur Monoinfektion der HT29-Zellen mit EDL933. In den Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und *L. rhamnosus* GG oder *L. fermentum* DSMZ 20052 wurden signifikante Absenkungen der Expression im Vergleich zur Monoinfektion mit EDL933 beobachtet, die Expressionsraten (1,27-fach bzw. 0,92-fach) lagen im Bereich der Negativkontrolle PBS. In Co-Infektion mit EDL933 und *L. johnsonii* DSMZ 10533 hingegen, konnte keine signifikante Reduktion der TLR9-Expression gemessen werden (2-fache Expressionsrate).

4. Diskussion

IL-8 Modulation von infizierten HT29 Zellen

Eine Vielzahl von probiotischen Mechanismen, welche positive Effekte auf den Wirt ausüben, sind beschrieben worden, die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher jedoch nur unzureichend aufgeklärt (Lebeer et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen von potentiellen probiotischen Bakterienstämmen der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Staphylococcus* mit pathogenen, enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)-Stämmen im Zellkulturmodell untersucht. Dabei wurde zunächst der immunmodulatorische Einfluss der potentiellen probiotischen Bakterienstämmen auf EHEC-infizierte Darmepithelzellen (HT29) betrachtet und als Marker für die Infektionsstärke die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL) -8 quantifiziert. Epithelzellen sekretieren nach der Infektion mit enteropathogenen Keimen eine Reihe proinflammatorischer Zytokine, darunter auch IL-8 (Eckmann et al., 1993; Jung et al., 1995). IL-8 ist ein zur Familie der CXC-Chemokine gehörendes Interleukin; seine wichtigste Funktion ist das chemotaktische Anlocken von Lymphozyten sowie neutrophilen und basophilen Granulozyten (Mukaida et al., 1994), sowie der Einfluss auf die Angiogenese. Induziert werden kann es zudem durch verschiedene inflammatorische Stimuli wie IL-1 oder TNF in Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten oder Gewebszellen (Baggiolini et al., 1994).

Insgesamt wurden fünf verschiedene EHEC-Stämme mit verschiedenen Charakteristika betreffend ihrer Herkunft, Erkrankung, Serotyp (O157, O26, O103) und Virulenzprofil ausgewählt (Tab. 2. 2). Es ist bekannt, dass verschiedene Faktoren der EHEC-Stämme wie beispielsweise die Bildung von Shiga Toxinen (Thorpe et al., 1999), Lipopolysacchariden (Guessous et al., 2005) und Flagellin H7 (Berin et al., 2002) die IL-8 Produktion von kultivierten Zellen stimulieren. Interessanterweise konnten trotz der unterschiedlichen Virulenzprofile der eingesetzten EHEC-Stämme nur geringe Unterschiede in der IL-8 Sekretion der mit EHEC infizierten HT29-Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 3. 1). Gobert et al. (2008) hingegen zeigten, dass der Anstieg von IL-8 in T84-Zellen, welche mit EHEC-Stämmen der Serotypen O157:H7, O91:H21/H10, O113:H21 und O6:H10 infiziert wurden, auf den Typ des Flagellenantigens und die Anwesenheit von bestimmten Typ III Effektorproteinen zurückgeführt werden konnte. Sie beobachteten signifikante Unterschiede in den IL-8

Antworten zwischen den verschiedenen Stämmen, wobei die Datenerhebung jedoch mit anderen Methoden erfolgte.

Insgesamt wurden 19 verschiedene potentielle probiotische Stämme auf die Fähigkeit hin untersucht, die IL-8 Antwort von EDL933-infizierten HT29-Zellen zu modulieren. Sieben der untersuchten Stämme erzielten eine IL-8 Reduktion über 30 %, wobei drei Stämme sogar eine IL-8 Reduktion bis zu 60 % erzielten (siehe Tab. 3. 1) Bei der Betrachtung der anti-proinflammatorischen Effekte auf Stamm-Ebene zeigten sich deutlich unterschiedliche IL-8 Modulationen bei zwei Stämmen derselben Spezies, beispielsweise bei den Stämmen *L. johnsonii* DSMZ 10533 und *L. johnsonii* BFE 663 oder auch bei den Stämmen *B. adolescentis* DSMZ 20086 und *B. adolescentis* DSMZ 20083. Frick *et al.* (2007a) zeigten in Experimenten mit dem Stamm *B. adolescentis* DSMZ 20086 ebenfalls eine Reduzierung der IL-8 Sekretion von HT29 Zellen, wobei diese mit *Y. enterocolitica* infiziert wurden. Somit konnte der untersuchte Stamm gegen beide Pathogene einen protektiven anti-inflammatorischen Effekt zeigen, da die IL-8 Modulation bei den EHEC-infizierten Zellen jedoch stärker ausgeprägt war, ist von einer Pathogen-Stamm-Spezifität auszugehen.

In weiteren Co-Infektionsversuchen mit den weiteren vier EHEC-Stämmen und den apathogenen Teststämmen zeigten sich erhebliche Unterschiede in den IL-8 Modulationen, die verschiedenen Teststämmen konnten die untersuchten EHEC-Stämme nicht in der gleichen Weise beeinflussen (siehe Kapitel 3. 1. 2). Interessanterweise wurden die stärksten Absenkungen der IL-8 Sekretion in Co-Infektionsversuchen mit dem EHEC-Stamm EDL933 gezeigt werden (bis zu 60 %). Die niedrigste Modulation der IL-8 Antwort wurde in Co-Infektions-Experimenten mit dem EHEC-Stamm 5791/99 und dem Lebensmittelisolat TS18/08 gemessen. Derzeit ist keine Literatur über diese Stammkombination verfügbar.

In Co-Infektionsversuchen mit dem Stamm 5791/99, konnte *S. pasteurii* LTH 5211 als einziger Teststamm die IL-8 Antwort der infizierten Zellen über 30 % abzusenken, dabei wurde sogar eine Absenkung von 63 % erzielt. In Co-Infektionsversuchen mit EDL933, PMK5 und 2331/01 konnte *S. pasteurii* LTH 5211 ebenfalls eindeutig die IL-8 Antwort der HT29-Zellen reduzieren. Bisher wurden keinerlei protektive Effekte für diese Spezies beschrieben. *S. pasteurii* LTH 5211 gehört zu den koagulase-negativen *Staphylococcus*-Stämmen und wurde erstmalig von Chesneau *et al* (1993)

beschrieben. Die Spezies wurde bisher vor allem aus traditionell hergestellter Salami oder nicht-pasteurisierter Milch isoliert, wobei auch humane klinische Isolate bekannt sind (Bjorland et al., 2007; Chesneau et al., 1993; Iacumin et al., 2006). *S. pasteurii*-Stämme wurden positiv auf Hämolyse-Bildung getestet, gelten jedoch anders als Stämme der humanpathogenen Spezies *S. aureus* als Clumping-Faktor-negativ, Fibrinolysin-negativ und Desoxyribonuklease-negativ (Schleifer & Bell; 2009). Das Potential der IL-8 Inhibition von EHEC-infizierten Epithelzellen durch *S. pasteurii* LTH 5211 ist hervorragend, jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig um zu prüfen, ob solch ein Stamm zur probiotischen Anwendung in Tieren oder Menschen eingesetzt werden kann. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob der Stamm LTH 5211 β -Hämolysin bildet, da beispielsweise für das β -Hämolysin von *S. aureus* gezeigt werden konnte, dass dieses die IL-8 Sekretion von HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)-Zellen inhibiert (Tajima et al., 2009). Jedoch beschreiben die Autoren auch, dass das Toxin in den Kulturüberstand abgegeben wird und somit auch der Kulturüberstand einen signifikanten Effekt auf die IL-8 Bildung der Endothelzellen zeigte. In den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie zeigte der Kulturüberstand von *S. pasteurii* LTH 5211 jedoch keinen Einfluss auf die IL-8 Sekretion von HT29-Zellen. Insofern muss geklärt werden, inwieweit die Daten auf Grund der verschiedenen Stämme und der unterschiedlichen Zelllinien vergleichbar sind.

Den besten anti-inflammatorischen Effekt mit einer Reduktion der IL-8 Produktion um 73 % zeigte der Stamm *B. breve* DSMZ 20213 in Co-Infektionsversuchen mit EDL933 (siehe Kapitel 3. 1. 2). Bifidobakterien zeigten in mehreren Experimenten mit Mäusen ebenfalls schützende Effekte. So wurde in *E. coli* O157:H7 infizierten Mäusen durch die orale Fütterung von *B. breve* Stamm Yakult die Pathogenität der EHEC-Infektion, welche mit merklichem Gewichtsverlust und anschließendem Tod einhergeht, deutlich abgeschwächt. Dabei wurde beobachtet, dass der pH-Wert im Darm der Mäuse durch die Bildung von Essigsäure abgesenkt wurde (Asahara et al., 2004). *B. breve* Stamm Yakult schützte Mäuse auch vor der Infektion mit Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen, wobei die Überlebensrate der Mäuse durch die Fütterung mit Galactooligosacchariden noch verstärkt wurde (Lkhagvadorj et al., 2010). In weiteren Mausversuchen mit *E. coli* O157:H7 und Bifidobakterien wurden ebenfalls schützende Effekte gegen die EHEC-Infektion gezeigt, dabei wurde

beobachtet, dass die Anzahl der EHEC-Bakterien im Caecum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zwar nicht verschieden, die gemessene Shiga Toxin Konzentration jedoch deutlich niedriger war.

Einer der am besten untersuchtesten probiotischen Stämme ist *L. rhamnosus* GG, der Stamm weist ein einwandfreies Sicherheitsprüfprotokoll auf (Westerholt et al., 2000) und wird gemeinhin in Molkereiprodukten eingesetzt (Salminen; 1996). In mehreren *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass *L. rhamnosus* GG inhibitorische Effekte auf die Produktion von IL-8 und anderen Chemokinen ausübt (Burkholder & Bhunia; 2009; Toki et al., 2009; Veckman et al., 2003). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur IL-8 Sekretion zeigte *L. rhamnosus* GG ebenfalls sehr gute schützende Effekte gegen die EHEC-Infektionen und bestätigt somit die potentiellen probiotischen Effekte der anderen getesteten, benignen Bakterien, sowie auch das probiotische Potential dieses Stammes.

Für den Stamm *L. fermentum* DSMZ 20052 konnte kein Einfluss auf die IL-8 Sekretion von EHEC-infizierten Zellen gemessen werden, er wurde daher als Negativkontrolle in weiteren Co-Infektionsversuchen eingesetzt. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, zeigte *L. fermentum* DSMZ 20052 in Experimenten mit *Y. enterocolitica*, eine Absenkung der IL-8 Sekretion von HeLa-Zellen um bis zu 70 % (Frick et al., 2007b). In weiteren Untersuchungen führten die Autoren diese Fähigkeit auf die Sekretion eines Phospholipids in der Größe von <10 kDA zurück. Der hier gezeigte protektive anti-inflammatorische Effekt weicht nicht nur bei verschiedenen Stämmen einer Spezies ab, sondern auch für die Spezies selber, je nach untersuchtem Pathogen.

Es wird in der Literatur viel darüber diskutiert, ob probiotische Effekte nur mit lebenden Bakterien erzielt werden können, oder ob auch inaktivierte Bakterien oder sogenannter Kulturüberstand (also ein löslicher Faktor) eine protektive Wirkung auf den Wirt ausübt. In den in dieser Arbeit vorliegenden Experimenten konnte die IL-8 Modulation nur mit lebenden Bakterien erzielt werden, Co-Infektionsversuche mit EDL933 und inaktivierten Bakterien, bzw. mit dem Kulturüberstand der lebenden Bakterien zeigten keinen Einfluss auf die IL-8 Antwort der EDL933 infizierten HT29-Zellen (siehe Kapitel 3. 1. 1). Johnson-Henry et al (2008) konnten ebenfalls protektive Effekte für *L. rhamnosus* GG nur mit lebenden Zellen zeigen, mit Hitze-

inaktivierten *L. rhamnosus* GG Bakterien konnte kein Einfluss auf die Adhäsion von EHEC, auf die Zerstörung der Barrierefunktion und auf A/E-Läsion-Ausbildung festgestellt werden. In einer anderen Studie, konnten ebenfalls nur lebende Bakterien einer *Lactobacillus*-basierten probiotischen Kultur (FM-B11), aber nicht inaktivierte Bakterien oder der Kulturüberstand die Anzahl von *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Bakterien in neugeborenen Hähnchen-Küken reduzieren (Higgins et al., 2008).

