Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

Effekt kommensaler Bakterienstämme auf eine Yersinia enterocolitica pYV$^-$ Infektion menschlicher Epithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Katrin Dorothee Vanderelst, geb. Schenk

aus

Aalen

2008

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Gregor

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**7**
1.1	**Physiologische Darmflora**	7
1.2	**Probiotika**	7
1.2.1	Probiotische Mechanismen	9
	Konkurrenz um Bindungsstellen am Darmepithel	9
	Stabilisierung der Barrierefunktion der Schleimhaut	10
	Sekretion antimikrobieller Substanzen	10
	Modulation der Immunantwort und der Sekretion inflammatorischer Zytokine	11
1.3	**Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**	12
1.3.1	Behandlung von Colitis ulcerosa	14
1.3.2	Weitere Einsatzmöglichkeiten für probiotische Bakterien	15
1.3.3	*Lactobacilli*	15
1.4	**Das der Arbeit zugrundeliegende in-vitro-Modell**	16
1.5	**Ziel der vorliegenden Arbeit**	17
2	**Material und Methoden**	**18**
2.1	**Material**	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Medien und Chemikalien	19
2.1.4	Antikörper	20

2.1.5	Rekombinante Proteine	20
2.1.6	Zelllinien	20
2.1.7	Bakterienstämme	21
2.1.8	Medien	21
2.1.9	Puffer und Lösungen	23
2.2	**Methoden**	25
2.2.1	Bakterienkulturen	25
2.2.1.1	Kultivierung von Bakterien für Infektionsversuche	25
2.2.1.2	Herstellung von hitzegetöteten Bakterien (heat-kill)	25
2.2.1.3	Herstellung von Überständen	26
2.2.1.3.1	Extraktion der hydrophoben Phase	26
2.2.1.3.2	Proteinase K acryl beads	27
2.2.1.3.3	Eisenchlorid ($FeCl_3$)	27
2.2.1.3.4	Filtrieren (dialysieren)	27
2.2.1.3.5	Phospholipase C	28
2.2.2	Zellkulturen	28
2.2.2.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	28
2.2.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	29
2.2.2.3	Aussaat von HeLa-Zellen für Infektionsversuche	29
2.2.2.4	Infektion von HeLa-Zellen zur IL-8-Induktion	29
2.2.3	ELISA: Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration in Zellkulturüberständen	30
2.2.3.1	Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA	30
2.2.3.2	Ablauf der IL-8-Messung mittels ELISA	31
2.2.4	Statistik	31
3	**Ergebnisse**	**33**
3.1	**Modulation der durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion mittels lebenden komensalen Bakterien**	33

3.2 **Hitzeinaktivierte komensale Bakterien beeinflussen die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht** 34

3.3 **Kulturüberstände komensaler Bakterien beeinflussen die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion** 37

3.4 **Proteinase K oder Eisenchlorid ($FeCl_3$) können den antiinflammatorischen Effekt der Kulturüberstände komensaler Bakterien nicht beeinflussen** 43

3.5 **Modulation der *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion durch die hydrophobe Phase aus dem Kulturüberstand von *L. fermentum*** 44

3.6 **Hemmung der durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion über ein Glycerophospholipid, das kleiner als 10 kDa ist** 47

4 **Diskussion** **49**

4.1 **Zusammenfassung der Ergebnisse** 49

4.2 **Wirkung von Komensalen und Probiotika auf Entzündung in Darmepithelzellen** 52

4.3 **Inhibition der IL-8 Produktion** 54

4.4 **Für IL-8 Inhibition verantwortliche Faktoren** 56

4.5 **Ausblick** 59

5 **Zusammenfassung** **61**

6 Literaturverzeichnis 63

7 Abkürzungen 69

8 Danksagung 73

9 Lebenslauf 74

1 Einleitung

1.1 Physiologische Darmflora

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten durch die der menschliche Körper mit Mikroorganismen, mit denen er in Kontakt kommt, interagieren kann. Zum einen durch Symbiose - einer Beziehung zwischen zwei Spezies, wobei die eine von der anderen profitiert ohne zu schädigen. Zum anderen durch pathogene Reaktionen, die zu einer entzündlichen Antwort und möglicherweise zu einer Schädigung des Wirtsorganismus führen können. Die dritte Möglichkeit beschreibt das Zusammenleben zweier Spezies ohne Nachteil, aber auch ohne offensichtlichen Nutzen für beide. Diese Mikroorganismen, die einen Großteil der physiologischen Flora darstellen, nennt man kommensal [1]. Die physiologische Flora des Gastrointestinaltraktes ist so komplex, dass sie als aktives, funktionelles Organ angesehen werden kann. Ein Gramm Darminhalt enthält etwa 10^{12} viable Bakterien, das heißt, dass im Darm einer Person mehr Bakterien leben, als jemals Menschen auf diesem Planeten [2]. Zu 99,9% handelt es sich dabei um obligat anaerobe Bakterien [3]. Die normale Flora übernimmt wichtige Funktionen, unter anderem bildet sie eine Barriere, die vor Besiedelung mit pathogenen Mikroorganismen schützt, indem sie alle Nischen des Darmes besetzt und antimikrobielle Substanzen produziert [4,5]. Welche weiteren positiven Wirkungen Bakterien auf den Wirtsorganismus haben können, soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.2 Probiotika

Versuche mit keimfreien Mäusen zeigen, dass der Wirtsorganismus nicht notwendigerweise eine physiologische intestinale Flora benötigt, diese durch ihre protektiven Eigenschaften aber von entscheidender Bedeutung ist [6]. Beispiel für eine symbiotische Beziehung zwischen Mikroorganismen und Darm sind Probiotika. Die Definition von Probiotika hat sich in den letzten 30 Jahren stetig gewandelt. Aktuell werden Probiotika definiert als „eine Zubereitung von oder ein Produkt mit viablen, definierten Mikroorganismen in ausreichender

Anzahl, welche (durch Implantierung oder Kolonisierung) die Mikroflora in einem Kompartiment des Wirtes verändern und hierdurch vorteilhafte gesundheitliche Auswirkungen in diesem Wirt ausüben“ [7]. Mikroorganismen müssen also folgende Voraussetzungen erfüllen, um die Kriterien der gängigen Definition des Begriffes „probiotisch“ zu erfüllen:

- Es muss sich um Kulturen lebender Mikroorganismen handeln.
- Es muss sich um definierte Gattungen handeln, z.B. *Lactobacillus* oder *Bifidobacterium*.
- Sie müssen in ausreichender Anzahl verabreicht werden.
- Sie müssen die physiologische Mikroflora in einer Weise beeinflussen, die sich positiv auf die Gesundheit des Wirtes auswirkt.

Warum aber reagiert das mukosaassoziierte Immunsystem des Darmes nicht auch auf probiotische Bakterien mit einer entzündlichen Reaktion wie auf pathogenen Bakterien, und wie können manche Bakterien eine positive Wirkung haben? Die Tatsache, dass Antigene von Nahrungsmitteln und Mikroorganismen immunologisch toleriert werden und keine entzündliche Reaktion des Darmepithels hervorgerufen wird, nennt man orale Toleranz (OT). Dabei kommt es zu einer antigenspezifischen Suppression der Immunantwort nachdem das Antigen oral verabreicht wurde. Die Immunmechanismen einer klonalen Deletion (T-Zellapoptose) und einer klonalen T-Zellanergie (Nichtreagieren auf ein Antigen bei herabgesetzter Immunlage) vermitteln die Induktion der OT [8]. Allerdings sind diese Vorgänge sehr komplex und bis heute noch nicht ganz verstanden. Es gibt nur wenige Erklärungsansätze, warum Probiotika und Kommensale keine Entzündung hervorrufen. Zum einen könnte es sein, dass ihnen Signalmoleküle (microbe-associated molecular patterns = MAMPs) fehlen, wie z.B. die Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien, oder die Teichonsäure Gram-positiver Bakterien, welche die Entzündungskaskade aktivieren [9]. Auch besteht die Möglichkeit, dass die Darmepithelzellen keine Erkennungsrezeptoren für Signalmoleküle der Probiotika produzieren und so die Signalweiterleitung verhindern [9]. Dadurch

wären die Darmepithelzellen unempfindlich gegenüber Probiotika und Kommensalen, die keine Mechanismen haben um die angeborene Immunität zu aktivieren. Zum anderen könnte es sein, dass kein Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithelzellen entsteht, da Probiotika und Kommensale hauptsächlich im Darmlumen und der Mukusschicht oberhalb des Epithels lokalisiert zu sein scheinen [9].

1.2.1 Probiotische Mechanismen

Konkurrenz um Bindungsstellen am Darmepithel

Die Flora des menschlichen Darms umfasst mehr als 500 Bakterienspezies, wobei die Anzahl der vorhandenen Bakterienzellen ca. 95% der Gesamtzellzahl im menschlichen Körper ausmacht [10]. Pathogene Keime, die in den Darm gelangen, benötigen für ihre Persistenz Bindungsstellen am Schleimhautepithel und Nährstoffe. Die riesige Menge bereits vorhandener Darmbakterien stellt für diese Keime eine natürliche Konkurrenz um diese Ressourcen dar. Diesen, durch natürliche Konkurrenz zwischen physiologischer Darmflora und pathogenen Keimen vermittelten Schutzmechanismus bezeichnet man als „Kolonisierungsresistenz“. Am Beispiel eines adhärenten invasiven *Escherichia coli* (AIEC) wurde gezeigt, dass bei vorheriger Inkubation oder Koinkubation mit dem probiotischen *E.coli* Nissle 1917 die Adhäsion an und Invasion in Darmepithelzellen verringert oder verhindert wurde [11]. Ein weiteres eindrückliches Beispiel, das die Bedeutung dieses Schutzmechanismus hervorhebt, ist das Bakterium *Clostridium difficile*: Wird die residente Darmflora im Rahmen einer Antibiotikatherapie (v.a. durch Clindamycin) vermindert, kann es zur unkontrollierten Vermehrung dieses Keimes kommen. *C. difficile* produziert zwei Toxine (Toxin A und B), die Zytokine und dadurch die Einwanderung von PMNs (polymorphonuclear leukocyte) aktivieren. Dadurch werden die Epithelzellen geschädigt, was zum Bild der antibiotikainduzierten „pseudomembranösen Colitis“ führt [12].

Stabilisierung der Barrierefunktion der Schleimhaut

Probiotische Bakterien und ihre synthetisierten Proteine können auch direkt die Funktion des Darmepithels modulieren, indem sie durch eine gesteigerte Barrierekapazität die Dichtigkeit der Mucosa erhöhen. Dies trägt zum Schutz vor pathogenen Erregern bei. Lu et al. zeigten, dass probiotische Organismen über eine Signalkaskade die tight junctions zwischen den Darmepithelien verstärken, so dass der parazelluläre Transport von Antigenen eingeschränkt wird [13]. Otte et al. infizierten Darmepithelzellen mit dem pathogenen Stamm *Salmonella dublin* und der probiotischen Zubereitung VSL#3, die verschiedene Spezies der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* sowie *Streptococcus* enthält, und fanden eine Verringerung des Zytoskelettumbaus der Zellen, was letztlich zu einer Stabilisierung der Epithelbarriere führte [14].

Sekretion antimikrobieller Substanzen

Viele Bakterien produzieren Substanzen mit antimikrobieller Wirkung, die konkurrierende Spezies in ihrer Ausbreitung hemmen und somit dem jeweiligen Keim einen Vorteil bei der Sicherung seines Habitats verschaffen können. Dazu zählen metabolische Substanzen wie z.B. organische Säuren, Fettsäuren, Hydrogenperoxid und Diacetyl, die von Milchsäurebakterien produziert werden, sowie Bakteriozine, von Bakterien gebildete, antibiotisch wirkende Proteine, wovon bei der Anwendung hauptsächlich Nisin eine relevante Rolle spielt [10].

Von Goetz et al. wurde der bakteriostatische Effekt von NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) einem Protein der Lipocalin Familie auf das Wachstum von *E. coli* unter eisenlimitierten Bedingungen untersucht. NGAL ist ein Akute-Phase-Protein und wird von Neutrophilen bei Infektionen oder Entzündung freigesetzt. Die Serum-Konzentration kann zur Unterscheidung zwischen bakteriellen und anderen Infektionen eingesetzt werden. NGAL bindet bakterielle Eisen-Siderophore. Siderophore (Eisen-Carrier) sind eisenbindende Stoffe, die von Bakterien gebildet werden. Durch die Bindung wird schwer lösliches Eisen in einen löslichen Komplex überführt, der dann von Bakterien aufgenommen werden kann. Man stellte fest, dass NGAL Siderophore bindet und unter eisenlimitierten Bedingungen bakteriostatisch wirkt [15]. Die Autoren

vermuten, dass NGAL an der Eisen-Depletion der angeborenen Immunität beteiligt ist. Wehkamp et al. stellten fest, dass Darmepithelzellen bei Inkubation mit *E.coli* Nissle 1917 und weiteren probiotischen Bakterien vermehrt ein antimikrobielles Peptid, humanes β-Defensin-2 (hBD-2), produzieren. Durch dieses Peptid wird die Schleimhautbarriere gegen pathogene Bakterien verbessert. Induziert wird die Sekretion von hBD-2 durch NF-κB (nuclear factor-κB), einem wichtigen Transkriptionsfaktor der inflammatorischen Signalkaskade [16].

Modulation der Immunantwort und der Sekretion inflammatorischer Zytokine

Es konnte vielfach gezeigt werden, dass probiotische Bakterien einen modulierenden Effekt auf das Immunsystem des Darmes und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine besitzen.

Neumann et al. mono-assoziierten keimfreie Mäuse mit *Lactobacillus acidophilus* und stellten nach intravenöser Applikation gramnegativer Bakterien eine verbesserte Phagozytoseleistung der Makrophagen fest [17]. Zudem konnten sie im Vergleich zu keimfreien Mäusen bei den mono-assoziierten Tieren doppelt so viele Kupfersche Sternzellen feststellen.