Es ist in der Literatur bekannt, dass der Überstand von *Lactobacillus*-Stämmen einen bakteriziden Effekt auf enteroaggregative *E. coli* (Miyazaki et al., 2010) und andere (Lebeer et al., 2008) ausübt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden und unterstreicht somit die Unterschiede der probiotischen Stammspezifität. In anderen Experimenten zeigte jedoch der Kulturüberstand bestimmter Bakterienstämme protektive Effekte. In Experimenten mit dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 und humanen Epithelzellen (HCT15) konnte die TNF- α -induzierte IL-8-Aktivierung sowohl mit lebenden Bakterien, als auch mit deren Kulturüberstand supprimiert werden, weder Hitze-inaktivierte Bakterien noch die genomische DNA von *E. coli* Nissle 1917 zeigten diesen Effekt. Die Autoren vermuten daher, dass der direkte anti-inflammatorische Effekt des Stammes auf einem sekretierten Faktor beruht, welcher dabei einen anderen Mechanismus als die NF- κ B Inhibierung nutzt (Kamada et al., 2008). In anderen Experimenten konnten zwei Proteine aus dem Kulturüberstand von *L. rhamnosus* GG, in der Größe von 75 und 40 kDa, isoliert werden, welche die TNF- α -vermittelte Apoptose durch die Aktivierung des anti-apoptotischen Faktors Akt und der Proteinkinase B von HT29 Epithelzellen inhibierten. Ebenfalls inhibierten diese Proteine den proapoptotischen p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweg und zeigten einen wachstumsfördernden Effekt auf die Epithelzellen (Yan et al., 2007).

Die Virulenz von EHEC wird durch akuten Säurestress beeinflusst. Microarray-Analysen des Transkriptoms von EHEC O157:H7 nach erfolgtem Säurestress, welcher die Magen-Darm-Passage nachahmte, zeigten eine signifikant verstärkte Expression von Virulenzfaktoren, welche mit Adhäsion, Beweglichkeit und dem T3SS in Verbindung gebracht werden. Zudem wurde die Adhäsionsfähigkeiten von EHEC an Epithelzellen, die bakterielle Induktion der Wirts-Zell-Apoptose und die Beweglichkeit durch akuten Säurestress bei pH 3 erhöht (House et al., 2009). Andererseits

konnten Carey et al. (2008) zeigen, dass die probiotische Bildung von organischen Säuren wie Essigsäure, Milchsäure und Salzsäure die *stx_{2a}*-Genexpression von EDL933 herunter reguliert. Da die Sekretion von IL-8 aus intestinalen Epithelzellen u. a. durch Shiga Toxine (Thorpe et al., 1999) stimuliert wird, sollte der Frage nachgegangen werden, welche Säuren in welchem Umfang während des Infektionsversuchs gebildet werden und welchen Einfluss diese auf die IL-8 Sekretion der EHEC-infizierten Zellen ausüben.

Die während den Infektionsversuchen gebildeten Überstände der Zellkulturen wurden mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) auf die Bildung von organischen Säuren hin analysiert. Es ist bekannt, dass HT29-Zellen einen hohen Glucoseverbrauch aufweisen, welcher mit einer hohen Milchsäurebildung einhergeht (Rousset et al., 1984). Dies konnte in den durchgeführten Experimenten bestätigt werden, da nach Abschluss der Infektionsversuche Milchsäure in den Überständen detektiert werden konnte (siehe Kapitel 3. 1. 4). Das Zellkulturmedium DMEM enthält als Hauptkohlenstoffquelle Glucose, diese wird von *L. johnsonii* homofermentativ zu Milchsäure umgesetzt, *L. reuteri*, *L. fermentum* (obligat heterofermentativ) und *L. rhamnosus* GG (fakultativ heterofermentativ) können diese zu Milchsäure; Essigsäure, Ameisensäure und Ethanol vergären (Hammes & Hertel; 2009; Kandler; 1983). Alle untersuchten Milchsäurebakterien bildeten im Mono-Infektionsversuch wie erwartet Milchsäure. Des Weiteren wurde Propionsäure detektiert, da die Werte hierfür jedoch stets geringfügig über der Nachweisgrenze (1 mmol/l) lagen wurden sie im Weiteren vernachlässigt. *S. pasteurii* gilt als fakultativ anaerob und bildet unter anaeroben Bedingungen aus Glucose sowohl L- als auch D-Lactat (Schleifer & Bell; 2009). Im Versuch konnte für *S. pasteurii* LTH 5211 in der Mono-Infektion neben Milchsäure auch Essigsäure detektiert werden.

In den Co-Infektionsversuchen mit den verschiedenen Milchsäurebakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 und EDL933 wurde ähnlich viel Milchsäure im Zellkulturüberstand detektiert, wie in den Zellkulturüberständen, welche nur mit den gutartigen Testbakterien stimuliert wurden (siehe Kapitel 3. 1. 4). Da keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden ist davon auszugehen, dass die Co-Infektion keine Auswirkung auf die Säurebildung von Wirt, Pathogen oder Milchsäurebakterium bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 hat.

E. coli oxidiert Glucose unter aeroben Bedingungen vollständig zu CO₂, unter anaeroben Bedingungen jedoch fehlt der externe Elektronenakzeptor O₂, daher wird

Glucose zu verschiedenen Säuren vergärt (Unden et al., 1994). Diese gemischte Säuregärung konnte unter Zellkulturbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) für EDL933 nachgewiesen werden, es wurden Milch-, Propion-, Ameisen- und Essigsäure detektiert. Diese Säuren konnten auch in den Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und Milchsäurebakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 nachgewiesen werden, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Mono-Infektion mit EDL933 festgestellt werden konnten. Die zusätzliche Anwesenheit der Milchsäurebakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 hatte somit auf die Säurebildungen von EDL933 keinen Einfluss.

Auffällig war, dass in Co-Infektionsversuchen mit *L. rhamnosus* GG bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 und EDL933 die höchsten Mengen an Milchsäure detektiert wurden. Da diese Stämme die IL-8 Sekretion der EDL933-infizierten HT29-Zellen deutlich zu reduzieren vermochten, sollte geklärt werden, ob die verschiedenen IL-8 Modulationen auf die unterschiedlichen Säurebildungen zurückgeführt werden können. Der Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an Milch- bzw. Essigsäure zu den Mono-Infektionen mit EDL933 zeigte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die IL-8 Sekretion der Epithelzellen. Die zuvor in den Co-Infektionsversuchen erzielten IL-8 Reduktionen von bis zu 60 % unter Einfluss von bis zu 6,8 mmol/l Milchsäure konnten durch den Einsatz der organischen Säuren nicht erzielt werden. Auch der Einsatz von bis zu 15 mmol/l Milchsäure führte lediglich zu einer Verringerung der IL-8 Sekretion von 20 %. Somit konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Modulation der IL-8-Levels auf die Säurebildung zurückzuführen ist. Carey et al (2008) beobachteten bei EDL99 eine Herunterregulierung der Genexpression von *stx_{2a}* mit steigender Säurekonzentration, wobei die deutlichste Regulierung unter dem Einfluss von 10 mmol/l Essigsäure erzielt wurde. Gleichzeitig wurde ein vermindertes Bakterienwachstum festgestellt. In weiteren Experimenten mit *E. coli* O157:H7 wurde ebenfalls gezeigt, dass sowohl Essigsäure als auch Milchsäure einen wachstumshemmenden Einfluss ausüben (Over et al., 2009). EHEC-Bakterien, die Essig-, Milch- oder Zitronensäure ausgesetzt waren, bildeten zudem weniger Verotoxin und wiesen eine andere Membranlipid-Zusammensetzung auf, als Bakterien die keinen Säuren ausgesetzt waren (Yuk & Marshall; 2005). Die Vergleichbarkeit dieser Studien mit den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen ist jedoch schwierig, da die beschriebenen Experimente in Flüssigkultur und nicht wie in dieser Arbeit in Zellkulturversuchen durchgeführt wurden. Hierbei ist

auch die Zusammensetzung des Zellkulturmediums zu berücksichtigen, welches vermutlich eine höhere Pufferkapazität aufweist.

In einem Experiment mit Deletionsmutanten des EHEC-Stammes PMK5 sollte überprüft werden, ob durch die Deletion von einem der EHEC-Virulenzgene *eae* (codiert für Intimin), *ehly* (codiert für Enterohämolysin), *stx1* (codiert für Shiga-Toxin 1) oder *tir* (codiert für das Effektorprotein tir) eine modulierte IL-8 Sekretion der infizierten Zellen gemessen werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die mit den verschiedenen Mutanten infizierten HT29-Zellen vergleichbare Mengen an IL-8 bildeten, so dass die Induktion der IL-8 Sekretion nicht auf eines der untersuchten Virulenzgene zurückgeführt werden konnte (siehe Kapitel 3. 1. 5). Stevens et al. (2002) zeigten in Infektionsversuchen mit Kälbern ebenfalls, dass sowohl der Wildtyp PMK5 EHEC-Stamm, sowie auch Mutanten mit Deletionen in den Genen *stx1*, *eae* und *tir* eine Darmentzündung auslösten. In Infektionsversuchen mit isogenen Mutanten eines EHEC O157:H7 Stammes konnten Berin et al. (2002) zeigen, dass, die Infektion von Caco-2 sowie HT29-Zellen sowohl bei den Mutanten (-*eae* oder -*stx*) wie auch beim Wildtyp zur Aktivierung von p38, ERK-MAP-Kinasen und NFκB, sowie zu einem Anstieg der IL-8 Sekretion führte. Das Auslösen einer Darmentzündung sowie die IL-8 Sekretion von Epithelzellen scheinen somit unabhängig von der Fähigkeit der Bakterien zu sein, A/E-Läsionen auszubilden oder Intimin bzw. Shiga Toxin zu tragen.

Über den Einfluss von probiotischen Bakterien auf bestimmte Virulenzfaktoren von EHEC Bakterien ist wenig bekannt. Jelcic et al. (2008) identifizierten in den Kulturüberständen von *L. reuteri* ATCC 55730 das Enzym LuxS, welches zu einer unterdrückten Expression des globalen Regulators *ler* führte. In anderen Experimenten reduzierten Kulturüberstände von *L. acidophilus* La-5 die extrazelluläre Autoinducer-2 Konzentration und die Expression wichtiger Virulenzgene (beispielsweise *tir*, *eaeA*, *hlyB*, *ler* und *espA*) von *E. coli* O157:H7, wohingegen keine signifikante Veränderung der Stx-Bildung beobachtet wurde (Medellin-Pena et al., 2007). Die Ergebnisse der Co-Infektionsversuche mit *S. pasteurii* LTH 5211 und den verschiedenen Mutanten zeigten, dass der protektive anti-inflammatorische Effekt von *S. pasteurii* LTH 5211 auf mit PMK5 infizierte HT29-Zellen nicht auf der Beeinflussung eines der untersuchten Virulenzfaktoren beruht, da zwischen den IL-8 Modulationen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Als ersten Schritt in der Pathogenese der Infektion adhären EHEC an das Darmepithel des Wirtes. Durch die Bildung von Intimin, welches als Adhäsion fungiert, werden A/E-Läsionen ausgebildet, wobei der Bürstensaum des Darmepithels zerstört und die Wirtszelle dahingehend beeinflusst wird, eine aktinreiche, sockelartige Struktur unterhalb der Anlagerungsstelle auszubilden (Croxen & Finlay; 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EHEC O157:H7 adhäsive Typ IV-Pili ausbilden, welche die Anheftung an die Epithelzellen der Darmschleimhaut ermöglichen. Diese als HCP (hämorrhagische Coli-Pili) bezeichneten, haarförmigen Proteinstrukturen liegen gebündelt vor und bilden mit einer Länge $> 10 \mu\text{m}$ eine physikalische Brücke zwischen Bakterium und humaner Wirtszelle (Xicohtencatl-Cortes et al., 2007). Da probiotische Bakterien in Zellkulturmodellen in der Lage sind, an Epithelzellen zu adhären und dadurch die Adhäsion von Pathogenen zu blockieren, wird angenommen, dass dieser Effekt wichtig für die probiotische Wirkung im Wirt ist. Es hat sich gezeigt, dass das Adhäsionsvermögen der verschiedenen probiotischen Stämme äußerst variabel ist (Salminen et al., 2010). Eine hohe Adhäsionsfähigkeit konnte beispielsweise für *L. rhamnosus* GG (Goldin et al., 1992) und *L. acidophilus* LA1 (Bernet et al., 1994) gezeigt werden. Ebenfalls konnte für einige Stämme der Bifidobakterien ein hohes Adhäsionsvermögen nachgewiesen werden, wobei hier signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Zellkulturmodellen zu verzeichnen waren (Preising et al., 2010). Hier stellt sich die Frage, in wieweit die Erkenntnisse aus einem *in vitro*-Modell auf die Situation *in vivo* übertragbar sind, da das Adhäsionsvermögen bereits *in vitro* von wirts- bzw. modellspezifischen Faktoren abhängig ist (Isolauri et al., 2002).