Auch über eine Modulation von Antikörperkonzentrationen wurde mehrfach berichtet. So beschrieben Perdigon et al. eine erhöhte Produktion von sIgA-sezernierenden Zellen während der Behandlung mit *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* und Joghurt [18]. Matsuzaki et al. injizierten Mäusen intraperitoneal Ovalbumin und verabreichten ihnen anschließend hitzegetötete Bakterien der Spezies *Lactobacillus casei*, um den Einfluss auf die Produktion von Immunglobulin E (IgE) zu messen [19]. Dabei stellte sich heraus, dass *L. casei* die IgE-Produktion im Serum der Mäuse inhibiert.

Vielfach wurde auch die Modulation der Zytokinexpression der Darmepithelien und die Beeinflussung der proinflammatorischen Signalkaskade untersucht [20,21]. Madsen et al. verabreichten Interleukin-10-defizienten Mäusen, die unter SPF-Bedingungen (specific pathogen-free = nur durch apathogene Kommensale besiedelt) eine Colitis entwickeln, die probiotische Zubereitung VSL#3.

Interleukin-10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Interferon-γ (IFN-γ), Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) hemmt. Sie stellten fest, dass die Behandlung mit VSL#3 die Konzentrationen der durch die Darmmukosa sezernierten inflammatorischen Zytokine TNF-α sowie IFN-γ zu reduzieren vermochte. Bei den behandelten IL-10-defizienten Mäusen zeigte sich dabei eine Reduktion von Schleimhautulzera, epithelialen Hyperplasien sowie mononuklearer und neutrophiler Infiltrate der *Lamina propria* [20].

Elewaut et al. untersuchten inflammatorische Signalkaskaden in Epithelzellen des Darmes, die mit enteroinvasiven Bakterien infiziert worden waren, und stellten fest, dass diese über verschiedene Wege immer in einer Aktivierung von NF-κB und dessen Zielgenen resultieren. Sie zeigten NF-κB als einen essentiellen Transkriptionsfaktor, der die Infektion durch enteroinvasive Bakterien mit der entzündlichen Antwort des Epithels verbindet [22]. Auch Kelly et al. zeigten eine Abschwächung der Entzündungsreaktion bei Koinfektion von Caco-2 und HeLa-Zellen (humane Epithelzellen) mit *Salmonella enteritidis* und probiotisch wirkendem *Bacteroides thetaiotaomicron*. Sie beobachteten, dass durch *B. thetaiotaomicron* der Export der Untereinheit RelA von NF-κB aus dem Zellkern über einen PPAR-γ (peroxisom proliferator activates receptor-γ) abhängigen Mechanismus gesteigert wurde. Dies führte zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine [23].

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Ist das Gleichgewicht der OT gestört, so dass Nahrungsantigene und Mikroorganismen nicht mehr immunologisch toleriert werden, kann eine chronische Entzündung des Darmepithels hervorgerufen werden. Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen bezeichnet man den Morbus Crohn (MC) sowie die *Colitis ulcerosa* (CU). Es handelt sich in beiden Fällen um chronisch rezidivierende Erkrankungen, die sich als Schleimhautentzündung des Gastrointestinaltraktes manifestieren. Die Ätiologie ist nicht eindeutig geklärt, in beiden Fällen gilt jedoch eine genetische Prädisposition als gesichert; zudem werden unterschiedliche Umweltfaktoren diskutiert, die zum Ausbruch der

Erkrankungen beitragen können (Ernährung, bisherige Infektionskrankheiten, Zigarettenkonsum bei MC). Als Bindeglied zwischen genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren werden immunologische Dysfunktionen angesehen, was sowohl durch die Assoziation mit HLA-Typen als auch durch das Ansprechen auf immunsuppressive und immunmodulierende Medikamente unterstrichen wird [24, 25, 26].

Pathophysiologisch gelten beide Erkrankungen als überschießende Antwort des intestinalen Immunsystems auf luminal vorhandene Antigene, was hauptsächlich durch die physiologische Darmflora sowie durch eine pathologisch erhöhte Permeabilität der Epithelbarriere im Darm verursacht werden soll [27, 28]. Da die physiologische Darmflora stets vorhanden ist, wird postuliert, dass das Immunsystem des gesunden Darmes in der Lage ist, zwischen residenter, harmloser oder gar nützlicher Darmflora und pathogenen Keimen zu „unterscheiden“. Die immunologischen Prozesse im Darm stellen somit einen Balanceakt zwischen einerseits kontrolliert ablaufender Antwort auf die residente Flora und entzündlicher Antwort auf pathogene Keime andererseits dar. In diesem Zusammenhang wird auch vom Zustand einer „kontrollierten Entzündung“ gesprochen [29]. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist dieses Gleichgewicht nicht mehr vorhanden, der Darm unterhält durch eine überschießende Immunreaktion auf die Vielzahl vorhandener Antigene ein chronisches Entzündungsgeschehen.

Morbus Crohn kann den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen. Typisch ist dabei ein segmentaler Befall, wobei häufig das terminale Ileum betroffen ist (*Ileitis terminalis*). Die transmurale Entzündung kann zu den typischen Erscheinungen wie Aphten, verkäsenden Granulomen und Fisteln führen.

Das Entzündungsgeschehen und die morphologischen Veränderungen bei *Colitis ulcerosa* sind kontinuierlich und auf das Kolon begrenzt; typischerweise beginnt die Erkrankung distal und breitet sich nach proximal aus, wobei gelegentlich auch das terminale Ileum betroffen sein kann. Die Entzündung beschränkt sich hierbei auf *Tunica mucosa* sowie *Tela submucosa*, wobei Kryptenabszesse, Verformung der Schleimdrüsen und der Verlust von

Becherzellen als typische histologische Merkmale gelten. *Colitis ulcerosa* gilt zudem als Präkanzerose und ist mit einem gehäuften Auftreten von Kolonkarzinomen bei den Betroffenen assoziiert [24].

1.3.1 Behandlung von Colitis ulcerosa

Wie bereits beschrieben nimmt man an, dass die physiologische Darmflora bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Deshalb besteht die Hypothese, dass man durch den Gebrauch probiotischer Produkte bei diesen Krankheiten eine Veränderung der bakteriellen Besiedelung des Darmes erzielen kann. Dieser Sachverhalt wurde in mehreren randomisierten, kontrollierten und doppelblinden Patientenstudien untersucht. Cui et al. verabreichten 30 Patienten zusätzlich zur Standardtherapie bei CU mit Sulphasalazin und Glucocortikoiden viable Bifidobakterien oder Placebos. Sie stellten nach acht Wochen Behandlung fest, dass nur 20% der mit Bifidobakterien behandelten Patienten in dieser Zeit einen Rückfall erlitten hatten, im Gegensatz zu 93% in der Kontrollgruppe. Die fäkale Bifidobakterienkonzentration war signifikant höher als in der Kontrollgruppe und die NF-κB-Aktivität in der Bifidobakterien-Gruppe signifikant erniedrigt. Dadurch war die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α und Interleukin-1α (IL-1α), vermindert und die von antiinflammatorischen, wie IL-10, erhöht [30]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Furrie et al., die Patienten *Bifidobacterium longum* mit einem Inuli-Oligofruktose Wachstumssubstrat verabreichten. Sie konnten zusätzlich eine direkte Relation zwischen der Schwere der Colitis, der mRNA (messenger ribonucleic acid) Synthese von humanem β-Defensin (hBD) und der histologischen Beurteilung der Patienten feststellen. Da hBD direkt von Epithelzellen produziert wird, kann man über die Menge der mRNA direkte Rückschlüsse auf die Aktivität der CU ziehen. Die mRNA-Menge ist normalerweise bei aktiver CU erhöht, doch konnte hier eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression in der Bifidobakterien-Gruppe festgestellt werden [31]. Eine geringere Rückfallrate konnten mehrere Forschungsgruppen auch bei Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 und dem probiotischen Gemisch VSL#3 zusätzlich zur Standardtherapie beobachten [32,33]. Rembacken et al.

stellten der Remissionserhaltung mit Mesalazin einer Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 über zwölf Monate gegenüber, wobei sich beide Therapien als gleichwertig herausstellten [34].

1.3.2 Weitere Einsatzmöglichkeiten für probiotische Bakterien

Bisher werden probiotische Bakterien erfolgreich in der Behandlung von Laktoseintoleranz, antibiotika-assoziierter Diarrhoe, wiederholtem Auftreten von *Clostridium difficile*-induzierter Diarrhoe und zur Verkürzung der Erkrankungsdauer Rotavirus-induzierter Diarrhoen bei Kindern eingesetzt. Im Fall der Laktoseintoleranz wurde gezeigt, das Joghurt im Vergleich zu Milch zu einer besseren Verdauung führt und die Diarrhoe vermindert. Dies wird hauptsächlich durch die Laktase der Joghurtbakterien und die langsamere Darmpassage durch Joghurt im Vergleich mit Milch verursacht [35,36,37]. Im Falle der antibiotika-assoziierten und *C. difficile*-induzierten Diarrhoe wurde durch *Saccharomyces boulardii* das Risiko einer Diarrhoe verringert und die Dauer verkürzt [38]. Im Falle der Rotavirus-induzierten Diarrhoe bei Kindern wurde ebenfalls eine Reduktion der Dauer und der Häufigkeit der Diarrhoe bei Behandlung der Kinder mit *Lactobacillus* beobachtet [39,38]. Es wird deutlich, dass hierbei hauptsächlich Milchsäurebakterien eingesetzt werden, im Besonderen *Lactobacilli*, auf die im folgenden Absatz näher eingegangen werden soll.

1.3.3 Lactobacilli

Lactobacilli stellen eine der Hauptkomponenten der physiologischen menschlichen Flora dar. Man findet sie hauptsächlich im weiblichen Genitaltrakt, der Mundhöhle und dem Dick- und Dünndarm [40,41]. In vielen Studien wurde gezeigt, dass *Lactobacilli* protektive Eigenschaften bei Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen aufweisen. Ein Beispiel hierfür sind Studien mit *Lactobacillus GG*, in denen dieser Stamm die Dauer und Häufigkeit von Diarrhoe bei Kindern oder die Dauer einer pseudomembranöser Kolitis verringert [42,43]. Erst kürzlich stellten Zhang et al. fest, dass *Lactobacillus GG* die NF-κB-Signalkaskade beeinflusst und dadurch die TNF-α-induzierte Interleukin-8 (IL-8) Produktion herunterreguliert [44]. Außerdem wurde in

verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass protektive kommensale Bakterien die Wirkung von pathogenen Erregern abschwächen. *L. casei* Stamm Shirota unterdrückt bei kontinuierlicher Fütterung die Kolonisierung junger Hasen mit enterohämorrhagischem *E. coli* (EHEC) [45]. An Mäusen wurde gezeigt, dass *L. casei* und *L. acidophilus* die Invasion mit der Nahrung aufgenommener *Shigella sonnei* in Leber und Milz inhibieren. Die Überlebenschancen der Mäuse wurden dadurch verbessert [46]. *Lactobacilli* können auch chronische Entzündungsreaktionen positiv beeinflussen. Am Beispiel des DSS-Maus-Modells (dextran sulfate sodium) für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurde gezeigt, dass *L. casei* Stamm *Shirota* einen antiinflammatorischen protektiven Effekt auf die Mäuse hat, indem der *Lactobacillus* proinflammatorische Zytokine herunterreguliert [47]. Der bakterielle Faktor, der für die antiinflammatorischen Vorgänge verantwortlich sein könnte, ist noch immer unklar.

1.4 Das der Arbeit zugrundeliegende in-vitro-Modell

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, welcher Faktor kommensaler Bakterienstämme, und im Besonderen von L. fermentum, die durch *Yersinia enterocolitica* pYV^- vermittelte proinflammatorische Reaktion humaner epithelialer Zellen inhibiert. Als Modell wurde die durch den Transkriptionsfaktor NF-κB regulierte Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 gewählt. Ein Modell für die Induktion von IL-8 stellt die Infektion epithelialer Zellen (HeLa-Zellen) mit *Yersinia enterocolitica* pYV^- dar. Das Virulenz-Plasmid (pYV) von *Yersinia* unterdrückt die Expression der Mehrzahl der Gene, die durch chromosomale Faktoren wie das Membranprotein Invasin und YopP (*Yersinia* outer protein) induziert werden. Bei der hier verwendeten Mutante *Yersinia enterocolitica* WA-C (pYV^-) kann infolge des fehlenden Plasmids die Invasin induzierte Expression von NF-κB untersucht werden [48]. Invasin induziert in Epithelzellen eine inflammatorische Signalkaskade, die zur Aktivierung von NF-κB und schließlich zur Produktion von IL-8 und anderen proinflammatorischen Zytokinen führt. Die hieran beteiligten molekularen Mechanismen sind bereits gut beschrieben [49,50,51]. IL-8 ist ein hoch wirksames Interleukin, das zur CXC

Chemokin-Familie gehört und die wichtigste Funktion von IL-8 besteht darin, polymorphkernigen Leukozyten anzulocken und zu aktivieren. Es wird durch verschiedene Entzündungsstimuli wie IL-1, TNF-α und Bakterien durch Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und Gewebezellen induziert [52]. Die zentrale Rolle von IL-8 bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion im Darmmilieu konnte in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden [53,54].

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss kommensaler Bakterienstämme auf die Induktion des proinflammatorischen Mediators IL-8 durch *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ in humanen Epithelzellen zu untersuchen. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Bakterienstämme die Invasin induzierte IL-8 Produktion hemmen konnten, wobei sie weder Adhäsion an noch Invasion der *Yersinia* in die Epithelzellen modulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher bakterielle Faktor durch Hemmung der IL-8 Produktion das antiinflammatorisches Potential vermittelt. Dabei wurde untersucht, ob sezernierte bakterielle Faktoren oder membranständige Faktoren eine Rolle spielen. Am Beispiel von *L. fermentum* wurde die antiinflammatorische Komponente auf eine Substanzklasse eingegrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass ein von *L. fermentum* sezerniertes Phospholipid die *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion inhibiert. Diese Untersuchungen können zu einem Verständnis der Modulation inflammatorischer intestinaler Reaktionen durch „probiotische“ Bakterien führen und neue therapeutische Strategien bei der Behandlung von gastrointestinalen inflammatorischen Prozessen aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobier-Beutel	Oxoid, Hants, UK
Anaerobier-Topf	E. Merck, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer (Columbus Wascher)	Tecan, Crailsheim
Heizblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Carl Zeiss, Jena
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
pH-Meter: Modell inoLab® Level 2	WTW, Weilheim i. OB
Photometer Ultrospec 3000 pro	AmershamPharmacia, Freiburg
Pipettier-Hilfen	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen
Steril-Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge, Festwinkel-Rotor- (Biofuge Stratos)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Ausschwingrotor- (Multifuge 3 S-R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Vakuum, Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Ampuwa, steriles Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Deckgläser, 12 mm Durchmesser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ELISA-Platten (Nunc-Immuno^{TM} Plate Maxisorp^{TM} Surface)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filter, Amicon Ultra 5, 10 MWCO	Millipore, Bedford, USA
Filter, Centricon Plus-80, 10 MWCO	Millipore, Bedford, USA
Filter, Minisart - 0,45µm	Sartorius, Vivascience AG, Hannover
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Impfschlingen 10µl	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen, Microlance 3, 20G, 0,9 x 40	Becton-Dickison S.A., Fraga, Spanien
Küvetten (einmal)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden)	Greiner, Nürtingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Pipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Rundboden-Röhrchen (14 ml)	Falcon/Becton-Dickinson, USA
Spitzboden-Röhrchen (15 ml)	Greiner, Nürtingen
Spitzboden-Röhrchen (50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson, USA
Spritzen, Injekt	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen (80, 175 cm^2)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

2.1.3 Medien und Chemikalien

Antibiotika:

Gentamicin [10 mg/ml]	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin [10.000 units/ml]	Gibco BRL, USA
Bradford-Reagenz	BioRad, München
BSA	Biomol, Hamburg
FeCl3	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco	Biochrom, Berlin
Phospholipase C von Bacillus cereus	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K acryl beads	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Substanz A (Streptavidin)	Dako, Neuss
Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase)	Dako, Neuss
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Tween 20	E. Merck, Darmstadt
Wasser, gefiltert - Millipak 40, 0,22µm	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturmedium, VLE RPMI 1640	Gibco BRL, USA

2.1.4 Antikörper

Purified anti-human IL-8	PharMingen, San Diego, CA, USA
Biotinylated mouse anti-human IL-8	PharMingen, San Diego, CA, USA

2.1.5 Rekombinante Proteine

Rekombinantes humanes IL-8	PharMingen, San Diego, CA, USA

2.1.6 Zelllinien

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

2.1.7 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Yersinia enterocolitica pYV$^-$ (WA-C) (Y. enterocolitica pYV$^-$)	Heesemann [40]

Aus den Fäzes gesunder Erwachsener isolierte und von Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke zur Verfügung gestellte Wildtypstämme: • *Bifidobacterium adolescentis (B. adolescentis)* • *Lactobacillus fermentum (L. fermentum)* • *Streptococcus salivarius (S. salivarius)* • *Bacteroides vulgatus (B. vulgatus)* • *Bacteroides distasonis* (*B. distasonis*)

2.1.8 Medien

Tab. 2.2: HeLa-Zellkulturmedium

VLE RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gln + 1 % Pen-Strep	Bestandteile: 500 ml VLE RPMI 1640 50 ml Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert 5 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 units/ml]

Tab. 2.3: Bakterienkulturmedien

LB (Luria-Bertani)-Medium	Zusammensetzung: 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid Fertigpulver von Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Agar-Platten	Zur Herstellung wurde dem Medium 15g/l Agar hinzugefügt. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.
BHI (brain-heart-infusion)-Medium	Zusammensetzung: 27,5 g/l Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone) 2,0 g/l D(+)-Glucose 5,0 g/l Natriumchlorid 2,5 g/l di-Natriumhydrogen-phosphat Fertigpulver von Fa. Merck, Darmstadt
Agar-Platten	Zur Herstellung wurde dem Medium 15g/l Agar hinzugefügt. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.
CMC (chopped-meat-carbohydrate)-Medium	500 g Rindertartar + 1 l Aqua dest. + 25 ml 1 N NaOH: 1 h bei 100°C kochen, Überstand abnehmen, Fleisch trocknen. Zugabe von: 1 l voll entsalztem H_2O + 30 g Tryptose + 0,3 % Fleischextrakt + 5 g Hefeextrakt + 5 g K_2HPO_4 + 1 ml Rasazurin-Lsg. [1 mg/ml] + 0,5 g Cystein + 10 ml Haemin-Lsg [5 mg/ml]; pH auf 7,0 einstellen Autoklavieren, dann Zugabe von 0,4 % Glucose + 0,1 % Cellobiose + 0,1 % Maltose + 0,1 % Stärke + 0,1 ml Vitamin-K1 [10 mg/ml] Fleischstückchen werden in Glaskolben aliquotiert, Zugabe der zubereiteten Brühe 2 h in Autoklav

CIN- (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)-Agar-Platten	Agar-Basis: - 20,0 g/l Spezial-pepton - 2,0 g/l Hefeextrakt - 20,0 g/l Mannit - 2,0 g/l Natriumpyruvat - 1,0 g/l Natriumchlorid - 0,01 g/l Magnesiumsulfat - 0,5 g/l Natriumdesoxycholat - 0,03 g/l Neutralrot - 0,001 g/l Kristall-violett - 1,25 g/l Agar pH 7,4 +/- 0,2 *Yersinia*-Selektiv-Supplement: nach Herstellerangaben Fertigpulver von Fa. Oxoid, Hants, UK

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tab. 2.4 Puffer und Lösungen für IL-8-ELISA

Adsorptionspuffer	0,1 M Na_2HPO_4, pH 9,0, steril
Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20
Blockingpuffer	PBS + 10 % FKS
Detektionspuffer	PBS + 10 % FKS + 0,05 % Tween 20
Konjugat	5 µl Substanz A (Streptavidin) 5 µl Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) 490 µl PBS Mischen, 30 min inkubieren und mit PBS auf ein Volumen von 25 ml auffüllen
Substratpuffer	0,05 M Na_2CO_3 0,05 M $NaHCO_3$ 1 mM $MgCl_2$

	pH 9,8
Entwicklerlösung	1 mg PNPP (P-Nitropenyl-Phosphat) pro ml Substratpufferlösung

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkulturen

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien für Infektionsversuche

Zu den verwendeten Bakterienstämmen siehe Tab. 2.1.

Für *Y. enterocolitica* pYV$^-$ (aerobe) wurde am Tag vor der geplanten Infektion eine Flüssigkultur in 5ml LB-Medium angelegt. Diese wurde über Nacht bei 27°C inkubiert. Am Infektionstag wurden die Bakterien subkultiviert, um sie in die Phase des exponentiellen Wachstums zu überführen.

Die Kulturen der anaeroben und mikroaerophilen Keime wurden über 48h in BHI- oder CMC-Flüssig-Medium unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Aus diesen Kulturen wurden hitzegetötete Bakterien (s. 2.2.1.2) oder Überstände (s. 2.2.1.3) hergestellt.

Am Infektionstag wurden die Yersinien mit PBS gewaschen. Die Bakterienkonzentration wurde durch die optische Dichte bestimmt, wobei eine OD_{600nm} von 1 einer Konzentration von ~ $5x10^8$ Bakterien pro ml entspricht. Die Überstände wurden immer frisch am Infektionstag hergestellt.

HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und hitzegetöteten Bakterien in der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*), bzw. den Überständen im gewünschten Prozentsatz, infiziert. Die MOI wurde durch serielles Ausplattieren auf ihre Richtigkeit hin kontrolliert.

Alle Arbeiten mit den Bakterien wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.1.2 Herstellung von hitzegetöteten Bakterien (heat-kill)

Zur Herstellung von hitzegetöteten Bakterien wurden die Bakterienkulturen mit PBS gewaschen.

Zur Errechnung der Proteinkonzentration, wie unten beschrieben, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Die übrige Suspension wurde bei 80°C für 10 Minuten ins Wasserbad gestellt und anschließend bei –20°C eingefroren. Um sicherzustellen, dass alle Bakterien abgetötet sind, wurden die hitzegetöteten Bakterien auf der

entsprechenden Platte ausplattiert und für 3-5 Tage unter den entsprechenden Bedingungen bebrütet.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die colorimetrische Methode nach Bradford herangezogen, die auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine im sauren Milieu und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm auf 595nm beruht. Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Das Farbreagenz besteht aus dem Farbstoff, Phosphorsäure und Methanol.

Zur Erstellung der Standardkurve wurde BSA als Referenzwert in verschiedenen Konzentrationen (1,25 – 80µg/ml) verwendet, welches zuvor in Millipore-Wasser verdünnt worden war. Die Proben wurden mit Millipore-Wasser 1:50 und 1:100 verdünnt eingesetzt und alles bei 595nm im ELISA-reader gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit der CFU (colony forming union) verrechnet, wobei $5x10^4$ Bakterien einer MOI von 1 entsprechen (entsprechend der Anzahl der eingesetzten HeLa-Zellen pro well).

2.2.1.3 Herstellung von Überständen

10ml der anaeroben und mikroaerophilen Bakterien wurden gewaschen und im Zellkulturmedium ohne Antibiotikum für weitere 72h anaerob bebrütet. Vor der Infektion wurde die Suspension bei 4000rpm für 10min zentrifugiert und die Überstände steril filtriert (0,45µm Porengröße).

2.2.1.3.1 Extraktion der hydrophoben Phase

Den filtrierten Überständen wurden im Verhältnis 1:1 ein Chloroform/Methanolgemisch (2:1) zugesetzt und 3x5min geschüttelt. Dazwischen wurde 5-10min inkubiert, um eine Trennung der Phasen zu erreichen.

Das Gemisch wurde zentrifugiert und die hydrophobe Phase abgenommen.

Um das Chloroform/Methanolgemisch wieder zu entfernen, wurde die hydrophobe Fraktion in einer Vakuum-Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend

wurde das entstandene Pellet wieder in das Zellkulturmedium aufgenommen und zur Stimulation von HeLa-Zellen verwendet.

2.2.1.3.2 Proteinase K acryl beads

Proteinase K ist eine Serin-Protease, die die Hydrolyse von Peptidketten katalysiert. Das Enzym wird durch Acryl-Kugeln, die eine inaktive Grundsubstanz darstellen, unlöslich gemacht, während die Aktivität des ursprünglichen Enzyms beibehalten wird. Zum Beenden der Reaktion kann das Reaktionsgemisch gefiltert oder zentrifugiert werden, wodurch die Proteinase K acryl beads wieder aus dem Überstand entfernt werden können.
Proteinase K acryl beads wurden 2h in sterilem endotoxinfreien Wasser bei 4°C quellen gelassen. Nach mehrmaligem Waschen und Zentrifugieren wurden 0,5 units Proteinase K pro ml Überstand (138mg beads) zugegeben und das Gemisch für 1h bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde der Überstand zur Stimulation von HeLa-Zellen eingesetzt.

2.2.1.3.3 Eisenchlorid ($FeCl_3$)

Eisenchlorid wird zur Absättigung von Siderophore (Eisen-Carrier) verwendet, die von Bakterien sezerniert werden können. Siderophore sind eisenbindende Stoffe, durch die schwer lösliches Eisen in einen löslichen Komplex überführt werden kann, der dann von Bakterien aufgenommen werden kann.
Steril gefilterte Überstände wurden mit 1 / 10 / 100µmol/ml $FeCl_3$ versetzt und für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand zur Stimulation von HeLa-Zellen eingesetzt.

2.2.1.3.4 Filtrieren (dialysieren)

Steril gefilterte Überstände wurden in einen Filter mit Filtrationseinheiten von 5 bzw. 10kDa gegeben und laut Hersteller zentrifugiert (3500g, 15min, 4°C).

Anschließend wurde die Einheit über Kopf rückzentrifugiert (1000g, 3min, 4°C), wobei Überstände mit Molekülen größer und kleiner 5 bzw. 10kDa resultierten. Das Filtrat wurde bei Bedarf verdünnt und zur Stimulation von HeLa-Zellen eingesetzt.

2.2.1.3.5 Phospholipase C

Phospholipase C ist ein intrazelluläres Enzym, welches Glycerophospholipide wie z.B. Phosohatidylcholin oder Phosphatidylinositoldiphosphat hydrolysiert. Steril gefilterte Überstände wurden mit 1mg Phospholipase C pro ml versetzt und für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand zur Stimulation von HeLa-Zellen eingesetzt.

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Für alle Experimente wurden Zellen der Linie HeLa 229 verwendet. Dies sind für Forschungszwecke eingesetzte Epithelzellen eines Zervixkarzinoms.
Die Zellen wurden hierfür in 175-cm^2-Zellkulturflaschen überführt, als Nährmedium wurden 30ml VLE RPMI 1640 hinzugegeben, welches zusätzlich 10% fetales Kälberserum, 1% L-Glutamin sowie 1% Penicillin-/Streptomycin-Mischung enthielt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert bis ein konfluenter Zellrasen auf dem Flaschenboden entstand. Nach Absaugen des Mediums sowie Waschen des Zellrasens mit PBS wurde Trypsin/EDTA hinzugegeben, welches durch ca. zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Adhäsionsproteine der Zelloberflächen spaltet und somit die Zellen in Lösung überführt. Das Trypsin/EDTA wurde anschließend durch Zugabe des Zellkulturmediums neutralisiert. Die Zellen wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 400g und 21°C von dem Zellmedium getrennt. Diese Zellen wurden je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen überführt und weiterkultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl lebender Zellen pro ml der verwendeten Suspensionen zu bestimmen, wurde die Zellpopulation einer Zellkulturflasche geerntet. Nach Zentrifugation sowie Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in das Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde mit Trypan-Blau eine 1:10-Verdünnung hergestellt und mit einer Neubauer-Kammer (Kammerfaktor $1x10^4$ Zellen/ml) ausgezählt. Die nicht blau gefärbten (= lebenden) Zellen in einem Großquadrat (= 4x16 Kleinquadrate) wurden ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt. Dieses wurde mit dem Kammer- sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl pro ml Lösung zu bestimmen.