Einige der in dieser Arbeit untersuchten Bakterien-Stämme wurden im Rahmen einer Diplomarbeit auf ihr Adhäsionsvermögen hin untersucht (Maier; 2009). Dabei wurde festgestellt, dass 15 % der eingesetzten EHEC an die Darmepithelzellen adhären können. In den Co-Infektionsversuchen wurden die Milchsäurebakterien und *S. pasteurii* LTH 5211 in viel höherer Zahl eingesetzt (MOI 200), als EDL933 (MOI 2), das Adhäsionsvermögen von EDL933 an die Epithelzellen wurde durch die zusätzliche Anwesenheit dennoch nicht negativ beeinflusst. Die eingesetzten Milchsäurebakterien *L. helveticus* DSMZ 20075, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. johnsonii* DSMZ 10533 und *S. pasteurii* LTH 5211 konnten im Vergleich zur Mono-Infektion keine Absenkung der Adhäsion von EDL933 an die Epithelzellen bewirken. Co-Infektionsversuche mit EDL933 und *L. rhamnosus* GG bzw. *L. fermentum* DSMZ 20052 führten

hingegen zu einer leichten Verbesserung der Adhäsion von EDL933 (28 % bzw. 25 %) an die Epithelzellen, möglicherweise werden von diesen Stämmen Stoffwechselprodukte oder andere Faktoren gebildet, welche die Adhäsion von EDL933 erhöhen. Einige Studien zeigen ebenfalls keine Veränderung in der Adhäsionsfähigkeit von *E. coli* O157:H7 in Co-Infektionsversuchen mit Milchsäurebakterien an humane Epithelzellen. So zeigten *L. rhamnosus* GG, *L. gasseri* DSM 20243, *L. casei* ATCC 393 und *L. plantarum* ATCC 14917 in Co-Infektionsversuchen mit *E. coli* O157:H7 Stamm RIND 0509890 ebenfalls keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten des EHEC-Stammes an polarisierte Caco-2-Zellen (Hirano et al., 2003). In einer Studie von Kim et al (2008b) wurde deutlich, dass bei der Durchführung von Co-Infektionsversuchen und der anschließenden Betrachtung des Adhäsionsvermögens des Pathogens vor allem die Anzahl der eingesetzten Bakterien eine Rolle spielt. Bei dem Einsatz von *L. rhamnosus* GG und verschiedenen Stämmen von *L. acidophilus* sowie den *E. coli* O157:H7 Stämmen 43889 und 43894 im Verhältnis 100:1, konnte keine veränderte Adhäsion der Pathogene an HT29-Zellen beobachtet werden. Wurde das Verhältnis jedoch auf 1000:1 erhöht, war eine verminderte Adhäsion der untersuchten EHEC-Stämme zu verzeichnen. Diese Studie bestätigt somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei welcher ein Verhältnis von potentiellen probiotischen Bakterien zu EDL933 von 100:1 eingesetzt wurde. In einer weiteren Studien konnte ebenfalls eine dosis-abhängige Inhibition der Adhäsion von EHEC O157:H7 an Hep-2 und T84-Zellen durch Milchsäurebakterien gezeigt werden (Sherman et al., 2005). Auch scheint bei der Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit ein pathogen-spezifischer Effekt vorzuliegen. So konnten verschiedene pathogene gastrointestinale Bakterien durch die Anwesenheit von Milchsäurebakterien in einem Caco-2-Zellkulturmodell von der Zelloberfläche ausgeschlossen und ersetzt werden, dabei war der Grad der Adhäsions-Inhibition pathogen-bedingt (Lee et al., 2003).

Von den untersuchten Milchsäurebakterien zeigte der Stamm *L. reuteri* ATCC 55730 die höchste Adhäsionsfähigkeit an HT29-Zellen in Co-Infektion mit EDL933. Möglicherweise ist dieses hohe Adhäsionsvermögen auf verschiedene Zell-Oberflächenproteine zurückzuführen, wie beispielsweise MapA (mucus adhesion promoting protein), welches bei der Adhäsion von *L. reuteri* 104R an Caco-2-Zellen identifiziert wurde (Miyoshi et al., 2006) oder Lsp, welches sich als erforderlich für die Adhäsion von *L. reuteri* Stamm 100-23 an Epithelzellen von Mäusen gezeigt hat

(Walter et al., 2005). Für den Stamm *L. reuteri* ATCC 55730 konnte zudem in einer klinischen Studie die signifikante Kolonisation des Magens, Duodenums und Ileums von gesunden Menschen nachgewiesen werden, welche täglich 4×10^8 KBE lebende Bakterien zu sich genommen hatten (Valeur et al., 2004). In den Co-Infektionsversuchen zur IL-8-Stimulation erzielte *L. reuteri* ATCC 55730 eine Absenkung der EDL933-induzierten IL-8 Sekretion von 42,8 %. Da die Adhäsion von EDL933 an HT29-Zellen jedoch nicht beeinflusst wurde (17,5 % in Co-Infektion) ist kein Zusammenhang zwischen dem anti-inflammatorischen Effekt und der Adhäsion von *L. reuteri* ATCC 55730 anzunehmen. Ebenfalls wurde die Adhäsion von EDL933 an HT29-Zellen auch nicht durch die anderen apathogenen Teststämme abgesenkt, somit konnte die beobachtete reduzierte IL-8 Sekretion der HT29-Zellen nach erfolgter Co-Infektion nicht auf eine Inhibition der EHEC-Adhäsion an die Epithelzellen zurückgeführt werden.

Aktivierung von NF- κ B

Die inflammatorische Wirtsantwort auf pathogene Bakterien und weitere Stresssignale ist unter anderem zentral über den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert. Für eine schnelle Immunantwort ist vor allem die Expression von proinflammatorischen Genen wie Chemokinen oder Adhäsionsmolekülen wichtig, in deren Enhancer- bzw. Promotorregion die NF- κ B-Sequenz enthalten ist. Des Weiteren werden Gene für Zellproliferation, Adhäsion, Wachstum und Apoptose über NF- κ B gesteuert (Jobin & Sartor; 2000). Innerhalb der IL-8-Promotorsequenz befinden sich DNA-Bindungsstellen für die induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-IL6 und NF- κ B. Diese binden den IL-8 Promotor als Dimer und können darüber hinaus zusammenarbeiten und den IL-8 Promotor synergistisch aktivieren (Roebuck; 1999). Dahan et al. (2002) konnten in einem Modell mit T84-Zellen zeigen, dass die Infektion mit dem EHEC-Stamm EDL931 zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1, unter Beteiligung der drei MAPK-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK führt und die IL-8 Sekretion ausgelöst wird. Darüber hinaus ist bekannt, dass EHEC-Bakterien verschiedene Effektorproteine wie beispielsweise EspB und NleH1 in die Wirtszelle injizieren, um die Aktivierung von NF- κ B zu unterdrücken (Gao et al., 2009; Hauf & Chakraborty; 2003). In den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die fünf untersuchten EHEC-Stämme alle NF- κ B aktivieren, dabei

konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen EHEC-Stämmen beobachtet werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle TNF- α wurde jedoch durch die Infektion mit den pathogenen EHEC-Stämmen deutlich weniger NF- κ B aktiviert (siehe Kapitel 3. 2).

Die meisten kommensalen Bakterien aktivieren NF- κ B nicht. Es wurde beschrieben, dass viele von ihnen sogar inflammatorische Signale als Antwort auf eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* und sein Flagellin verhindern können, wobei NF- κ B eine Rolle zu spielen scheint (O'Hara et al., 2006). Bei Milchsäurebakterien ist bekannt, dass der NF- κ B Signalweg inhibiert wird, indem sowohl die Ubiquitinierung als auch die Proteasom-Degradierung von I- κ B verhindert wird und dadurch der Transport des Transkriptionsfaktors in den Zellkern nicht stattfinden kann (Petrof et al., 2004). Dies konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen beobachtet werden, da die Stimulation der Epithelzellen mit Milchsäurebakterien, Bifidobakterien und *S. pasteurii* LTH 5211 nicht zur Aktivierung von NF- κ B führten, statt dessen wurden Aktivitäten unterhalb der NF- κ B-Grundaktivität von nicht-infizierten (Negativkontrolle PBS) HT29-Zellen gemessen (siehe Kapitel 3. 2).

Zurzeit sind keine Daten über die Aktivierung von NF- κ B in Co-Infektionsversuchen mit EHEC und Milchsäurebakterien, Bifidobakterien oder *S. pasteurii*-Stämmen verfügbar. In Co-Infektionsversuchen mit *Y. enterocolitica* und *V. cholerae* in verschiedenen Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Milchsäurebakterien- und Bifidobakterienstämme die NF- κ B-Aktivierung inhibieren können (Frick et al., 2007a; Nandakumar et al., 2009). In den in dieser Arbeit durchgeführten Co-Infektionsversuchen wurde die NF- κ B-Aktivierung von allen getesteten nicht-pathogenen Stämmen inhibiert unabhängig davon, welcher EHEC-Stamm in der Co-Infektion eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der IL-8-Messungen konnte weder ein stammspezifischer noch ein pathogen-spezifischer Effekt festgestellt werden. Der Stamm *L. helveticus* DSMZ 20075 reduzierte die EHEC-induzierte NF- κ B Aktivierung von transfizierten HT29-Zellen am stärksten, wohingegen dieser Stamm nur einen sehr geringen Effekt auf die IL-8 Sekretion der HT29-Zellen zeigte. Der Stamm *L. fermentum* DSMZ 20052 hingegen zeigte sowohl in den Untersuchungen zur NF- κ B Aktivierung wie auch in den IL-8 Messungen insgesamt den geringsten Einfluss. Da zwischen den Ergebnissen kein Zusammenhang beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, dass der beobachtete anti-

inflammatorische Effekt der IL-8 Reduktionen auf einem anderen Signaltransduktionsweg beruht. Denkbar ist hier beispielsweise AP-1. Für EPEC konnte gezeigt werden, dass durch die Effektoproteine NleE und NleB die Aktivierung von NF- κ B in HeLa- und Caco-2-Zellen unterdrückt wird, jedoch inhibierten weder NleE noch NleB die AP-1 Aktivierung (Newton et al., 2010). Daten über die Beeinflussung der Pathogen-induzierten AP-1-Aktivierung durch Milchsäure- bzw. Bifidobakterien sind zurzeit jedoch nicht verfügbar.