2.2.2.3 Aussaat von HeLa-Zellen für Infektionsversuche

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen geerntet und ausgezählt. Anschließend wurde in 24-well-Platten 1ml Zellsuspension pro well mit einer absoluten Zahl von $5x10^4$ Zellen ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden dann bis zum folgenden Tag der Infektion im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

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

Am Infektionstag wurden die HeLa-Zellen in den 24-well-Platten vor der Infektion mit PBS gewaschen, und 1ml frisches, antibiotikafreies Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden mit dem Bakterienstamm *Yersinia enterocolitica* pYV^-, der ein hohes Induktionspotential für Interleukin-8 besitzt, und hitzegetöteten Bakterien in der gewünschten MOI bzw. Überstände in dem gewünschten Prozentsatz kultiviert. Als Positivkontrolle diente *Yersinia enterocolitica* pYV^- (MOI 20), als Negativkontrolle Zellkulturmedium. Zur Überprüfung der Viabilität der HeLa-Zellen wurde zusätzlich Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) eingesetzt, ein proinflammatorisches Zytokin, das als Mediator für Leukozyten fungiert. Es bindet an membranständige zelluläre Rezeptoren und führt über eine Signalkaskade zur Induktion von Genen.

Anschließend wurden die Zellkulturplatten für 2min bei 300g und 21°C zentrifugiert, um einen möglichst sofortigen Kontakt zwischen Bakterien und Zellen zu ermöglichen.
Nach 1h Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, und frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Zur Abtötung eventuell noch an den Zelloberflächen adhärierender *Y. enterocolitica* pYV$^-$ wurde 10µl Gentamicin pro ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Im letzten Schritt wurden die Zellen für weitere 3h im Brutschrank inkubiert, anschließend die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert.

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

2.2.3.1 Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA

Der „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist eine auf Antigen-Antikörper-Reaktion basierende immunologische Methode, mit der man selbst geringste Konzentrationen eines Proteins nachweisen kann. Dabei fungiert das zu messende Molekül als Antigen, welches durch spezifische Antikörper detektiert werden kann.
Im ersten Schritt wird hierzu der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper (capture antibody) beschichtet. Anschließend werden die Zellkulturüberstände mit den zu detektierenden Molekülen hinzugegeben, welche an die Antikörper binden. Im letzten Schritt wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (detection antibody) hinzugegeben, welcher ebenfalls an das zu detektierende Molekül bindet und gleichzeitig eine Farbreaktion katalysiert. Die Intensität der hervorgerufenen Farbreaktion verhält sich hierbei proportional zu der Konzentration des zu messenden Moleküls. Anhand einer Standardkurve, welche mit rekombinanten Zytokinen erstellt wird, kann schließlich die absolute Konzentration ermittelt werden.

2.2.3.2 Ablauf der IL-8-Messung mittels ELISA

Zu den verwendeten Puffern und Lösungen siehe Tab. 2.4.

Zunächst wurde eine ELISA-Platte mit dem monoklonalen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei in jedes well 50µl eines Adsorptionspuffers gegeben wurde, der eine Primärantikörperkonzentration von 3µg/ml in 0,1M Na_2HPO_4 (pH 9,0) enthielt. Am nächsten Tag wurde die Platte nach Waschen mit ELISA-Waschpuffer mit je 200µl Blockingpuffer pro well für 2h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Platte wieder gewaschen und je 100µl der vorher aufgetauten und gemischten Zellkulturüberstände in die wells gegeben. Rekombinantes, humanes IL-8 in verschiedenen Konzentrationen (12,5 – 800pg/ml), welches zuvor in Zellkulturmedium verdünnt worden war, diente hierbei als Referenz zur Erstellung der Standardkurve bei der photometrischen IL-8-Bestimmung. Die ELISA-Platte wurde dann nochmals über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten und letzten Tag wurden nach dem Waschen 100µl des biotinylierten Sekundärantikörpers [0,5µg/ml] in Detektionspuffer in jedes well pipettiert und die Platte für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 50µl Konjugat, welches das P-Nitrophenyl-Phosphat in der Entwicklerlösung umsetzt, in jedes well gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nach einem letzten Waschschritt 50µl Entwicklerlösung in jedes well pipettiert und die Platte für ca. 10min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration mit dem ELISA-Photometer bei 405nm bei einer Referenzwellenlänge von 490nm.

2.2.4 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal reproduziert. Bei den in der Arbeit aufgeführten Daten handelt es sich entweder um Mittelwerte aus drei Einzelversuchen oder um repräsentative Einzelversuche in Dreifachbestimmung. Die Bewertung der Datensignifikanz erfolgte über den

Student-t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte. Eine Differenz zwischen den Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion mittels lebenden kommensalen Bakterien

Im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit prüfte Herr cand. med. Matteo Quitadamo, wie kommensale Bakterien die durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion modulieren. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit kommensalen Bakterien in unterschiedlichen MOIs (2-200) sowie gleichzeitig mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI 20) infiziert. Nach 1h wurden die Zellen gewaschen und adhärente Zellen mittels Zugabe von Gentamicin abgetötet. Nach weiteren 3h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen.

Dies wird repräsentativ am Beispiel von *L. fermentum* dargestellt (s. Abb. 3.1).

Es konnte eine signifikante Reduktion um 50-70% der *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion durch viable kommensale Bakterien beobachtet werden.

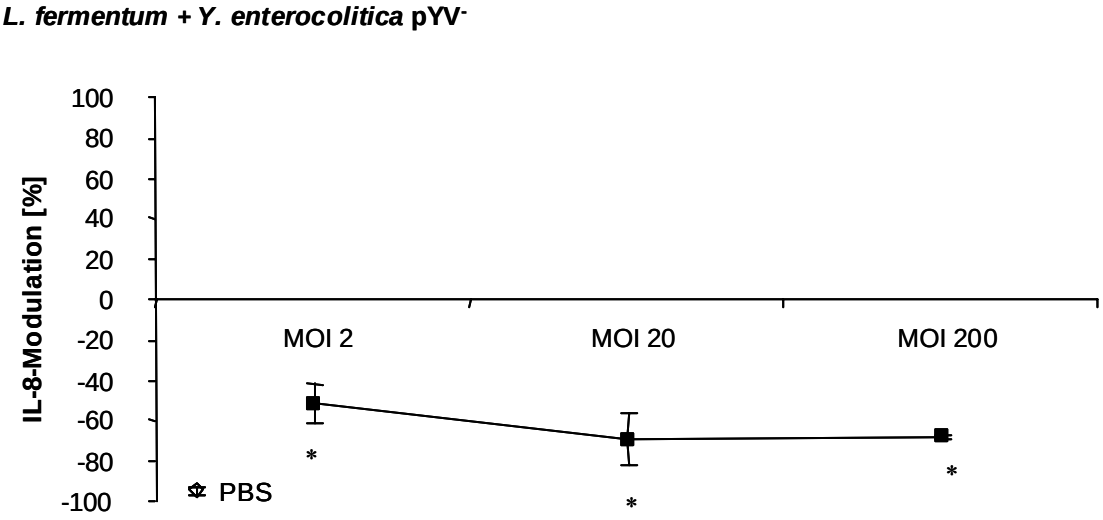


Abb. 3.1: Modulation der *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8 Sekretion; hier: *L. fermentum*

Koinfektion von HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* pYV- (MOI 20) und *L. fermentum* (MOI 2-200). Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach

weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen.
Die Nulllinie repräsentiert das IL-8-Niveau in der Positivkontrolle (= Mono-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV-, MOI 20). Darüber bzw. darunter ist die jeweilige prozentuale Erhöhung bzw. Verminderung der IL-8-Konzentrationen aufgetragen, welche durch Koinfektion mit *L. fermentum* beobachtet wurde. Negativkontrolle: PBS. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird. Die gemessene IL-8-Sekretion ist signifikant niedriger als in der Positivkontrolle (bis zu 70% Reduktion). Dieser Effekt wird bereits bei der niedrigsten MOI (MOI 2) beobachtet und erhöht sich bis MOI 200 nur unwesentlich.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

Dieser Effekt war für alle der hier verwendeten Stämme zu beobachten.

3.2 Hitzeinaktivierte kommensale Bakterien beeinflussen die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion nicht

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein membranständiger oder ein löslicher Faktor kommensaler Bakterien für die Inhibition der IL-8-Sekretion durch *Y. enterocolitica* pYV$^-$ verantwortlich ist. Um membranständige Faktoren zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ (MOI 20) und hitzeinaktivierten kommensalen Bakterien in unterschiedlichen MOI-Stufen von 2 bis 200 infiziert. Dabei konnte man feststellen, dass - mit Ausnahme von *S. salivarius* - hitzegetötete Bakterienstämme die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion nicht mehr reduzieren. Es besteht kein Unterschied zwischen einer Monoinfektion mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und einer Koinfektion mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und hitzeinaktivierten kommensalen Bakterien (s. Abb. 3.2-3.5). Lediglich die Koinfektion von *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und hitzegetötetem *S. salivarius* erniedrigte die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion um über 75% (s. Abb. 3.6).

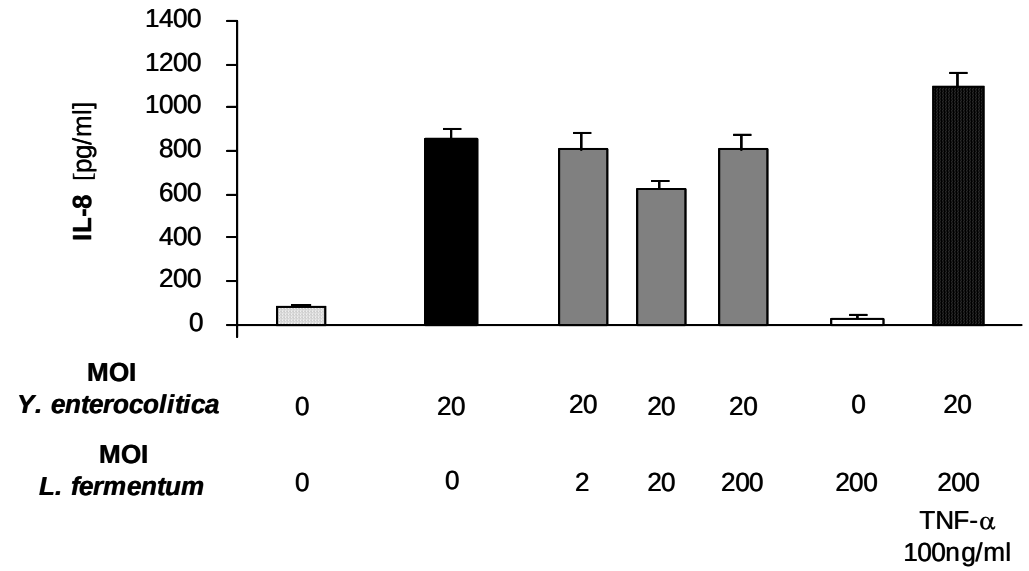


Abb. 3.2: Hitzeinaktivierter *L. fermentum* inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht. *L. fermentum* MOI 2 = 1,62µg/ml; MOI 20 = 16,2µg/ml; MOI 200 = 162µg/ml. Die Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI 20) und hitzegetöteten Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen (MOI 2-200) koinfiziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV⁻. Viabilitätskontrolle der Zellen: TNF-α. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird.

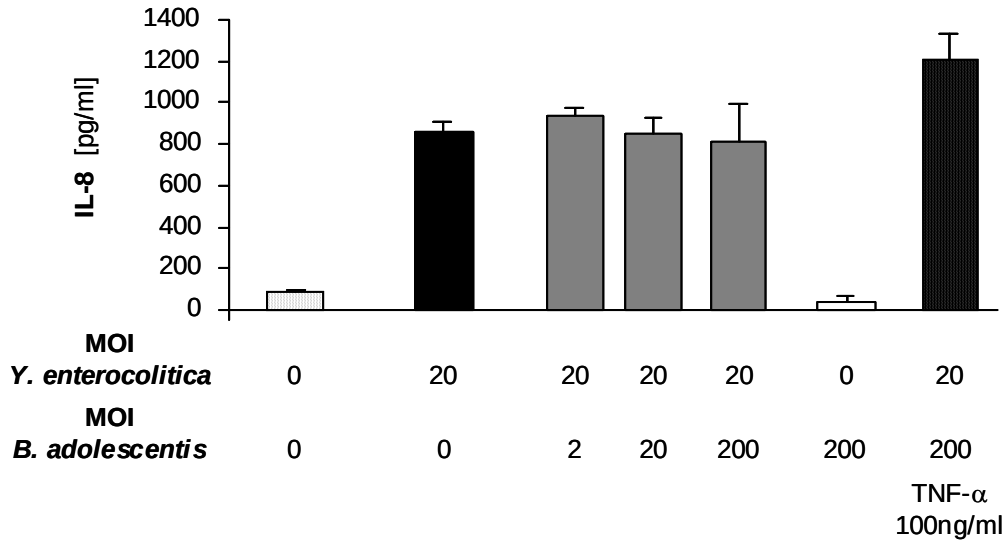


Abb. 3.3: Hitzeinaktivierter *B. adolescentis* inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8 Sekretion nicht; *B. adolescentis* MOI 2 = 0,55µg/ml; MOI 20 = 5,5µg/ml; MOI 200 = 55µg/ml. Weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.2.

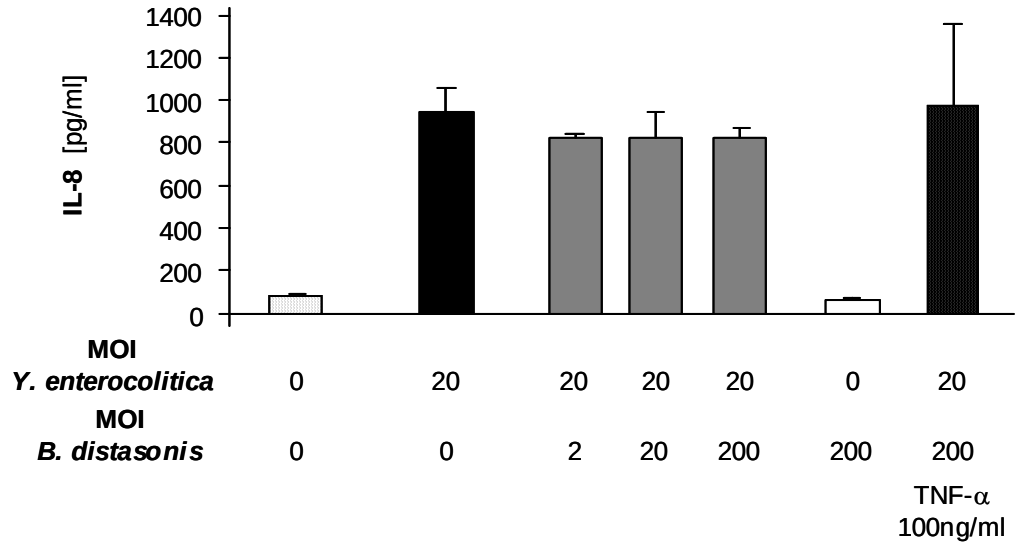


Abb. 3.4: Hitzeinaktivierter *B. distasonis* inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht; *B. distasonis* MOI 2 = 0,25µg/ml; MOI 20 = 2,5µg/ml; MOI 200 = 25µg/ml. Weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.2.

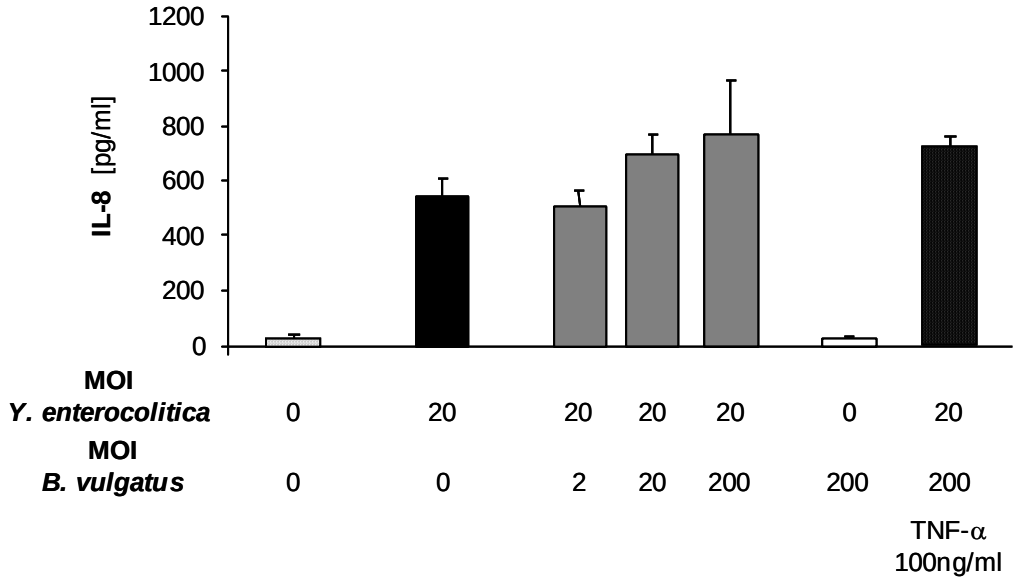


Abb. 3.5: Hitzeinaktivierter *B. vulgatus* inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht; *B. vulgatus* MOI 2 = 6,68µg/ml; MOI 20 = 66,8µg/ml; MOI 200 = 668µg/ml. Weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.2.

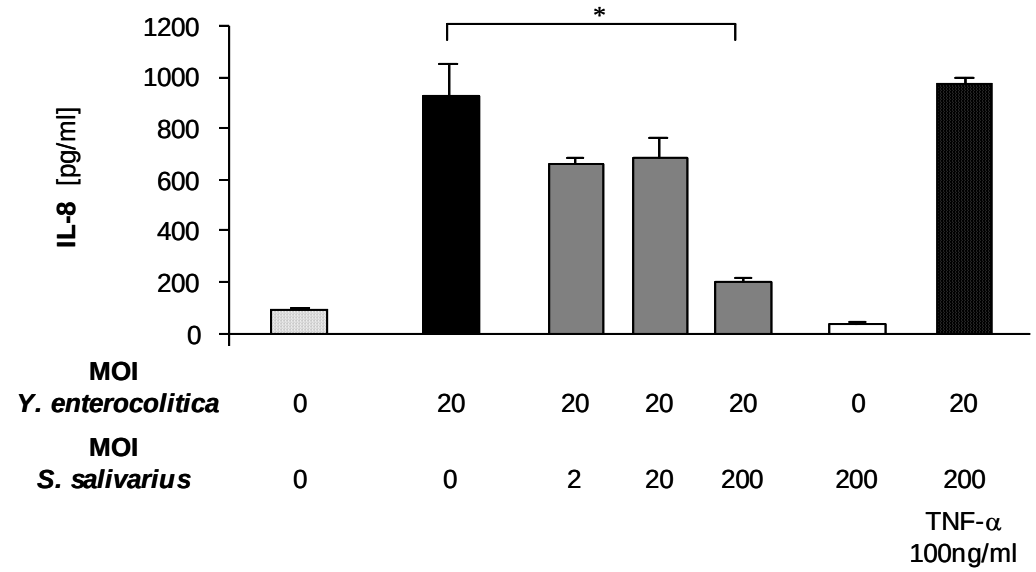


Abb. 3.6: Hitzeinaktivierter *S. salivarius* inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion. *S. salivarius* MOI 2 = 0,48µg/ml; MOI 20 = 4,8µg/ml; MOI 200 = 48µg/ml. HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI 20) und hitzegetötetem *S. salivarius* in unterschiedlichen Konzentrationen (MOI 2-200) koinfiziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV⁻. Viabilitätskontrolle der Zellen: TNF-α. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird. Im Gegensatz zu den anderen kommensalen Bakterienstämmen ist bei Co-Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ und hitzegetötetem *S. salivarius* die IL-8-Sekretion signifikant erniedrigt.

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

3.3 Kulturüberstände kommensaler Bakterien beeinflussen die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion

Um zu untersuchen, ob die Modulation der *Y. enterocolitica* pYV⁻ IL-8-Sekretion durch einen löslichen Faktor ausgelöst wird, wurden HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ und steril filtrierten Kulturüberständen kommensaler Bakterien stimuliert. Im Gegensatz zu den Versuchen mit hitzeinaktivierten Bakterien zeigte sich bei dieser Koinfektion eine Reduktion der *Yersinia* induzierten IL-8-Sekretion um ca. 50% (s. Abb. 3.7-3.10). Deshalb geht man davon aus, dass ein löslicher Faktor für die Verminderung der *Y. enterocolitica*

pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion verantwortlich ist. Das betrifft die Stämme *L. fermentum, B. adolescentis, B. distasonis* und *B. vulgatus*.

Die Koinfektion von *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und dem Kulturüberstand von *S. salivarius* erniedrigte die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion nicht (s. Abb. 3.11). Aufgrund dieser und der vorherigen Ergebnisse (s. Abb. 3.6) mit hitzeinaktiviertem *S. salivarius* könnte bei *S. salivarius* ein anderer Faktor für die Reduktion verantwortlich sein.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Verringerungen der IL-8-Sekretion durch eine verminderte Viabilität der *Y. enterocolitica* pYV$^-$ verursacht wurde, wurde *Y. enterocolitica* pYV$^-$ in den Kulturüberständen der kommensalen Bakterien kultiviert und mittels serieller Verdünnungsreihen die CFU ermittelt. Es konnte keine Reduktion der CFU von *Y. enterocolitica* pYV$^-$ nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Viabilität von *Y. enterocolitica* durch die Kulturüberstände nicht beeinflusst wird (s. Abb. 3.12).

Überdies wurde in den eingesetzten Bakterienüberständen lediglich eine Abweichung der pH-Werte von $\pm$ 1,5 festgestellt. Daher scheint auch ein veränderter pH keinen Einfluss auf die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion zu haben (s. Abb. 3.13).

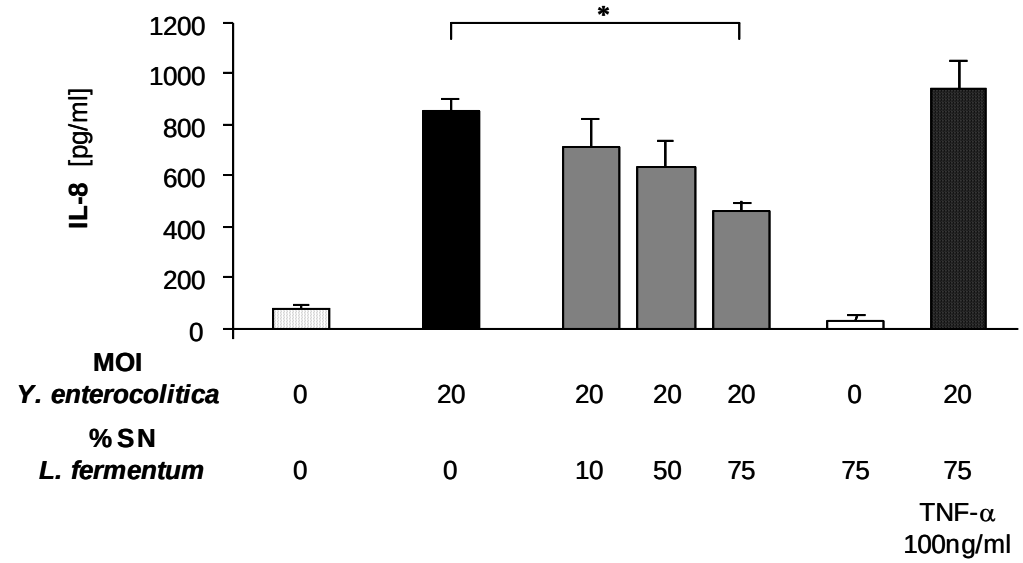


Abb. 3.7: Überstand von *L. fermentum* Kulturen inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion. *L. fermentum* wurde 48h in Zellkulturmedium ohne Antibiotikum unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bebrütet, der Überstand abgenommen und steril filtriert. Die HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ und unterschiedlichen Mengen (10-75%) des Überstandes stimuliert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV⁻. Viabilitätskontrolle der Zellen: TNF-α. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird.

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

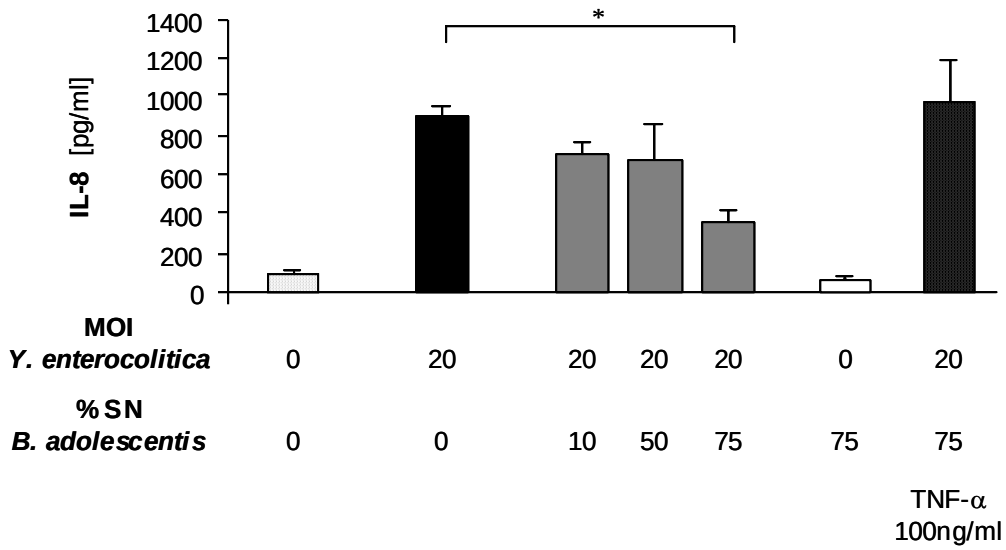


Abb. 3.8: Überstand von *B. adolescentis* Kulturen inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8 Sekretion; weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.7.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

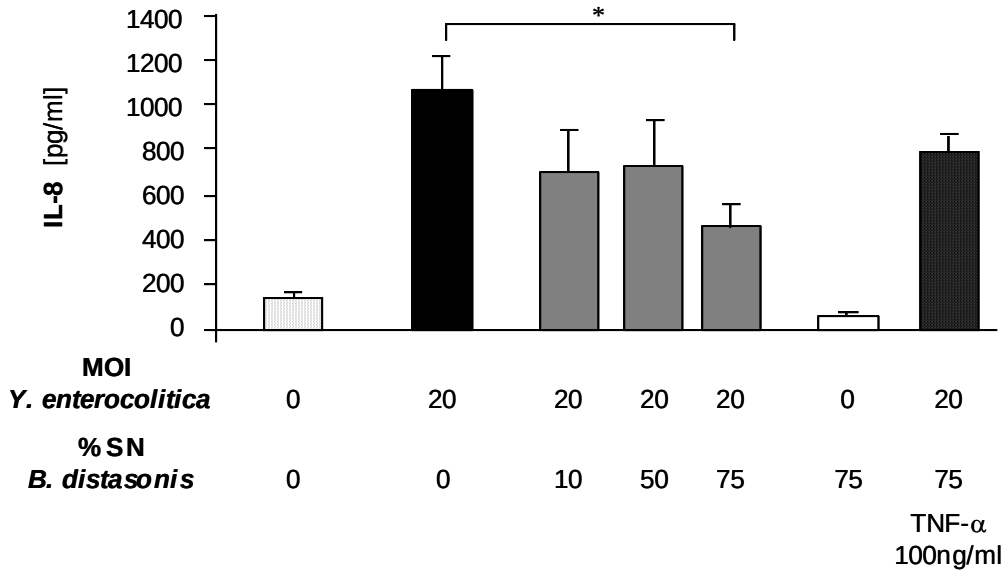


Abb. 3.9: Überstand von *B. distasonis* Kulturen inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8 Sekretion; weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.7.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