Genexpression von TLRs

Der Darm ist zum einen der Lebensraum einer Vielzahl von verschiedenen kommensalen Mikroorganismen, zum anderen der Ort wo lebensmittelassoziierte, pathogene Bakterien die Pathogenese starten. Die Darmepithelzellen, welche den ersten Kontakt zu den unterschiedlichsten Bakterien haben, stellen die Verbindung zum Immunsystem her, welches je nach erkanntem Bakterium eine Reaktion auslöst. Auf der Zelloberfläche von Darmepithelzellen erfolgt die Erkennung von Mikroorganismen über verschiedene Rezeptoren, wobei die TLRs die zurzeit am besten untersuchtesten Rezeptoren sind. Gram-positive Bakterien werden von TLR2 (Lipoprotein, Peptidoglykan, Lipoteichonsäuren) und TLR9 (unmethylierte CpG-DNA) erkannt, Gram-negative Bakterien von TLR2, -4 (LPS), -5 (Flagellin) und -9 (Kumar et al., 2009). Nach Aktivierung von TLR auf der Zelloberfläche findet eine kaskadenartige Aktivierung verschiedener Moleküle statt, was wiederum die Aktivierung von Downstream-Mediatoren wie NF- κ B und MAP-Kinasen und damit eine Entzündungsreaktion bewirkt (Mogensen; 2009). Nicht alle TLRs werden von allen Zelltypen gleichermaßen exprimiert, so zeigt der gesunde Kolon hohe Expressionsraten der mRNA für die TLRs 3, -4, -5, und -7, wohingegen beispielsweise in der Milz vor allem TLR3 vertreten ist (Zarembek & Godowski; 2002). Diese Expressionslevels scheinen sich bei Erkrankungen innerhalb der Darmmukosa zu verändern, da es Berichte über den Anstieg von TLR2 und TLR4 während Darmentzündungen gibt (Hausmann et al., 2002).

Cario et al (2000) zeigten in einer Studie zur Expression von TLR2, -3 und -4, dass die mRNA von allen drei Rezeptoren in T84 und HT29-Zellen exprimiert wird. Das Protein von TLR4 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch nicht die Proteinexpression von TLR2 in HT29 Zellen (Cario et al., 2000). Ebenfalls wurde für die

Zelllinie HT29 gezeigt, dass verschiedene Bakterien die Genexpression von TLR2 und -4 modulieren (Furrie et al., 2005). In einer anderen Studie mit HT-29 Zellen konnte zwar durch den Einsatz verschiedener Liganden eine Modulation der Genexpression des TLR4 gemessen werden, der TLR2 zeigte jedoch keine veränderte Genexpression (Bruno et al., 2010). In den in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturversuchen mit HT29 Zellen konnte die Genexpression von TLR2, -4 und -9 gezeigt werden. Die Stimulation der HT29 Zellen mit *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* DSMZ 10533 oder *L. fermentum* DSMZ 20052 verursachte bei keinem der untersuchten TLRs eine signifikante Modulation der Genexpression. Die Erkennung von Grampositiven Bakterien durch TLR2 und -9 löst die Expression pro-inflammatorischer Gene aus, ein Prozess, der für das Darm-Immunsystem des Wirtes jedoch nur im Fall von nicht-kommensalen Mikroorganismen erstrebenswert ist, da sich der Organismus sonst durch eine überflüssige, chronische Entzündungsreaktion selbst schädigen würde (Atkins & Furuta; 2010). Melmed et al. (2003) beschreiben eine wesentlich geringere TLR2 Expression der Darmepithelzelllinien Caco-2, T84 und HT29 im Vergleich zu THP-1 Monocyten, wobei sich der TLR2 zudem unempfindlich für Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren zeigte. Stattdessen exprimierten die Darmepithelzellen im Vergleich zu den Monocyten große Mengen des inhibitorischen Adapterprotein Tollip (Toll interacting protein), welches wahrscheinlich dazu beiträgt, dass eine chronische proinflammatorische Zytokinsekretion im Darm verhindert wird. In einer anderen Studie führte die Stimulation von HT29-Zellen mit TLR2 Liganden zur Aktivierung von Proteinkinase C, was zu einer Verstärkung des transepithelialen Widerstandes führte, da sowohl eine apikaler Straffung wie auch eine Verstärkung der intestinalen Epithelialen-Integrität durch Translokation der ZO-1 Aktivierung beobachtet werden konnte (Cario et al., 2004). Ein weiterer schützender Effekt konnte im Mausmodell durch die TLR2-vermittelte MyD88-Stimulation durch kommensale Mikroorganismen beobachtet werden. Diese führte zu einer Stärkung der Darmschleimhaut, indem ein Schutz gegen die Induktion von Hitzeschockproteinen, sowie der Heilungs- und Wiederherstellungsprozess des Darms gefördert wurde (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Infektion der HT29 Zellen mit EDL933 keine veränderte Genexpression des TLR2 beobachtet, jedoch zeigte sich bei TLR4 eine signifikante herunter Regulierung (0,5-fach), sowie bei TLR9 einer signifikanten

herauf Regulierung der Genexpression (siehe Kapitel 3. 3. 3). In Studien mit HT29 Zellen wurde gezeigt, dass sowohl LPS, Peptidoglykan, nichtmethylierte repetitive Cytosin-Guanin-Einheiten (CpG) sowie Flagellin sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression von TLR4 herunter regulieren. Die Genexpression des TLR9 hingegen, wird durch LPS und Flagellin herauf reguliert, durch Peptidoglykan und CpG jedoch herunter reguliert (Palazzo et al., 2008). Furrie et al. (2005) konnten ebenfalls zeigen, dass die Infektion von HT29 Zellen mit *E. coli* zu einer signifikanten Reduktion des mRNA-Levels von TLR4 führte. Die herunter Regulierung von TLR4 scheint jedoch nicht im Zusammenhang mit der IL-8 Sekretion zu stehen. Nandakumar et al. (2009) konnten in einem HT29-Zellkulturmodell mittels TLR4-Silencing zeigen, dass die verstärkte Genexpression von Neutrophilen-anlockenden CXCL-Chemokinen (wie beispielsweise IL-8) durch die Infektion von *V. cholerae* 0139 nicht durch TLR4 beeinflusst wird. HT29 Zellen, welche mit der DNA von pathogenen *E. coli*-Stämmen und *S. enterica* Serovar Dublin stimuliert wurden zeigten ebenfalls eine erhöhte TLR9-Genexpression (Ewaschuk et al., 2007). In einer weiteren Studie führte die Stimulation von HT29 Zellen mit aufgereinigter *E. coli*-DNA zur Phosphorylierung von ERK 1/2 MAPK sowie zu einer erhöhten IL-8 Sekretion. Die Autoren konnten zeigen, dass die DNA von *E. coli* die Aktivierung des epithelialen AP-1, jedoch nicht die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B stimuliert und vermuten, dass HT29-Zellen über Stimulierung des TLR9 die IL-8 Produktion aktivieren (Akhtar et al., 2003).

Bei Betrachtung der Genexpression von TLR9 zeigte sich in den hier durchgeführten Versuchen, dass durch die Co-Infektion mit *L. rhamnosus* GG die durch EDL933 ausgelöste TLR9-Expression signifikant abgesenkt wurde (siehe Kapitel 3. 3. 3). In Infektionsversuchen von HT29 Zellen mit *S. enterica* Serovar Typhimurium konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Genexpression von TLR9 durch die Co-Infektion der Zellen mit *L. rhamnosus* GG signifikant reduziert wurde (Vizoso Pinto et al., 2009). Auch Ghadimi et al. (2010) beschreiben, dass der TLR9-Signalweg einen Teil des anti-inflammatorischen Effekts von *L. rhamnosus* GG im Darm vermittelt. Sie konnten in Experimenten mit TNF- α stimulierten HT29 Zellen mittels TLR9-Silencing zeigen, dass die zuvor von *L. rhamnosus* GG-DNA ausgelöste Inhibierung der NF- κ B Aktivierung und die verminderte IL-8 Sekretion durch das Ausschalten von TLR9 aufgehoben wurden.

In Co-Infektionsversuchen mit EDL933 und *L. fermentum* DSMZ 20052 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Genexpression von TLR9 im Vergleich zur alleinigen EHEC-Infektion signifikant abgesenkt wurde, die Expressionsrate entsprach der Negativkontrolle PBS. Die Co-Infektion mit *L. johnsonii* DSMZ 10533 führte ebenfalls zu einer niedrigeren Expression von TLR9, wobei diese jedoch nicht signifikant war. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der IL-8 Messung so fällt auf, dass für *L. fermentum* DSMZ 20052 kein anti-inflammatorischer Effekt, für *L. johnsonii* DSMZ 10533 jedoch sehr wohl ein Effekt gemessen werden konnte. Diese Beobachtung widerspricht den Studien von Akhtar et al. (2003) und Ghadimi et al. (2010), nach deren Schlussfolgerung die IL-8 Sekretion über TLR9 gesteuert wird. Demnach müsste die Beeinflussung der Genregulation durch *L. fermentum* DSMZ 20052 auch die IL-8 Sekretion beeinflussen. Da dies nicht zutrifft, müssen bei der Aktivierung der IL-8 Sekretion weitere Faktoren zu Grunde liegen. Hierzu ist zurzeit jedoch keine Literatur vorhanden.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass die Untersuchung von IL-8 und NF- κ B nützliche Methoden darstellen, um ein erstes Screening für protektive Bakterien durchzuführen. Die anti-inflammatorische Wirkung auf die EHEC-Infektion von infizierten Darmepithelzellen stellt einen guten Anhaltspunkt für schützende Wirtseffekte dar, da auch der als probiotisch anerkannte Stamm *L. rhamnosus* GG eindeutig reagierte. Jedoch konnte der schützende Effekt der untersuchten benignen Bakterien nicht auf einen Schutz der epithelialen Barriere durch verminderte Adhäsionsfähigkeit des Pathogens oder auf eine Bakterien-Bakterien-Interaktion (Säurebildung, Beeinflussung von Virulenzgenen) zurückgeführt werden. Die Betrachtung der Genexpression von TLRs zeigte ebenfalls protektive Effekte, ließ aber keinen Rückschluss auf die anti-inflammatorische Wirkung der untersuchten Milchsäurebakterien-Stämme zu. Da die molekularen Ursprünge des sogenannten probiotischen Effekts bisher kaum bekannt sind, ist weitere molekulare Grundlagenforschung notwendig. Durch die Untersuchung weiterer Parameter wie beispielsweise der Aktivierung von Interferonen, MAP-Kinasen oder des AP-1 könnten weitere Anhaltspunkte für den protektiven Effekt im Signaltransduktionsweg gewonnen werden. Des Weiteren könnten durch eine Transkriptomanalyse von HT29-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen benignen und pathogenen Bakterien Hinweise auf Genmodulationen und somit auf schützende Eigenschaften der benignen

Bakterien erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Zellysate von protektiven Bakterien zwar keinen schützenden Effekt auf die Darmepithelzellen, jedoch wäre es interessant mit molekulargenetischen Methoden den Einfluss von Oberflächenstrukturen der Milchsäurebakterien zu untersuchen. Durch die Prüfung des Einflusses von beispielsweise S-Layer Proteinen oder Teichonsäuren auf die Wirtszelle könnte ein besseres Verständnis für die Interaktion von Wirt, Pathogen und Probiotikum erlangt werden.

5. Zusammenfassung

Es wurden die Wechselwirkungen von potentiellen probiotischen Bakterienstämmen der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Staphylococcus* mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) im Zellkulturmodell (HT29-Zellen) untersucht. Es wurden 19 potentielle probiotische Stämme sowie fünf EHEC-Stämme mit verschiedenen Virulenzprofilen ausgewählt und Infektionsversuche durchgeführt. Keiner der potentiellen probiotischen Stämme zeigte eine Induktion der IL-8 Sekretion der infizierten Zellen, wohingegen alle EHEC-Stämme unabhängig von ihrem Virulenzprofil die Bildung von IL-8 in ähnlicher Menge induzierten. In Co-Infektionsversuchen mit *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und den zu testenden benignen Bakterien wurden hemmende Effekte auf die IL-8 Sekretion der infizierten HT29-Zellen festgestellt. Von 19 untersuchten Stämmen zeigten 12 Stämme eine sehr geringe Absenkung der IL-8 Bildung der infizierten Zellen von < 30 %), sechs Stämme zeigten einen protektiven, anti-inflammatorischen Effekt auf die infizierten Epithelzellen, die IL-8 Produktion wurde um bis zu 60 % abgesenkt. Den stärksten Effekt zeigte *B. breve* DSMZ 20213 mit einer Absenkung der IL-8 Sekretion von 73 %. Bei der Durchführung von Co-Infektionsversuchen mit verschiedenen Stämmen einer Spezies (*B. adolescentis* DSMZ 20083 und DSMZ 20086 sowie *L. johnsonii* BFE 633 und DSMZ 10533) konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem beobachteten anti-inflammatorischen Effekt um einen Stamm-spezifischen Effekt handelt, da jeweils nur bestimmte Stämme einer Spezies diesen Effekt auslösen konnten. In nachfolgenden Co-Infektionsversuchen mit den zu testenden Bakterien und den weiteren vier EHEC-Stämmen unterschiedlicher Serotypen und Virulenzprofile, zeigte sich zudem ein Pathogen-spezifischer Effekt. Der gemessene anti-inflammatorischer Effekt variierte je nach eingesetztem pathogenen EHEC-Stamm.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der beobachtete anti-inflammatorische Effekt nur mit lebenden Bakterien erzielt werden konnte. Weder der Kulturüberstand von lebenden Bakterien noch inaktivierte Bakterien konnten einen Effekt auf die IL-8 Sekretion der mit EDL933 infizierten Zellen hervorrufen.

Mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wurden in den Überständen der Zellkulturen 6 h nach erfolgter Infektion Milchsäure und Essigsäure detektiert. Der Einsatz dieser organischen Säuren in Infektionsversuchen mit EDL933

im Zellkulturmodell zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8 Sekretion der infizierten Zellen. Der protektive anti-inflammatorische Effekt kann somit nicht mit dem Einfluss gebildeter Säuren begründet werden.

Die Induktion der IL-8 Sekretion konnte ebenfalls nicht auf einen einzelnen Virulenzfaktor zurückgeführt werden. In Infektionsversuchen mit vier Deletionsmutanten des Stammes PMK5, bei denen jeweils eines der Virulenzgene ausgeschaltet war, wurden im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp-Stamm ähnliche IL-8 Sekretionen der HT29-Zellen gemessen. In Co-Infektionsversuchen mit *S. pasteurii* LTH 5211 und den vier Deletionsmutanten zeigten sich im Vergleich zu dem Co-Infektionsversuch mit dem Wildtyp Stamm ähnliche IL-8 Reduktionen, so dass davon auszugehen ist, dass *S. pasteurii* LTH 5211 die IL-8 Sekretion der mit PMK5 infizierten HT29-Zellen nicht auf der Beeinflussung eines einzelnen Pathogenitätsfaktors beruht.

Die Untersuchung der Aktivierung des der IL-8 Produktion vorgeschalteten Transkriptionsfaktors "Nuklearer Faktor-kappa B" (NF- κ B) in HT29-Zellen ergab für Co-Infektionsversuche eine deutlich niedrige Aktivität, als die reine EHEC-Infektion. Dies bestätigt die Ergebnisse der IL-8 Messungen, wobei weder eine Stamm- noch eine Pathogenspezifität festgestellt werden konnte. Zellstimulationen mit den potentiellen probiotischen Bakterien alleine führten zu einer Hemmung der NF- κ B-Aktivität, da die gemessenen Werte niedriger als die Negativkontrolle ausfielen.

Eine Genexpressionsanalyse von Toll-like-Rezeptoren, welche Bakterien auf der Zelloberfläche erkennen und die Immunantwort initiieren, zeigte für den TLR2 in dem verwendeten Zellkulturmodell keine Regulation. Die Infektion mit EDL933 reguliert den TLR4 herunter und den TLR9 hinauf. In Co-Infektionsversuchen mit *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* DSMZ 10533 oder *L. fermentum* DSMZ 20052 und EDL933 konnte kein Einfluss auf die von EDL933 ausgelöste Regulierung des TLR4 festgestellt werden. Die durch die EHEC-Infektion ausgelösten Genexpression von TLR9 hingegen wurde durch die Co-Infektion signifikant reduziert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es möglich ist im Zellkulturmodell protektive Effekte von Probiotika auf die Infektion mit EHEC zu messen.

Summary

The interactions of 19 benign strains of lactic acid bacteria, bifidobacteria and staphylococci with five enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of different serotypes and virulence gene spectrum were investigated using a HT29 cell culture infection model. As a parameter for the infection the secretion of Interleukin 8 (IL-8) of the infected cells was analyzed by ELISA. None of the used benign strains induced an IL-8 secretion, whereas the infection with the EHEC strains leads – independent of their virulence profile - to high amounts of IL-8. In coinfection assays with the pathogen EDL933 (O157:H7) and different test strains the secretion of IL-8 of the cultured cells was decreased by a few strains. With 12 of 19 tested strains, a weak reduction < 30 % of IL-8 secretion of HT29 cells after coinfection with EHEC O157:H7 strain EDL933 was observed. Six strains reduced the IL-8 secretion up to 60 % and the strain *B. breve* DSMZ 20083 decreased the IL-8 production about 73 %. Coinfection assays with different strains of one species (*B. adolescentis* DSMZ 20083 and DSMZ 20086 as well as *L. johnsonii* BFE 633 and DSMZ 10533) showed the strain specificity of the observed anti-inflammatory effect, due to different capabilities of IL-8 reduction. In further coinfection assays with different EHEC strains of the serotypes O103:H2, O26:H⁻, O157:H⁻ and O113:H21 different abilities of the benign strains to influence the infection with the different pathogen strains were noted. Therefore the protective anti-inflammatory effect is strain specific for the tested benign bacteria and also depends on the application of EHEC strains with different sero- and virulence types.

Further investigations indicated the imperative of living bacteria for the observed protective effect; neither culture supernatant nor inactivated bacteria showed an effect on the IL-8 secretion of the EDL933 infected HT29 cells.

The analysis of the cell culture supernatants 6 h after infection with different bacteria detected the production of lactic and acetic acid. The application of these acids in infection assays with EDL933 did not lead to an reduced IL-8 secretion of the infected cells. Therefore the production of organic acids did not explain the protective effect.

The induction of IL-8 could not be traced back to the influence of a single virulence factor. Four PMK5 strains with deletions in different virulence genes induced similar IL-8 secretions in comparison to cells infected with the wild-type strain. Coinfection

assays with the mutants and *S. pasteurii* LTH 5211 showed also similar IL-8 reductions than coinfection assays with the wild-type strain. It is to suppose that the anti-inflammatory effects of the benign bacteria do not influence a single virulence factor of the tested EHEC strains.

As a second parameter the activation of the transcription factor 'Nuclear Factor kappa B' (NF- κ B) of coinfecting HT29 cells was monitored using a reporter-gene assay. In comparison to the single EHEC-infection, the NF- κ B activation was reduced by all tested lactic acid bacteria, bifidobacteria and *S. pasteurii* LTH 5211 in coinfection trials significantly. No strain-specificity and no pathogen-specificity could be observed. Interestingly, stimulation of the HT29 cells with benign bacteria led to inhibition of NF- κ B activity, the measured values were less than the values of the negative control PBS.

A gene expression analysis of toll-like receptors (TLRs), recognizing bacteria on cell surfaces and initiating the immune response, showed no regulation for TLR2. Infection with EDL933 led to down regulation of TLR4 and to up regulation of TLR9. Stimulation with *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* DSMZ 10533 or *L. fermentum* DSMZ 20052 led neither to regulation of TLR4 nor TLR9. The benign bacteria did not influence the EHEC-induced TLR4 regulation in coinfection trials; in contrast the regulation of TLR9 was reduced significantly.

The model described here is useful for screening basic effects of protective bacteria that are able to counteract EHEC-mediated effects on human cells and to study the molecular interaction between bacteria as well as between bacteria and human cultured cells.

6. Anhang

Tabelle 6. 1. Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Stimulation von HT29 Zellen mit EHEC-, Milchsäurebakterien- oder, Bifidobakterien-Stämmen, sowie *S. pasteurii* LTH 5211. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

	Stamm	IL-8 Induktion [pg/ml]
Kontrollen	PBS	36,1 ± 11,9
	TNF- α	245,1 ± 31,8
EHEC	EDL933	210,4 ± 19,2
	PMK5	207,3 ± 31,8
	2331/01	224,0 ± 20,0
	5791/99	213,0 ± 26,7
	TS18/08	246,1 ± 31,7
	MBS	* Ergebnisse siehe Tabelle 6. 1. 1

***Tabelle 6. 1. 1** Der Wert MBS (siehe Abb. 3. 1) stellt einen gemittelten Wert der IL-8 Induktion von HT29-Zellen dar, welche mit Milchsäurebakterien- und Bifidobakterien-Stämmen sowie *S. pasteurii* LTH 5211 stimuliert wurden. Dargestellt sind für jeden Stamm die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm	IL-8 Induktion [pg/ml]
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	35,1 ± 6,8
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	33,8 ± 4,5
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	36,8 ± 4,3
<i>L. rhamnosus</i> GG	27,8 ± 11,2
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	34,7 ± 1,1
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	26,7 ± 8,3
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	29 ± 10,4
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	23,8 ± 11,6
<i>B. lactis</i> NCC 362	31,1 ± 13,4
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	36,1 ± 5,7
Mittelwert	31,5 ± 3,9

Tabelle 6. 2 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit EHEC (MOI 2) und/oder Milchsäurebakterien-, Bifidobakterienstämmen bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Die Mono-Infektion mit EHEC beträgt 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm	IL-8 Induktion [%]					
	ohne EHEC	mit EDL933	mit PMK5	mit 2331/01	mit 5791/99	mit TS18/08
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	16,7 ± 0,9	26,8 ± 2,6	55,5 ± 11,1	45,6 ± 13,9	80,4 ± 16,1	81,8 ± 10,8
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	10,7 ± 0,4	42,2 ± 10	60,1 ± 4,9	72,8 ± 7,8	36,6 ± 11,2	81,7 ± 9,4
<i>L. rhamnosus</i> GG	12,9 ± 3,3	43,7 ± 7,4	60,5 ± 17,4	88,3 ± 9,3	75,8 ± 9,1	80,1 ± 8,4
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	15,1 ± 2,9	49,9 ± 7,9	57,7 ± 5,7	43,3 ± 16,8	70,3 ± 3,3	76,9 ± 11,3
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	14,4 ± 1,2	57 ± 8,4	53,7 ± 7,5	79,9 ± 2,9	66,4 ± 10,6	77,4 ± 0,2
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	16 ± 3	57,2 ± 5,1	65 ± 15,5	95,7 ± 10,8	94,4 ± 2,7	89 ± 1,1
<i>B. lactis</i> NCC 362	16,3 ± 1,6	67,1 ± 7,9	73,5 ± 5,2	71,8 ± 9,8	86,8 ± 4,5	76,7 ± 11,2
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	14 ± 3,5	84,5 ± 8,3	77,1 ± 8,1	66,8 ± 15,8	93,6 ± 15,3	74,5 ± 11,6
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	11,8 ± 2	94,8 ± 7,4	100,2 ± 5	80,1 ± 9,2	89,2 ± 5,8	91,5 ± 4,1
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	12,8 ± 0,8	99,5 ± 1,1	109 ± 7,1	107,9 ± 13	94,9 ± 14,9	97,1 ± 0,7

Tabelle 6. 3 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2) und/oder lebenden (PL), abgetöteten (PT) oder dem Kulturüberstand lebender MSB bzw. *S. pasteurii* LTH 5211. Für die Zellstimulationen ohne EDL933 wurde die Stimulation mit TNF- α als absolut = 100 %, für die Co-Infektionen mit EDL933 wurde die Monoinfektion mit EDL933 als absolut = 100 % als Berechnungsgrundlage herangezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm		ohne EDL933 [%]	mit EDL933 [%]
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	PL	18,6 \pm 10,0	43,3 \pm 10,2
	ÜS	24,9 \pm 7,6	103,4 \pm 9,9
	PT	26,2 \pm 11,2	100,6 \pm 13,8
<i>L. rhamnosus</i> GG	PL	15,3 \pm 8,8	46,6 \pm 6,1
	ÜS	14,5 \pm 7,2	91,5 \pm 13,3
	PT	15,6 \pm 5,9	97,5 \pm 2,9
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	PL	12,8 \pm 7,6	58,3 \pm 8,0
	ÜS	13,4 \pm 8,4	98,7 \pm 7,1
	PT	12,3 \pm 7,7	95,1 \pm 6,5

PL = Pellet lebender Bakterien, ÜS = Überstand des Pellets lebender Bakterien; PT = Pellet abgetöteter Bakterien.