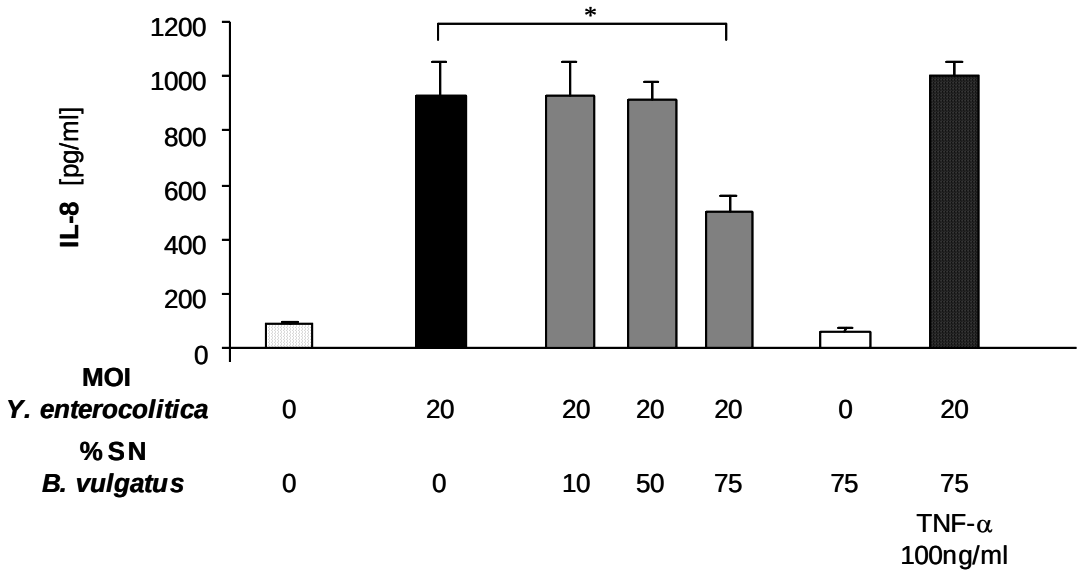


Abb. 3.10: Überstand von *B. vulgatus* Kulturen inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion; weitere Erläuterungen s. Text und Abb. 3.7.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

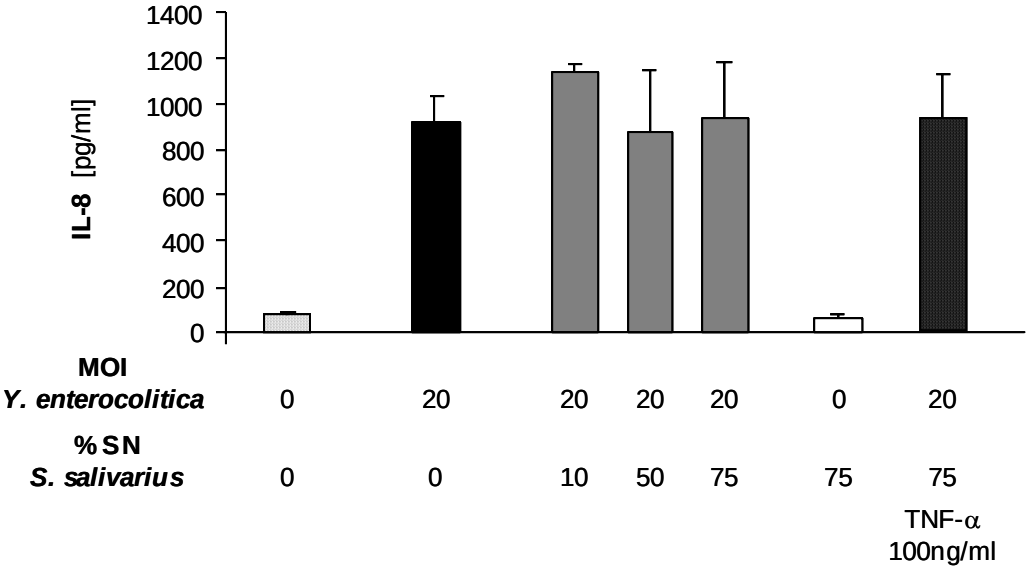


Abb. 3.11: Überstand von *S. salivarius* Kulturen inhibiert die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht; im Gegensatz zu den anderen kommensalen Bakterienstämmen wird die Induktion der *Y. enterocolitica* pYV⁻ Invasin vermittelten IL-8-Sekretion durch Überstand von *S. salivarius* nicht inhibiert.

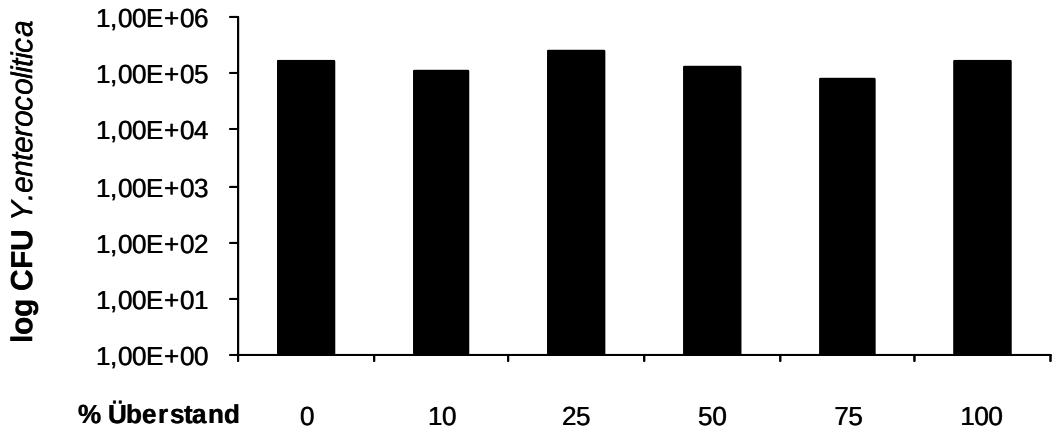


Abb. 3.12: Viable kolonieformende Einheiten von *Y. enterocolitica* pYV⁻ nach Inkubation von 1h im Überstand von *B. adolescentis. Y. enterocolitica* pYV⁻ wurde in den Kulturüberständen von *B. adolescentis* kultiviert und mittels serieller Verdünnungsreihen wurde die CFU ermittelt. Überstände von *B. adolescentis* Kulturen haben keinen Einfluss auf die Viabilität von *Y. enterocolitica* pYV⁻.

pH-Messung in Bakterienüberständen

Bakterienstamm	**pH**
L. fermentum	6,66
B. adolescentis	7,2
B. distasonis	7,2
B. vulgatus	5,57
S. salivarius	5,7

Abb. 3.13: Bestimmung des pH-Wertes in Kulturüberständen. Die kommensalen Bakterienstämme wurden für 48h in Zellkulturmedium bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit dem pH-Meter der pH-Wert der einzelnen Kulturüberstände gemessen. pH-Abweichungen von ± 1,5 haben keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterienstämme.

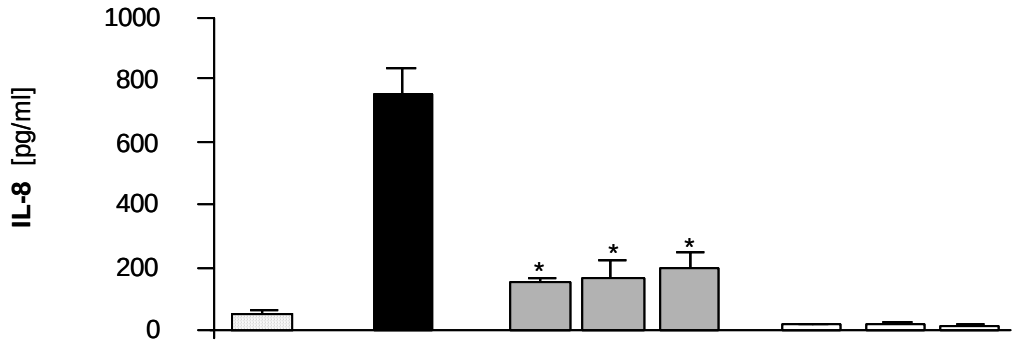
Auf Grund des ähnlichen Verhaltens der Bakterienstämmen *L. fermentum, B. adolescentis, B. distasonis* und *B. vulgatus* beschränken wir uns in den weiteren Versuchen auf *L. fermentum*. Für diesen Stamm soll der antiinflammatorische protektive bakterielle Faktor untersucht und charakterisiert werden.

3.4 Proteinase K oder Eisenchlorid ($FeCl_3$) können den anti-inflammatorischen Effekt der Kulturüberstände kommensaler Bakterien nicht beeinflussen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob Proteine oder Siderophore, die von *L. fermentum* sezerniert werden, die *Y. enterocolitica* pYV^- induzierte IL-8-Sekretion inhibieren.

Siderophore (Eisen-Carrier) sind eisenbindende Stoffe, die von Bakterien gebildet werden. Durch die Bindung wird schwer lösliches Eisen in einen löslichen Komplex überführt, der dann von Bakterien aufgenommen werden kann.

Um mögliche Proteine zu inaktivieren, wurden die Kulturüberstände mit Proteinase K, einer Serin-Protease, die die Hydrolyse von Peptidketten katalysiert, inaktiviert. Zudem wurden die Kulturüberstände mit $FeCl_3$ versetzt, um mögliche Siderophore abzusättigen. Weder der Zusatz von Proteinase K noch von $FeCl_3$ zum Überstand von *L. fermentum* hatte einen Effekt auf die Hemmung der *Y. enterocolitica* pYV^- induzierte IL-8-Sekretion. In beiden Versuchen wurde eine Reduktion der *Y. enterocolitica* pYV^- induzierte IL-8-Sekretion von ca. 75% gefunden, was vergleichbar mit der Reduktion durch unbehandelte Kulturüberstände ist (s. Abb. 3.14 und Abb. 3.7). Auf Grund dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass die Verminderung der *Y. enterocolitica* pYV^- induzierte IL-8-Sekretion nicht durch ein von *L. fermentum* sekretiertes Protein oder Siderophor hervorgerufen wird.



MOI *Y. enterocolitica*	0	20	20	20	20	0	0	0
% SN *L. fermentum*	0	0	75	75	75	75	75	75
Proteinase K	-	-	-	+	-	-	+	-
$FeCl_3$	-	-	-	-	+	-	-	+

Abb. 3.14: Reduktion der *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion durch Zellkulturüberstand von *L. fermentum* wird nicht durch Proteine oder Siderophore ausgelöst. Überstand von *L. fermentum* wurde mit 0,5 units Proteinase K pro ml oder 100µmol $FeCl_3$ versetzt, um Proteine oder Siderophore zu inaktivieren. HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und den vorbehandelten Überständen von *L. fermentum* stimuliert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV$^-$. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird.

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

3.5 Modulation der Y. enterocolitica pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion durch die hydrophobe Phase aus dem Kulturüberstand von *L. fermentum*

Da der antiinflammatorische Effekt des Überstandes von *L. fermentum* nicht durch sezernierte Proteine oder Siderophore hervorgerufen wird, wurde anschließend die hydrophobe Phase des Überstandes von *L. fermentum* untersucht. Diese Phase wurde mittels einer Chloroform / Methanol Extraktion gewonnen. HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und der hydrophoben Fraktion der Überstände von *L. fermentum* infiziert. Dabei konnte man beim Einsatz von 2-5% dieses Überstandes eine Hemmung über 90% der durch *Y. enterocolitica* Invasin induzierten IL-8-Sekretion beobachten (s. Abb. 3.16).

Zur weiteren Eingrenzung des gesuchten bakteriellen Faktors wurden Kulturüberstände von *L. fermentum* mit Phospholipase C behandelt. Phospholipase C hydrolysiert Phosphatketten von Glycerophospholipiden, wobei unter anderem Phosphatidylcholin (Lecithin) und Phosphatidylinositoldiphosphat entsteht. Phospholipide sind Bestandteile der Zellmembran bei Bakterien und höheren Organismen und Bestandteil der Signalübertragung zwischen Hormonen und dem Zellinneren. Außerdem dienen sie der Verankerung von Proteinen in der Membran.

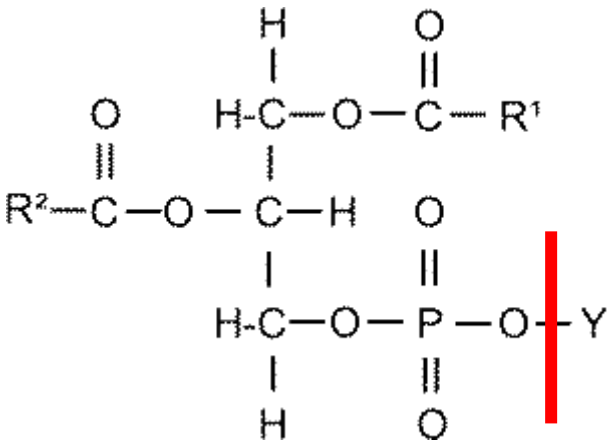


Abb. 3.15: Strukturformel von Phosphoglycerid; Phospholipase C spaltet an markierter Stelle.

Es wurde beobachtet, dass mit Phospholipase C behandelte Kulturüberstände keinen inhibitorischen Effekt auf die Induktion der IL-8-Sekretion durch *Y. enterocolitica* pYV$^-$ zeigen. Deshalb kann man annehmen, dass die Reduktion der durch *Yersinia* induzierten IL-8-Sekretion durch ein Glycerophospholipid vermittelt wird (s. Abb. 3.17).