Tabelle 6. 4 Konzentrationen [mM] der gebildeten organischen Säuren im Zellkulturüberstand 6 h nach erfolgter Infektion bzw. Co-Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2) und / oder Milchsäurebakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm		Milchsäure	Propion- säure	Ameisen- säure	Essigsäure
Kontrollen	PBS	2,6 ± 0,3			
	EDL933	3 ± 0,8	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1
<i>L. fermentum</i>	in PBS	3,4 ± 0,3	1,2 ± 0,5		
DSMZ 20052	mit EDL933	3,5 ± 0,5	1,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1
<i>L. reuteri</i>	in PBS	4 ± 0,4	1,1 ± 0,04		
ATCC 55730	mit EDL933	3,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2 ± 0,2
<i>L. rhamnosus</i>	in PBS	5,9 ± 0,5	1,4 ± 0,7		
GG	mit EDL933	6,8 ± 0,9	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2
<i>L. johnsonii</i>	in PBS	4,2 ± 0,1	1,6 ± 0,7		
DSMZ 10533	mit EDL933	4,6 ± 0,7	1,6 ± 0,5	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2
<i>S. pasteurii</i>	in PBS	5,6 ± 1,1	1,1 ± 0,4		1,6 ± 0,1
LTH 5211	mit EDL933	6,2 ± 1,1	1,6 ± 0,8	1,4 ± 0,5	2,4 ± 0,3

Tabelle 6. 5 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion von HT29 Zellen mit EDL933 (MOI 2) und 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 15 mmol/l Milchsäure bzw. Essigsäure im Medium. Infektion mit EDL933 = 100 %.

Säure [mmol/l]	IL-8 Induktion [%]	
	Milchsäure	Essigsäure
2	96,6 ± 6,3	105,5 ± 8,7
4	94,5 ± 5,0	102,0 ± 5,9
6	98,5 ± 3,0	96,8 ± 9,4
8	91,8 ± 2,9	100,3 ± 6,9
10	87,4 ± 3,5	91,8 ± 7,4
12	83,9 ± 3,2	95,3 ± 3,2
15	80,8 ± 1,6	104,4 ± 9,3

Tabelle 6. 6 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Infektion/Co-Infektion von HT29 Zellen mit PMK5/Mutanten von PMK5 (MOI 2) und/oder *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. p(PMK5) = auf die Mono-Infektion der HT29 Zellen mit dem Wildtyp-Stamm PMK5 bezogen, $p < 0,05$ gilt als signifikant.

Stamm	<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	IL-8 Induktion [pg/ml]	p(PMK5)	
Kontrollen	PBS	-	34,9 ± 5,9	
		+	28,1 ± 7,3	
	PMK5	-	153,0 ± 12,2	
		+	95,5 ± 13,4	
Deletions- mutanten	PMK5 Δtir	-	160,0 ± 14,4	0,295
		+	94,3 ± 10,7	
	PMK5 Δeae	-	157,4 ± 7,0	0,275
		+	92,3 ± 11,3	
	PMK5 $\Delta ehly$	-	181,1 ± 23,3	0,113
		+	126,1 ± 6,4	
	PMK5 $\Delta stx1$	-	176,9 ± 20,3	0,306
		+	133,0 ± 20,7	

+ = vorhanden; - = nicht vorhanden;

Tabelle 6. 7 Menge an gebildetem IL-8 6 h nach erfolgter Co-Infektion von HT29 Zellen mit PMK5/Mutanten von PMK5 (MOI 2) und *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200) im Vergleich zur Mono-Infektion der EHEC-Stämme (= 100 %). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. p(PMK5) = auf die IL-8 Induktion des Wildtyp-Stammes PMK5 bezogen, $p < 0,05$ gilt als signifikant.

Stamm	IL-8 Induktion [%] nach Co-Infektion mit <i>S. pasteurii</i> LTH 5211	p(PMK5)
PMK5	63,9 ± 7,2	
PMK5 Δtir	59,1 ± 2,2	0,119
PMK5 Δeae	58,6 ± 5,6	0,178
PMK5 $\Delta ehly$	71,4 ± 6,2	0,240
PMK5 $\Delta stx1$	72,4 ± 11,2	0,387

Tabelle 6. 8 Transfizierte HT29-Zellen nach erfolgter Stimulation von HT29 Zellen mit EHEC-, Milchsäurebakterien- oder Bifidobakterien-Stämmen, sowie *S. pasteurii* LTH 5211. Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte wurden 6 h nach der Infektion auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert (RLU). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen..

Stamm	Relative light units (RLU)
Kontrolle: TNF- α	2,75 \pm 0,27
EDL933	1,59 \pm 0,16
PMK5	1,62 \pm 0,19
2331/01	1,55 \pm 0,18
5791/99	1,59 \pm 0,15
TS18/08	1,59 \pm 0,18
MBS	* Ergebnisse siehe Tabelle 6. 8. 1

***Tabelle 6. 8. 1** Der Wert MBS (siehe Abb. 3. 1) stellt einen gemittelten Wert der Luciferaseaktivität von HT29-Zellen dar, welche mit Milchsäurebakterien- und Bifidobakterien-Stämmen sowie *S. pasteurii* LTH 5211 stimuliert wurden. Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte wurden 6 h nach der Infektion auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert (RLU). Dargestellt sind für jeden Stamm die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Stamm	Relative light units (RLU)
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	0,64 \pm 0,14
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	0,68 \pm 0,04
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	0,80 \pm 0,15
<i>L. rhamnosus</i> GG	0,77 \pm 0,09
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	0,69 \pm 0,09
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	0,79 \pm 0,08
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	0,66 \pm 0,22
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	0,83 \pm 0,08
<i>B. lactis</i> NCC 362	0,67 \pm 0,11
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	0,68 \pm 0,19
Mittelwert	0,72 \pm 0,07

Tab. 6. 9 Luciferaseaktivität transfizierter HT29-Zellen nach Co-Infektion mit verschiedenen EHEC-Stämmen und Milchsäurebakterien, Bifidobakterien bzw. *S. pasteurii* LTH 5211 (MOI 200). Die Luciferaseaktivität der Zellextrakte wurden 6 h nach der Infektion auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Proteingehalt normalisiert. EHEC-Monoinfektion = 100 %. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen abgebildet.

Stamm	Relative light units (RLU)					
	ohne EHEC	mit EDL933	mit PMK5	mit 2331/01	mit 5791/99	mit TS18/08
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	52,6 ± 5,3	46,3 ± 10,9	46,5 ± 9,6	60,3 ± 10,1	44,8 ± 10,3	49,6 ± 6,9
<i>S. pasteurii</i> LTH 5211	43,0 ± 12,0	46,8 ± 14,0	46,6 ± 12,0	49,6 ± 9,1	46,8 ± 9,4	44,5 ± 6,2
<i>L. rhamnosus</i> GG	48,5 ± 5,5	49,4 ± 4,0	48 ± 9,1	41,9 ± 12,6	56,2 ± 8,3	57,2 ± 10,1
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20086	41,9 ± 14,1	33,5 ± 7,8	40,6 ± 8,8	40,3 ± 9,9	43,6 ± 9,4	46,1 ± 7,5
<i>L. johnsonii</i> DSMZ 10533	50,0 ± 9,3	47,5 ± 12,9	45 ± 11,6	47,5 ± 8,5	38,6 ± 11,7	51,5 ± 12,3
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	43,7 ± 5,5	47,6 ± 10,7	52,2 ± 9,6	40,9 ± 9,3	56,9 ± 4,3	51,5 ± 10,4
<i>B. lactis</i> NCC 362	42,6 ± 6,9	38,1 ± 9,2	58,5 ± 12,8	55,1 ± 11,7	41,8 ± 8,1	43,9 ± 11,4
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 20083	50,1 ± 5,1	46,1 ± 13,4	49,0 ± 13,5	44,2 ± 12,6	50,3 ± 8,8	48,0 ± 5,5
<i>L. helveticus</i> DSMZ 20075	43,2 ± 2,4	46,0 ± 11,7	41,1 ± 5,2	32,4 ± 5,6	36,9 ± 9,6	40,3 ± 8,0
<i>L. fermentum</i> DSMZ 20052	40,4 ± 9,0	61,6 ± 9,6	63,5 ± 8,1	53,0 ± 11,8	55,1 ± 9,3	58,2 ± 8,5

Tabelle 6. 10 Expression der Gene TLR2, -4 und -9 von HT29-Zellen 6 h nach Infektion/Co-Infektion mit EDL933 (MOI 2) und/oder Milchsäurebakterien (MOI 200). Die relative Genexpression wurde auf das Haushaltsgen β -Aktin bezogen und die Effizienz berücksichtigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

p(PBS) = auf die Negativkontrolle PBS bezogen; $p < 0,05$ gilt als signifikant.

p(EDL933) = auf die Infektion mit EDL933 bezogen, $p < 0,05$ gilt als signifikant.

A		TLR2	p(PBS)	p(EDL933)
Kontrollen	PBS	1		
	EDL933	$0,75 \pm 0,17$	0,120	
<i>L. rhamnosus</i>	in PBS	$0,54 \pm 0,14$	0,030	0,177
GG	mit EDL933	$0,62 \pm 0,13$	0,037	0,358
<i>L. fermentum</i>	in PBS	$0,77 \pm 0,30$	0,314	0,923
DSMZ 20052	mit EDL933	$0,59 \pm 0,04$	0,004	0,233
<i>L. johnsonii</i>	in PBS	$0,72 \pm 0,13$	0,058	0,780
DSMZ 10533	mit EDL933	$0,96 \pm 0,30$	0,851	0,359
B		TLR4	p (PBS)	p (EDL933)
Kontrollen	PBS	1		
	EDL933	$0,47 \pm 0,15$	0,005	
<i>L. rhamnosus</i>	in PBS	$0,54 \pm 0,27$	0,097	0,699
GG	mit EDL933	$0,55 \pm 0,31$	0,126	0,701
<i>L. fermentum</i>	in PBS	$0,71 \pm 0,42$	0,354	0,420
DSMZ 20052	mit EDL933	$0,66 \pm 0,08$	0,105	0,116
<i>L. johnsonii</i>	in PBS	$0,56 \pm 0,25$	0,093	0,597
DSMZ 10533	mit EDL933	$0,57 \pm 0,18$	0,051	0,454
C		TLR9	p (PBS)	p (EDL933)
Kontrollen	PBS	1		
	EDL933	$2,43 \pm 0,43$	0,028	
<i>L. rhamnosus</i>	in PBS	$0,99 \pm 0,35$	0,965	0,012
GG	mit EDL933	$1,27 \pm 0,37$	0,331	0,024
<i>L. fermentum</i>	in PBS	$1,08 \pm 0,52$	0,818	0,027
DSMZ 20052	mit EDL933	$0,92 \pm 0,24$	0,62	0,011
<i>L. johnsonii</i>	in PBS	$1,03 \pm 0,17$	0,817	0,018
DSMZ 10533	mit EDL933	$2,03 \pm 0,43$	0,054	0,325

7. Literaturverzeichnis

- Akhtar, M., Watson, J. L., Nazli, A., McKay, D. M., 2003. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J.* 17,1319-1321.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. M., 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl.Environ.Microbiol.* 66,2001-2005.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L., Cookson, B. T., Logan, S. M., Aderem, A., 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102,9247-9252.
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., Takeda, Y., 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect.Immun.* 72,2240-2247.
- Atkins, D., Furuta, G. T., 2010. Mucosal immunology, eosinophilic esophagitis, and other intestinal inflammatory diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 125,S255-S261.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv.Immunol.* 55,97-179.
- Basu, S., Paul, D. K., Ganguly, S., Chatterjee, M., Chandra, P. K., 2009. Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J.Clin.Gastroenterol.* 43,208-213.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl.Environ.Microbiol.* 72,1729-1738.
- Benninghoff, A, Drenckhahn, D, 2008. Anatomie. Elsevier 17 th, Bd.1, 667-691.
- Berggren, A., Lazou, Ahren, I, Larsson, N., Onning, G., 2010. Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *Eur.J.Nutr.*
- Berin, M. C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L. J., Miyamoto, Y., Kagnoff, M. F., 2002. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-

- kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol.* 4,635-648.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L., 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35,483-489.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczus, T., Karch, H., 2005. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect.Immun.* 73,552-562.
- Bjorland, J., Bratlie, M. S., Steinum, T., 2007. The smr gene resides on a novel plasmid pSP187 identified in a *Staphylococcus pasteurii* isolate recovered from unpasteurized milk. *Plasmid* 57,145-155.
- Boirivant, M., Strober, W., 2007. The mechanism of action of probiotics. *Curr.Opin.-Gastroenterol.* 23,679-692.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., Gershwin, M. E., 2009. Probiotics and immunity. *J.Gastroenterol.* 44,26-46.
- Bowie, A., O'Neill, L. A., 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J.Leukoc.Biol.* 67,508-514.
- Britton, R. A., Versalovic, J., 2008. Probiotics and gastrointestinal infections. *Interdiscip.Perspect.Infect.Dis.* 2008,290769.
- Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H., 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142 (Pt 11),3305-3315.
- Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H., 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol.Microbiol.* 24,767-778.
- Bruno, M. E., Rogier, E. W., Frantz, A. L., Stefka, A. T., Thompson, S. N., Kaetzel, C. S., 2010. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor in intestinal epithelial cells by *Enterobacteriaceae*: implications for mucosal homeostasis. *Immunol.Invest* 39,356-382.

- Burkholder, K. M., Bhunia, A. K., 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Gut Pathog. 1,14.
- Cadieux, P. A., Burton, J., Devillard, E., Reid, G., 2009. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J.Physiol Pharmacol. 60 Suppl 6,13-18.
- Caletti, M. G., Lejarraga, H., Kelmansky, D., Missoni, M., 2004. Two different therapeutic regimes in patients with sequelae of hemolytic-uremic syndrome. Pediatr Nephrol 19,1148-1152.
- Carey, C. M., Kostrzynska, M., Ojha, S., Thompson, S., 2008. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J.Microbiol.Methods 73,125-132.
- Cario, E., Gerken, G., Podolsky, D. K., 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. Gastroenterology 127,224-238.
- Cario, E., Rosenberg, I. M., Brandwein, S. L., Beck, P. L., Reinecker, H. C., Podolsky, D. K., 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. J.Immunol. 164,966-972.
- Ceponis, P. J., Riff, J. D., Sherman, P. M., 2005. Epithelial cell signaling responses to enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 100 Suppl 1,199-203.
- Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H., el Solh, N., 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. Int.J.Syst.Bacteriol. 43,237-244.
- Clavel, T., Haller, D., 2007. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. Curr.Issues Intest.Microbiol. 8,25-43.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., Le, Blay G., 2007. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. BMC.Microbiol. 7,101.

- Corthesy, B., Gaskins, H. R., Mercenier, A., 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J.Nutr.* 137,781S-790S.
- Creuzburg, K., Schmidt, H., 2007. Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector nleA family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *J.Clin.Microbiol.* 45,2498-2507.
- Croxen, M. A., Finlay, B. B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat.Rev.Microbiol.* 8,26-38.
- Dahan, S., Busuttil, V., Imbert, V., Peyron, J. F., Rampal, P., Czerucka, D., 2002. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in T84 cells. *Infect.Immun.* 70,2304-2310.
- De Keersmaecker, S. C., Verhoeven, T. L., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., Nagy, I., 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella* Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol.Lett.* 259,89-96.
- de Vries, W., Stouthamer, A. H., 1968. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol, and xylose by bifidobacteria. *J.Bacteriol.* 96,472-478.
- Dean, P., Maresca, M., Kenny, B., 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr.Opin.Microbiol.* 8,28-34.
- Didierlaurent, A., Sirard, J. C., Kraehenbuhl, J. P., Neutra, M. R., 2002. How the gut senses its content. *Cell Microbiol.* 4,61-72.
- Dignass, A. U., 2001. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm.Bowel.Dis.* 7,68-77.
- Durant, J. A., Carrier, D. E., Ricke, S. C., 2000. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of *Salmonella typhimurium*. *J.Food Prot.* 63,573-578.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308,1635-1638.

- Eckmann, L., Kagnoff, M. F., Fierer, J., 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect.Immun.* 61,4569-4574.
- Ewaschuk, J. B., Backer, J. L., Churchill, T. A., Obermeier, F., Krause, D. O., Madsen, K. L., 2007. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect.Immun.* 75,2572-2579.
- Famularo, G., De Simone C., Matteuzzi, D., Pirovano, F., 1999. Traditional and high potency probiotic preparations for oral bacteriotherapy. *BioDrugs.* 12,455-470.
- Fanghänel, J., Pera, F., Anderhuber, F., Nitsch, R., 2003. *Waldeyer Anatomie des Menschen.* de Gruyter 17 th, 991-1000.
- FAO/WHO, 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultant Report 1-34.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B., Svanborg, C., 2006. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur.J.Immunol.* 36,267-277.
- Foster, J. W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat.Rev.Microbiol.* 2,898-907.
- Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., Spyropoulos, B. G., Zografos, E. D., 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J.Gastroenterol.* 14,6453-6457.
- Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B., Knutton, S., 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol.Microbiol.* 30,911-921.
- Frick, J. S., Fink, K., Kahl, F., Niemiec, M. J., Quitadamo, M., Schenk, K., Autenrieth, I. B., 2007a. Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect.Immun.* 75,3490-3497.
- Frick, J. S., Schenk, K., Quitadamo, M., Kahl, F., Koberle, M., Bohn, E., Aepfelbacher, M., Autenrieth, I. B., 2007b. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm.Bowel.Dis.* 13,83-90.

- Friedrich, A. W., Lu, S., Bielaszewska, M., Prager, R., Bruns, P., Xu, J. G., Tschape, H., Karch, H., 2006. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J.Clin.Microbiol.* 44,1844-1846.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., Macfarlane, G. T., 2005. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115,565-574.
- Gao, X., Wan, F., Mateo, K., Callegari, E., Wang, D., Deng, W., Puente, J., Li, F., Chaussee, M. S., Finlay, B. B., Lenardo, M. J., Hardwidge, P. R., 2009. Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. *PLoS.Pathog.* 5,e1000708.
- Garmendia, J., Frankel, G., Crepin, V. F., 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect.Immun.* 73,2573-2585.
- Ghadimi, D., Vrese, M., Heller, K. J., Schrezenmeir, J., 2010. Effect of natural commensal-origin DNA on toll-like receptor 9 (TLR9) signaling cascade, chemokine IL-8 expression, and barrier integrity of polarized intestinal epithelial cells. *Inflamm.Bowel.Dis.* 16,410-427.
- Gobert, A. P., Coste, A., Guzman, C. A., Vareille, M., Hindre, T., de Sablet T., Girardeau, J. P., Martin, C., 2008. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. *Microbes.Infect.* 10,159-165.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S., 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig.Dis.Sci.* 37,121-128.
- Goldwater, P. N., 2007. Treatment and prevention of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 5,653-663.
- Gratz, S. W., Mykkanen, H., El-Nezami, H. S., 2010. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J.Gastroenterol.* 16,403-410.
- Guandalini, S., Magazzu, G., Chiaro, A., La, Balestra, V, Di, Nardo G., Gopalan, S., Sibal, A., Romano, C., Canani, R. B., Lionetti, P., Setty, M., 2010. VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J.Pediatr Gastroenterol.Nutr.* 51,24-30.

- Guessous, F., Marcinkiewicz, M., Polanowska-Grabowska, R., Kongkhum, S., Heatherly, D., Obrig, T., Gear, A. R., 2005. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. *Infect.Immun.* 73,8306-8316.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hammes, W. P., Hertel, C., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, *The Firmicutes*. Springer, New York.
- Hart, A. L., Stagg, A. J., Frame, M., Graffner, H., Glise, H., Falk, P., Kamm, M. A., 2002. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 16,1383-1393.
- Hauf, N., Chakraborty, T., 2003. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J.Immunol.* 170,2074-2082.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spottl, T., Andus, T., Scholmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., Rogler, G., 2002. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122,1987-2000.
- Hedin, C., Whelan, K., Lindsay, J. O., 2007. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc.Nutr.Soc.* 66,307-315.
- Higgins, S. E., Higgins, J. P., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Tellez, G., Hargis, B., 2008. Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella* Enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poult.Sci.* 87,27-31.
- Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., Yokochi, T., 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol.Immunol.* 47,405-409.
- House, B., Kus, J. V., Prayitno, N., Mair, R., Que, L., Chingcuanco, F., Gannon, V., Cvitkovitch, D. G., Barnett, Foster D., 2009. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 virulence. *Microbiology* 155,2907-2918.

- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L., 2006. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Syst.Appl.Microbiol.* 29,480-486.
- Iannitti, T., Palmieri, B., 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin.Nutr.* 29(6):701-25
- Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Salminen, S., 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50 Suppl 3,III54-III59.
- Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20,197-216.
- Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M. A., Karch, H., 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect.Immun.* 71,3634-3638.
- Jelcic, I., Hufner, E., Schmidt, H., Hertel, C., 2008. Repression of the locus of the enterocyte effacement-encoded regulator of gene transcription of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus reuteri* culture supernatants is LuxS and strain dependent. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* 74,3310-3314.
- Jeong, K. I., Chapman-Bonofiglio, S., Singh, P., Lee, J., Tzipori, S., Sheoran, A. S., 2010. *In vitro* and *in vivo* protective efficacies of antibodies that neutralize the RNA N-glycosidase activity of Shiga toxin 2. *BMC.Immunol.* 11,16.
- Jobin, C., Sartor, R. B., 2000. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278,C451-C462.
- Johnson-Henry, K. C., Donato, K. A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., Sherman, P. M., 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect.Immun.* 76,1340-1348.
- Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A., Sherman, P. M., 2007. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol.* 9,356-367.

- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M. F., 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J.Clin.Invest* 95,55-65.
- Kamada, N., Maeda, K., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Hong, K. S., Yamada, T., Watanabe, N., Tsuchimoto, K., Ogata, H., Hibi, T., 2008. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect.Immun.* 76,214-220.
- Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49,209-224.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von, Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., Hamalainen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K. T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjarvi, T., Auvinen, P., de Vos, W. M., 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106,17193-17198.
- Karch, H., Bielaszewska, M., 2001. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* 39,2043-2049.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 18,621-663.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.* 11,373-384.
- Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., Conway, S., 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat.Immunol.* 5,104-112.
- Kim, H. G., Lee, S. Y., Kim, N. R., Ko, M. Y., Lee, J. M., Yi, T. H., Chung, S. K., Chung, D. K., 2008a. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor-alpha production. *J.Microbiol.Biotechnol.* 18,1191-1196.