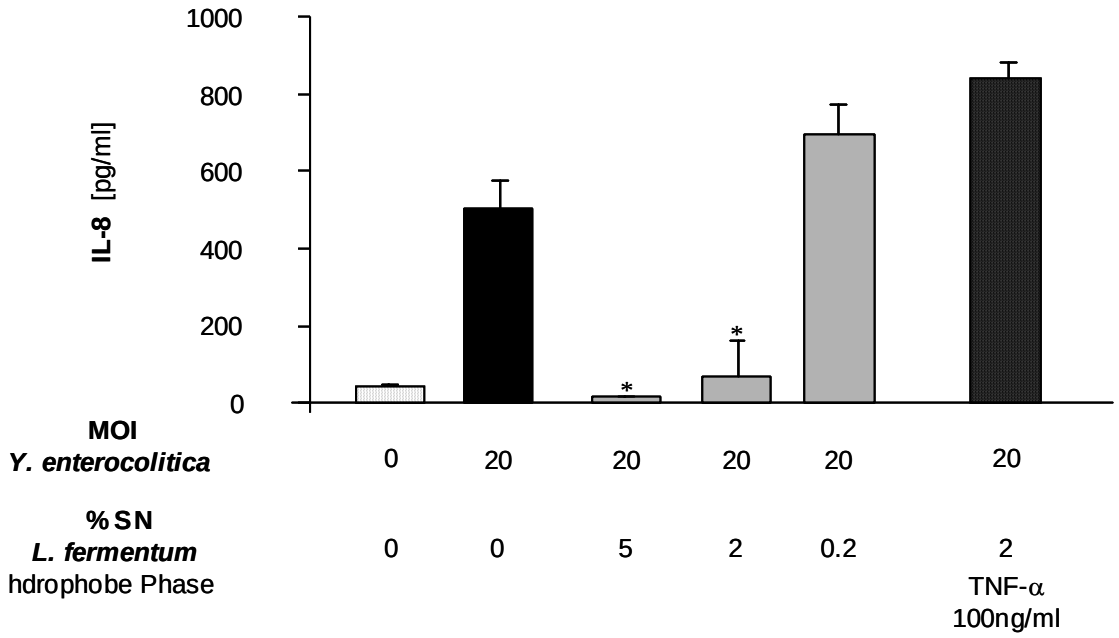


Abb. 3.16: Reduktion der *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion durch die hydrophobe Phase des Kulturüberstandes von *L. fermentum*. Der Kulturüberstand von *L. fermentum* wurde zu gleichen Teilen mit einer Mischung aus Chloroform / Methanol im Verhältnis 2:1 extrahiert. Mit der dabei entstehenden hydrophoben Phase und mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ wurden HeLa-Zellen stimuliert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV$^-$. Viabilitätskontrolle der Zellen: TNF-α. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird. Bei Koinfektion mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und 2% oder 5% der hydrophoben Phase des Überstandes von *L. fermentum* ist die IL-8-Sekretion um 80 bzw. 90% erniedrigt im Bezug auf die Positivkontrolle.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

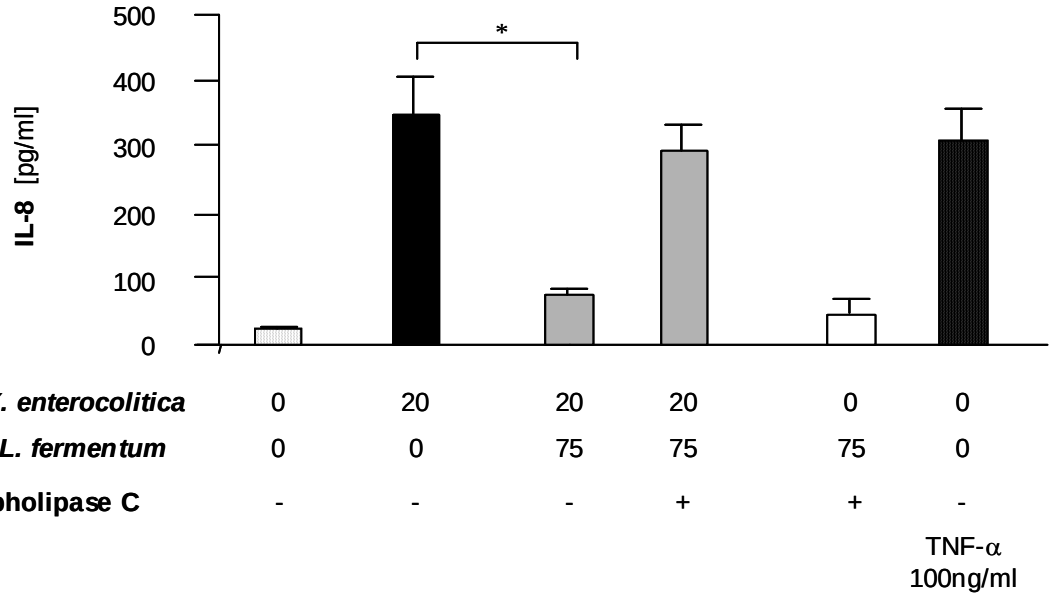


Abb. 3.17: Modulation der *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion mit Kulturüberstand von *L. fermentum* wird durch Phospholipase C aufgehoben. *L. fermentum* Überstand wurde mit Phospholipase C behandelt. HeLa-Zellen wurden damit und gleichzeitig mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ stimuliert. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV⁻. Viabilitätskontrolle der Zellen: TNF-α. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird.
Koinfektion von *Y. enterocolitica* pYV⁻ und 75% Überstand *L. fermentum* mit Phospholipase C hebt die signifikante Reduktion der IL-8-Sekretion wieder auf.
*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle.

3.6 Hemmung der durch *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierten IL-8-Sekretion über ein Glycerophospholipid, das kleiner als 10kDa ist

Zur weiteren Charakterisierung des löslichen Faktors aus dem Kulturüberstand von *L. fermentum*, der die durch Invasin von *Y. enterocolitica* pYV⁻ getriggerte IL-8-Sekretion inhibiert, wurde der Überstand in zwei Phasen getrennt, dessen Moleküle ein Molekulargewicht größer als (>) bzw. kleiner als (<) 10kDa hatten. Der Überstand mit den Molekülen >10kDA beeinflusste die *Y. enterocolitica* pYV⁻ induzierte IL-8-Sekretion nicht, wohingegen der Überstand mit Molekülen

<10kDa dosisabhängig die Induktion der IL-8-Sekretion durch *Y. enterocolitica* pYV$^-$ hemmte.

Im Vergleich zu unbehandeltem *L. fermentum* Kulturüberstand hat dieser mit Molekülen <10kDa eine starke inhibierende Wirkung. Es konnte eine Reduktion der IL-8-Sekretion um 40% beim Einsatz von 25% des filtrierten Überstandes <10kDa und eine Reduktion um über 60% beim Einsatz von 50% beobachtet werden (s. Abb. 3.18).

In Folge dieser Ergebnisse wird angenommen, dass der lösliche Faktor aus dem Kulturüberstand von *L. fermentum*, der für die Hemmung der *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion verantwortlich ist, ein Glycerophospholipid mit einem Molekulargewicht <10kDa ist.

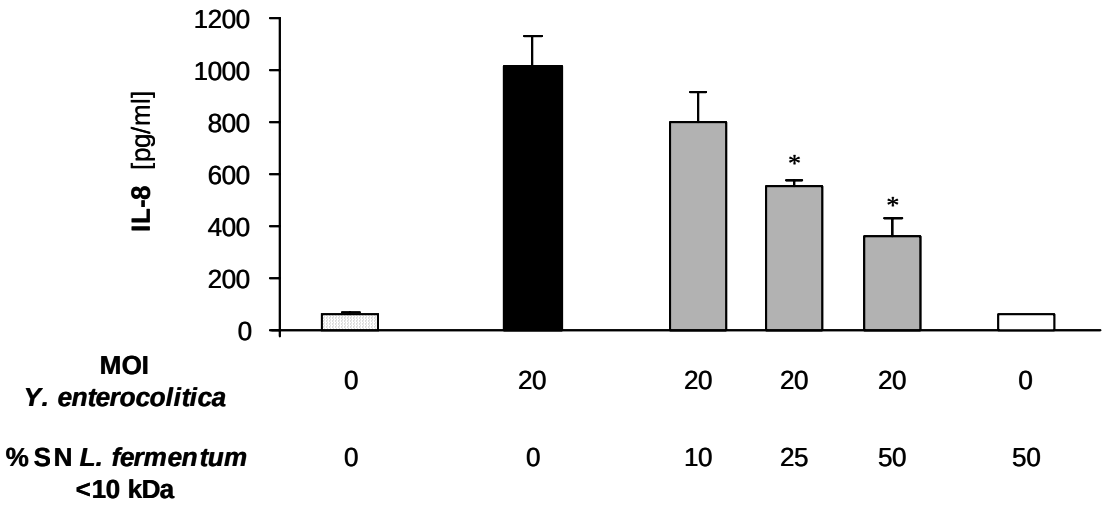


Abb. 3.18: Inhibition der *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion mit Kulturüberstand von *L. fermentum* <10kDa. Überstand von *L. fermentum* wurde dyalisiert. Überstand mit Molekulargewicht <10kDa wurde mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ auf HeLa-Zellen gegeben. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin hinzugefügt. Nach weiteren 3 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Höhe der IL-8-Sekretion mittels ELISA gemessen. Negativkontrolle: Zellkulturmedium. Positivkontrolle: *Y. enterocolitica* pYV$^-$. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung ausgeführt, welche durch die Standardabweichung repräsentiert wird.

Koinfektion mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und 25% oder 50% Überstand *L. fermentum* <10kDa führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Sekretion.

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

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation der *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ induzierten proinflammatorischen Reaktion humaner Epithelzellen durch kommensale Bakterienstämme untersucht. Dabei wurden folgende aus dem Fäzes gesunder Erwachsener isolierte kommensale Bakterienstämme verwendet: (i) *Lactobacillus fermentum*, (ii) *Bifidobacterium adolescentis*, (iii) *Bacteroides vulgatus*, (iv) *Bacteroides distasonis* und (v) *Streptococcus salivarius*. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass diese Stämme die durch *Y. enterocolitica* Invasin induzierte IL-8-Sekretion inhibieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei verschiedenen kommensalen Stämmen unterschiedliche bakterielle Faktoren und Mechanismen die durch eine *Y. enterocolitica* Infektion induzierte inflammatorische Wirtsantwort hemmen können. Bei *L. fermentum*, *B. adolescentis*, *B. vulgatus*, *B. distasonis* scheint das antiinflammatorische bakterielle Potential durch lösliche sezernierte bakterielle Faktoren vermittelt zu werden, während bei *S. salivarius* ein möglicherweise membranständiger Faktor für die Inhibition der *Yersinia enterocolitica* induzierten IL-8-Sekretion verantwortlich ist.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung des bakteriellen Faktors von *L. fermentum*, der das antiinflammatorische Potential dieses kommensalen Bakteriums vermittelt. *Lactobacillus fermentum* Stamm PZ 1162 sezerniert einen löslichen Faktor, der die proinflammatorischen Eigenschaften von *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ beeinflusst. Humane Epithelzellen (HeLa) wurden mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und *L. fermentum* koinfiziert und anhand der Interleukin-8 (IL-8) Sekretion die Modulation der proinflammatorischen Immunantwort bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass *L. fermentum* die *Y. enterocolitica* vermittelte IL-8 Sekretion inhibiert, ohne die Viabilität von *Y. enterocolitica*, die Adhärenz an oder Invasion in Epithelzellen zu beeinflussen. Untersuchungen mit Kulturüberständen von *L. fermentum* und hitzegetötetem *Lactobacillus fermentum* ergaben, dass der antiinflammatorische Effekt von *L.*

fermentum in den Kulturüberständen vorhanden ist, jedoch mit hitzegetötetem *L. fermentum* nicht mehr nachweisbar ist. Dies lässt den Schluss zu, dass der antiinflammatorische Effekt von *L. fermentum* auf einen löslichen im bakteriellen Kulturüberstand vorhandenen Faktor zurückzuführen ist. Um diesen Faktor weiter einzugrenzen wurden die Überstände mittels eines Filtersystems nach Größe separiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Molekül mit dem Molekulargewicht <10kDa handelt. Des Weiteren wurde die Substanzklasse des Faktors mittels Behandlung der Überstände von *L. fermentum* mit proteolytischen und hydrolytischen Enzymen genauer untersucht. Es konnten gezeigt werden, dass die Behandlung der Kulturüberstände von *L. fermentum* mit Phospholipase C zu einer Aufhebung des antiinflammatorischen Effektes führt, während andere Enzyme wie z.B. Proteinase K keinen Einfluss haben. Auf Grund dieser Daten wird postuliert, dass *L. fermentum* die *Y. enterocolitica* pYV^- induzierte IL-8-Sekretion mittels eines sekretierten Phospholipids mit einem Molekulargewicht von <10kDa inhibiert. Diese Daten könnten den Schluss zulassen, dass *L. fermentum* Stamm PZ 1162 einen Faktor sezerniert, der probiotische Eigenschaften besitzt, proinflammatorische gastrointestinale Immunantworten moduliert und somit neue therapeutische Strategien der Behandlung gastrointestinaler entzündlicher Prozesse ermöglichen könnte.

Yersinia enterocolitica ist ein gramnegatives Bakterium der Familie der *Enterobacteriaceae*, dessen chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren Adhäsin YadA und Invasin Adhäsion an und Invasion in Epithelzellen vermitteln. Dies führt über die Aktivierung von NF-κB und p38 zur Sekretion von IL-8 und somit zu einer entzündlichen Reaktion der infizierten Zellen [55]. Pathogene Stämme von *Yersinia* kodieren auf einem Virulenzfaktor pYV mindestens sechs Effektorproteine (Yop = *Yersinia* outer protein). Yops werden über ein Typ III Sekretionssystem in die Zelle injiziert und führen unter anderem zur Inhibition der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8, über eine Hemmung des NF-κB Signalweges. Dies ermöglicht *Yersinia* die extrazelluläre Persistenz und Vermehrung im Lymphgewebe [56,57,58,59]. Dem hier verwendeten Yersinien-

Stamm WA-C (pYV$^-$) fehlt das Plasmid. Deshalb induziert er bei einer Infektion von HeLa-Zellen IL-8 [60]. Die Zellen werden über den Invasin-Integrin Signalweg aktiviert. Invasin, ein Membranprotein der äußeren Yersinienmembran, bindet dabei an das β1-Integrin der Wirtszelle und aktiviert Rac1, eine kleine GTPase. Dieses Signal wird über mehrere Kinasekaskaden weitergeleitet und führt unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Durch die Aktivierung kommt es zur Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8. Daneben stabilisiert die Aktivierung von p38 MAP Kinase (mitogen-activated protein) in der Kinasekaskade die IL-8 mRNA und trägt so zusätzlich zur maximalen IL-8 Proteinsynthese bei [49,51]. Das Zytokin IL-8 aktiviert polymorphkernigen Leukozyten, die ihrerseits verantwortlich für die akute entzündliche Reaktion des Gewebes sind. Epithelzellen sind also ein wesentlicher Bestandteil einer frühen Signalantwort und wichtig für die Aktivierung von immunologischen und inflammatorischen Zellen aus der Mukosa [52,54]. Klinisch macht sich eine Yersinieninfektion in einer Vielzahl von gastrointestinalen Störungen bemerkbar, die von akuter Enteritis über Enterokolitis bis mesenterialer Lymphadenitis reichen kann [61].