- Kim, Y., Kim, S. H., Whang, K. Y., Kim, Y. J., Oh, S., 2008b. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J.Microbiol.Biotechnol.* 18,1278-1285.
- Knutton, S., Lloyd, D. R., McNeish, A. S., 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect.Immun.* 55,69-77.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem.J.* 420,1-16.
- Lang, C., Bottner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Pompejus, M., Tanzer, J. M., 2010. Specific *Lactobacillus/Mutans Streptococcus* co-aggregation. *J.Dent.Res.* 89,175-179.
- Lavelle, E. C., Murphy, C., O'Neill, L. A., Creagh, E. M., 2010. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal.Immunol.* 3,17-28.
- Le Bouguenec, C., 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int.J.Med.Microbiol.* 295,471-478.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 72,728-64, Table.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat.Rev.Microbiol.* 8,171-184.
- Lee, J. H., O'Sullivan, D. J., 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 74,378-416.
- Lee, S. K., Il, Kim T., Kim, Y. K., Choi, C. H., Yang, K. M., Chae, B., Kim, W. H., 2005. Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 337, 457-463.
- Lee, Y. K., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., Salminen, S., 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J.Med.Microbiol.* 52,925-930.

- Lim, J. Y., Yoon, J., Hovde, C. J., 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J.Microbiol.Biotechnol.* 20,5-14.
- Liong, M. T., 2008. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr.Rev.* 66,192-202.
- Lkhagvadorj, E., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C., Chiba, Y., Yamashiro, Y., Shimizu, T., Asahara, T., Nomoto, K., 2010. Anti-infectious activity of synbiotics in a novel mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiol.Immunol.* 54,265-275.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, The *Firmicutes*. Springer, New York.
- Maier, E., 2009. Untersuchungen zur Adhäsion von probiotischen Bakterien und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) im Zellkulturmodell. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.
- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat, C., Goulet, P., Sansonetti, P. J., Elion, J., 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J.Clin.Microbiol.* 31,296-301.
- Medellin-Pena, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M. W., 2007. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl.Environ.Microbiol.* 73,4259-4267.
- Melmed, G., Thomas, L. S., Lee, N., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M., Abreu, M. T., 2003. 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.* 170,1406-1415.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M., 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442,39-44.
- Miyazaki, Y., Kamiya, S., Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Takahashi, H., Yokota, H., 2010. Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. *J.Infect.Chemother.* 16:10-18.
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., Satoh, E., 2006. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 70,1622-1628.

- Mogensen, T. H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin.Microbiol.Rev.* 22,240-73.
- Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y., Matsushima, K., 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J.Leukoc.Biol.* 56,554-558.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., 2009. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag 7th, 5-37.
- Nandakumar, N. S., Pugazhendhi, S., Madhu, Mohan K., Jayakanthan, K., Ramakrishna, B. S., 2009. Effect of *Vibrio cholerae* on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by *Lactobacillus* GG. *Scand.J.Immunol.* 69,181-187.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* 11,142-201.
- Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A., Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S., Hartland, E. L., 2010. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. *PLoS.Pathog.* 6,e1000898.
- Noris, M., Remuzzi, G., 2005. Hemolytic uremic syndrome. *J.Am.Soc.Nephrol.* 16,1035-1050.
- O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W., Formal, S. B., 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226,694-696.
- O'Hara, A. M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., Shanahan, F., 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118,202-215.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7,688-693.
- O'Loughlin, E. V., Robins-Browne, R. M., 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes.Infect.* 3,493-507.

- Oelschlaeger, T. A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int.J.Med.Microbiol.* 300,57-62.
- Over, K. F., Hettiarachchy, N., Johnson, M. G., Davis, B., 2009. Effect of organic acids and plant extracts on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in broth culture model and chicken meat systems. *J.Food Sci.* 74,M515-M521.
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., Cominelli, F., 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107,454-459.
- Palazzo, M., Gariboldi, S., Zanobbio, L., Dusio, G. F., Selleri, S., Bedoni, M., Balsari, A., Rumio, C., 2008. Cross-talk among Toll-like receptors and their ligands. *Int.Immunol.* 20,709-718.
- Paton, A. W., Morona, R., Paton, J. C., 2000. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat.Med.* 6,265-270.
- Paton, J. C., Paton, A. W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin.Microbiol.Rev.* 11,450-479.
- Paton, J. C., Rogers, T. J., Morona, R., Paton, A. W., 2001. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 69,1389-1393.
- Petrof, E. O., Kojima, K., Ropeleski, M. J., Musch, M. W., Tao, Y., De, Simone C., Chang, E. B., 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127,1474-1487.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol.Lett.* 26,509-515.
- Pineiro, M., Stanton, C., 2007. Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. *J.Nutr.* 137,850S-853S.

- Prado, Acosta M., Mercedes, Palomino M., Allievi, M. C., Sanchez, Rivas C., Ruzal, S. M., 2008. Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl. Environ. Microbiol.* 74,7824-7827.
- Prager, R., Annemuller, S., Tschape, H., 2005. Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases-need for more detailed diagnostics. *Int. J. Med. Microbiol.* 295,29-38.
- Preising, J., Philippe, D., Gleinser, M., Wei, H., Blum, S., Eikmanns, B. J., Niess, J. H., Riedel, C. U., 2010. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity *in vitro* for amelioration of murine colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76,3048-3051.
- Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63,2355-2360.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G. C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van, Loo J., Watzl, B., Collins, J. K., 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 85,488-496.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118,229-241.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., Swerdlow, D. L., 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11,603-609.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308,681-685.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* 27,1-11.
- Robert Koch Institut, 2008. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte.

- Robert Koch Institut, 2010. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009.
- Roebuck, K. A., 1999. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J.Interferon Cytokine Res.* 19,429-438.
- Rousset, M., Paris, H., Chevalier, G., Terrain, B., Murat, J. C., Zweibaum, A., 1984. Growth-related enzymatic control of glycogen metabolism in cultured human tumor cells. *Cancer Res.* 44,154-160.
- Russell, R. M., Sharp, F. C., Rasko, D. A., Sperandio, V., 2007. QseA and GrlR/GrlA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 189,5387-5392.
- Salminen, S., 1996. Functional dairy foods with *Lactobacillus strain* GG. *Nutr.Rev.* 54,S99-101.
- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M. C., Vesterlund, S., El-Nezami, H., 2010. Interaction of probiotics and pathogens--benefits to human health? *Curr.Opin.Biotechnol.* 21,157-167.
- Scheiring, J., Andreoli, S. P., Zimmerhackl, L. B., 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol* 23,1749-1760.
- Scheiring, J., Rosales, A., Zimmerhackl, L. B., 2010. Clinical practice. Today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome. *Eur.J.Pediatr* 169,7-13.
- Schleifer, K.-H., Bell, J. A., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, *The Firmicutes*. Springer, New York.
- Schmidt, H., Maier, E., Karch, H., Benz, R., 1996. Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur.J.Biochem.* 241,594-601.
- Sharma, R., Young, C., Neu, J., 2010. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010,305879.
- Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S., Goulet, J., Tompkins, T. A., 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell

- monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect.Immun.* 73,5183-5188.
- Sherman, P. M., Ossa, J. C., Johnson-Henry, K., 2009. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr.Clin.Pract.* 24,10-14.
- Sibartie, S., O'Hara, A. M., Ryan, J., Fanning, A., O'Mahony, J., O'Neill, S., Sheil, B., O'Mahony, L., Shanahan, F., 2009. Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC.Immunol.* 10,54.
- Slanec, T., Fruth, A., Creuzburg, K., Schmidt, H., 2009. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* 75,6187-6197.
- Stevens, M. P., Marches, O., Campbell, J., Huter, V., Frankel, G., Phillips, A. D., Oswald, E., Wallis, T. S., 2002. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. *Infect.Immun.* 70,945-952.
- Tajima, A., Iwase, T., Shinji, H., Seki, K., Mizunoe, Y., 2009. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect.Immun.* 77,327-334.
- Tanzer, J. M., Thompson, A., Lang, C., Cooper, B., Hareng, L., Gamer, A., Reindl, A., Pompejus, M., 2010. Caries inhibition by and safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. *J.Dent.Res.* 89,921-926.
- Taylor, C. M., 2008. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr.Nephrol.* 23,1425-1431.
- Thorpe, C. M., Hurley, B. P., Lincicome, L. L., Jacewicz, M. S., Keusch, G. T., Acheson, D. W., 1999. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect.Immun.* 67,5985-5993.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M., Beynen, A. C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int.J.Food Microbiol.* 96,219-233.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda,

- D. P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesova, A., 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol.Lett.* 93,97-108.
- Toki, S., Kagaya, S., Shinohara, M., Wakiguchi, H., Matsumoto, T., Takahata, Y., Morimatsu, F., Saito, H., Matsumoto, K., 2009. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 148,45-58.
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., Westendorf, A. M., 2007. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS.One.* 2,e1308.
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J., Six, S., 1994. Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66,3-22.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., Ladefoged, K., 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl.Environ.Microbiol.* 70,1176-1181.
- Veckman, V., Miettinen, M., Matikainen, S., Lande, R., Giacomini, E., Coccia, E. M., Julkunen, I., 2003. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J.Leukoc.Biol.* 74,395-402.
- Ventura, M., van, Sinderen D., Fitzgerald, G. F., Zink, R., 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86,205-223.
- Visich, K. L., Yeo, T. P., 2010. The prophylactic use of probiotics in the prevention of radiation therapy-induced diarrhea. *Clin.J.Oncol.Nurs.* 14,467-473.
- Vizoso Pinto, M. G., Rodriguez, Gomez M., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., Franz, C. M., 2009. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells *in vitro*. *Int.J.Food Microbiol.* 133,86-93.
- Walter, J., Chagnaud, P., Tannock, G. W., Loach, D. M., Dal, Bello F., Jenkinson, H. F., Hammes, W. P., Hertel, C., 2005. A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Appl.Environ.Microbiol.* 71,979-986.

- Westerholt, S., Hartung, T., Tollens, M., Gustrau, A., Oberhoffer, M., Karch, H., Klare, B., Pfeffer, K., Emmrich, P., Oberhoffer, R., 2000. Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine* 12,822-827.
- Wittig, B. M., Zeitz, M., 2003. The gut as an organ of immunology. *Int.J.Colorectal Dis.* 18,181-187.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., Puente, J. L., Giron, J. A., 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J.Clin.Invest* 117,3519-3529.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T. L., Whitehead, R., Washington, M. K., Polk, D. B., 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 132,562-575.
- Yuk, H. G., Marshall, D. L., 2005. Influence of acetic, citric, and lactic acids on *Escherichia coli* O157:H7 membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance in simulated gastric fluid. *J.Food Prot.* 68,673-679.
- Zarembek, K. A., Godowski, P. J., 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J.Immunol.* 168,554-561.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., 2010. Microbes and Health Sackler Colloquium: Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*
- Zoja, C., Buelli, S., Morigi, M., 2010. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol.*
- Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M. A., 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.* 9,804-816.

*Die Doktorarbeit war eine schöne Zeit
und daher ist es nun so weit,
den vielen Menschen Danke zu sagen,
für Rat und Unterstützung an vielen Tagen!*

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt für die Überlassung des Themas, sowie für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Dissertation im Fachgebiet Lebensmittel-mikrobiologie des Institutes für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim.

Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth und Frau Dr. Julia-Stefanie Frick vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen für die erfolgreiche Projektkooperation.

dem Zentrum für Ernährungsmedizin der Universitäten Tübingen und Hohenheim für die finanzielle Förderung des Projektes.

Annette Bruckbauer für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei unzähligen Infektionsversuchen.

Frau Dipl.-Ing. Dr. Agnes Weiß für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frauke Effinger für die Vermittlung der Grundlagen für das Arbeiten mit Zellkulturen und dem stets für Fragen offene Ohr.

Eva Meier für die erfolgreiche Bearbeitung eines Teilbereiches des Projektes im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

allen Mitarbeitern des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie für die nette Atmosphäre und die konstruktiven Kaffeepausen.

meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und Thorsten Sauter für Alles.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt wurde. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet.

Stuttgart, 10.02.2011

Helen Stöber