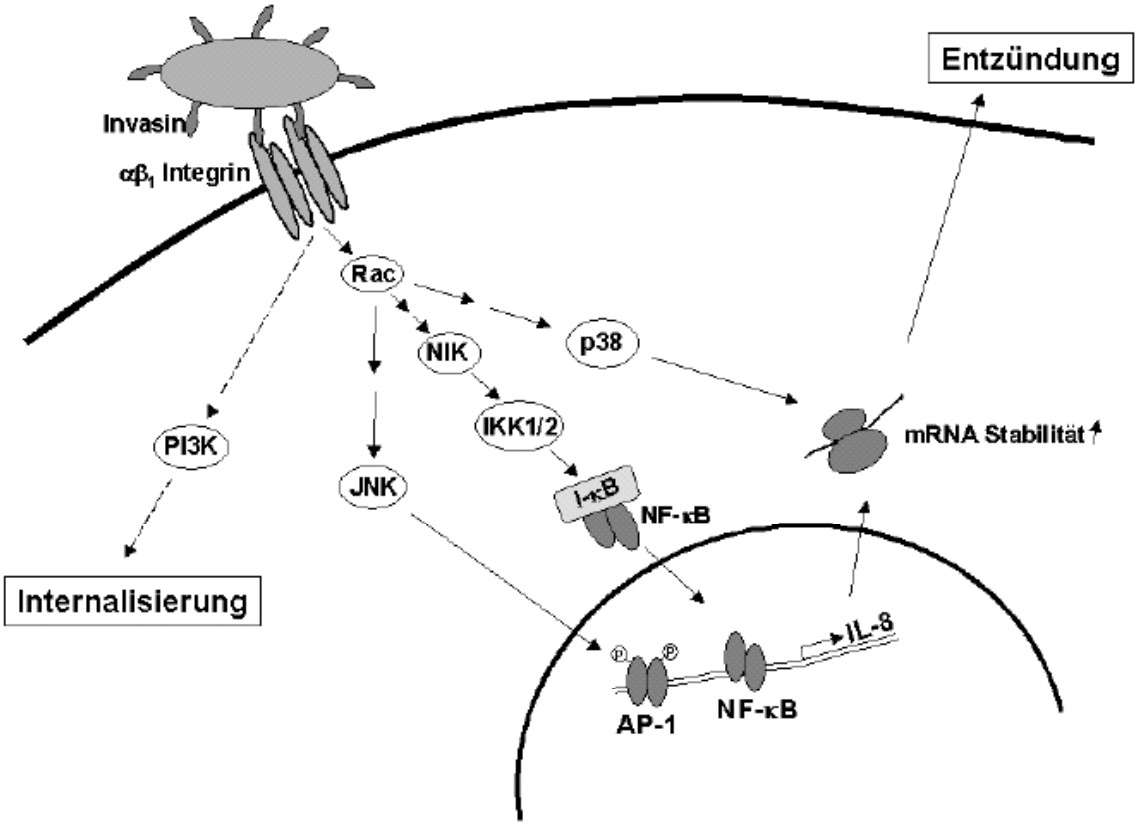


Abb. 4.1: Modell der IL-8 Induktion in Epithelzellen durch *Y. enterocolitica*: die Bakterien adhärieren über das Invasin an die β1-Integrine der Wirtszelle. Durch das „*Clustering*" der Rezeptoren werden Signaltransduktionskaskaden induziert, die eine Aufnahme der Bakterien und die Expression und Sekretion des proinflammatorischen Chemokins IL-8 zur Folge haben [49].

4.2 Wirkung von Kommensalen und Probiotika auf Entzündung in Darmepithelzellen

Verschiedene Studien zeigen, dass kommensale Bakterienstämme die entzündliche Reaktion der Epithelzellen im Darm beeinflussen können. Dabei wurden die gleichen Bakterienspezies verwendet wie in der vorliegenden Arbeit. *Bifidobacteriae* und *Lactobacilli* erwiesen sich wie in den vorliegenden Experimenten als wirksam. Bai et al. stellten fest, dass sowohl *Bifidobacterium longum* als auch *Lactobacillus bulgaricus* die TNF-α induzierte IL-8-Sekretion in

Epithelzellen unterdrücken [62] . Auch für weitere *Lactobacilli* wurden probiotische Effekte festgestellt. *L. reuteri* und *L. rhamnosus* GG inhibierten konzentrationsabhängig die durch TNF-α induzierte IL-8-Sekretion in humanen Epithelzellen über eine Hemmung des NF-κB Signalweges [21,44] . Darüber hinaus wurde für das probiotische Präparat VSL#3, das vier *Lactobacillus* Stämme (*L. casei, L. plantarum, L. acidophilus, L. delbrueckii bulgaricus*), drei *Bifidobacterium* Stämme (*B. longum, B. breve, B. infantis*) und *Streptococcus salivarius thermophilus* enthält, eine inhibierende Wirkung festgestellt. Petrof et al. fanden antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte von VSL#3 auf Darmepithelzellen. Dabei wird der NF-κB Signalweg über eine Hemmung des Abbaus von IκB durch Proteasomen inhibiert [63]. Beim Einsatz der DNA von VSL#3 zeigte sich *in vitro* an HT-29-Zellen und *in vivo* am Mausmodell (TLR- und IL-10-defiziente Mäuse) eine Inhibition der proinflammatorischen Reaktion des Darmepithels [64,65].

Probiotika werden auch bei einer Vielzahl von Erkrankungen des menschlichen Gastointestinaltraktes eingesetzt, zum Beispiel *Lactobaccillus* GG, *Lactobaccillus reuteri*, *Bifodobacterium lactis* und *Streptococcus thermophilus* bei akuter viraler Diarrhoe von Kindern [66]. Bei Patienten mit Pouchitis wurde an endoskopischen Proben festgestellt, dass nach einer sechsmonatigen Behandlung mit dem Präparat VSL#3 die mRNA Expression von IL-8 und verschiedenen Cytokinen in der Darmschleimhaut im Gegensatz zu den mit Placebo behandelten Patienten signifikant erniedrigt ist [67]. Und im Fall der Remissionserhaltung von Patienten mit CU wurde bei einer achtwöchigen Behandlung mit viablen Bifidobakterien im Vergleich zur Standardbehandlung eine verminderte NF-κB-Aktivität und eine erhöhte Expression antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, festgestellt. Die Standardbehandlung wurde mit den immunsuppremierenden Medikamenten Sulphasalazin und Glukokortikoiden durchgeführt [30]. Ebenfalls zeigte eine zwölfmonatige Behandlung mit dem probiotischen *E.coli* Nissle 1917 bei Patienten mit CU den gleichen Effekt auf die Remissionserhaltung wie die Behandlung mit Mesalazin. Mesalazin ist ein Immunsuppressivum, das derzeit als Goldstandard angewandt wird [34,68]. Aber die bakteriellen Faktoren, die von den eingesetzten Probiotika

produziert werden, und die molekularen Vorgänge, die zu dieser entzündungshemmenden Beeinflussung des Immunsystems der Darmschleimhaut führen, sind noch nicht bekannt.

4.3 Inhibition der IL-8-Produktion

Im Zellmodell das dieser Arbeit zugrunde liegt, zeigte sich bereits im Vorfeld in Versuchen, die Herr Matteo Quitadamo durchgeführt hatte, dass die verwendeten kommensalen Bakterienstämme per se keine entzündlichen Wirtsantworten hervorrufen. Bei der Infektion von HeLa-Zellen mit diesen Bakterienstämmen wurde festgestellt, dass sie die Expression von IL-8 nicht erhöhen. Entsprechende Ergebnisse sind auch schon aus der Literatur bekannt [52]. *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ fungiert in diesem Modell auf Grund der Invasin-vermittelten IL-8-Produktion als proinflammatorischer Stimulus und wurde auch als Positivkontrolle für die IL-8-Sekretion verwendet. Es wurde untersucht, ob *L. fermentum*, *B. adolescentis*, *B. vulgatus* und *B. distasonis* einen Einfluss auf die entzündliche Reaktion der Epithelzellen haben, während diese mit *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ als proinflammatorischem Reiz stimuliert wurden. Bei einer Koinfektion von HeLa-Zellen mit *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ und einem der kommensalen Bakterienstämme konnte gezeigt werden, dass das kommensale Bakterium die durch *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion inhibiert. In den Vorversuchen von Herrn Matteo Quitadamo war bereits gezeigt worden, dass die lebenden Bakterienstämme, die verwendet worden waren, einen antiinflammatorischen Effekt zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche bakteriellen Faktoren den inhibierenden Effekt vermitteln. Dazu wurden kommensale Bakterienüberstände und hitzegetötete Bakterien auf ihre entzündungshemmenden Eigenschaften untersucht, wobei eine Reduktion der *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ induzierten IL-8-Sekretion nur für die Überstände, nicht aber für die hitzegetöteten Bakterien gezeigt werden konnte. Entsprechend den Ergebnissen mit lebenden Kommensalen in den Vorversuchen und den Untersuchungen mit hitzegetöteten Kommensalen in dieser Arbeit, wurde an *Lactobacillus reuteri* gezeigt, dass lebende, aber nicht hitzegetötete Probiotika in menschlichen Darmepithelzellen dosisabhängig die

TNF-α induzierte IL-8-Synthese inhibiert. Aber es wurde kein inhibierender Effekt der Überstände auf die TNF-α induzierte IL-8-Sekretion der Epithelzellen gefunden, ganz im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gezeigten Hemmung der IL-8-Sekretion durch Bakterienüberstände. Deshalb wird davon ausgegangen, dass nur lebender, adhärierender *L. reuteri* in direktem Kontakt mit den Epithelzellen eine inhibierende Wirkung auf die IL-8 Produktion hat. Diese antiinflammatorische Wirkung auf die Epithelzellen wurde mit der Inhibition der NF-κB Translokation in den Zellkern von HeLa-Zellen und dem verhinderten Abbau des inhibierenden Proteins IκB assoziiert [21]. Neish et al. beobachteten ebenfalls bei Koinfektion von Epithelzellen mit non-pathogenen und proinflammatorischen *Salmonella* Stämmen, dass nur viable non-pathogene Salmonellen, nicht aber hitzegetötete oder Überstände, die durch proinflammatorische Salmonellen ausgelöste IL-8-Sekretion verhindern. Sie nehmen deshalb auch an, dass dieser Effekt durch direkte Interaktion der viablen Bakterien mit den Epithelzellen entsteht. Der beobachtete antiinflammatorische Effekt wird durch Blockade des IκB Abbaus, welcher die Translokation von aktiven NF-κB Dimeren in den Zellkern verhindert, vermittelt. Sie nehmen an, dass die Abschwächung des NF-κB Signalweges durch non-pathogene Salmonellen Ausdruck einer intestinalen Immuntoleranz ist [69] .

Davon abweichend wurde erst kürzlich von Zhang et al. gezeigt, dass sowohl viabler als auch hitzegetöteter *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) die TNF-α induzierte IL-8-Sekretion in humanen Darmepithelzellen (Caco-2 Zellen) vermindert. Auch hier wurde festgestellt, dass die Hemmung der IL-8-Sekretion durch LGG über den NF-κB Signalweg vermittelt wird. Es wird angenommen, dass diese Reduktion durch eine Hemmung der NF-κB Translokation in den Zellkern und dem damit verbundene Abfall von IκB verursacht wird. Ob die Verminderung von IκB durch eine erniedrigte Synthese, einen gesteigerten Ubiquitin-vermittelten Abbau oder einen anderen Mechanismus zustande kommt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden [44].

Weitere Studien beschreiben zudem, dass auch die DNA probiotischer Bakterien in die Modulation der Entzündungskaskade involviert ist. Rachmilewitz et al. fanden bei Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis eine

Abschwächung der Entzündung nach intragastrischer oder subkutaner Gabe probiotischer DNA von VSL#3. Deshalb wird angenommen, dass der protektive Effekt von VSL#3 eher über die DNA als über von den Bakterien produzierte Metabolite oder die Besiedelung des Kolons vermittelt wird und dass lebende Bakterien keine Vorraussetzung für die Vermittlung dieses Effektes sind. Dabei wird die Wirkung der bakteriellen DNA über den Signalweg des toll-like Rezeptor-9 (TLR-9) vermittelt [65]. Die Inhibition der TNF-α induzierten IL-8 Produktion ist ein mehrfach beschriebener Effekt probiotischer Bakterien. Ob die Antwort nach der Behandlung mit lebenden, mit DNA von hitzegetöteten oder mit Überständen von Bakterien auftritt, scheint sowohl vom verwendeten probiotischen Bakterienstamm abhängig zu sein, als auch vom verwendeten proinflammatorischen Stimulus und dem experimentellen System.

Die vorliegenden Ergebnisse, die einen antiinflammatorischen Effekt des Überstandes kommensaler Bakterien zeigen, lassen den Schluss zu, dass im vorliegenden System ein von Bakterien produzierter, löslicher Faktor die antiinflammatorische, protektive Wirkung der kommensalen Bakterien vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die verwendeten kommensalen Bakterienstämme die *Y. enterocolitica* induzierte IL-8-Sekretion ebenso wie die TNF-α vermittelte IL-8-Induktion, inhibieren. Bereits im Rahmen der Vorversuche war ausgeschlossen worden, dass dieser Effekt bei einer Ko-infektion mit kommensalen Bakterien durch eine verminderte Adhäsion oder Invasion von *Yersinia enterocolitica* pYV^- an oder in HeLa-Zellen hervorgerufen wird. Da zusätzlich auch eine Inhibition der TNF-α induzierten IL-8-Sekretion beobachtet wurde deuten diese Daten darauf hin, dass der hemmende Effekt der probiotischen Bakterien nicht durch Interferenz mit der Zelloberfläche oder durch Moleküle, die direkt mit dem Integrin-Rezeptor interagieren, ausgelöst wird.

4.4 Für IL-8-Inhibition verantwortliche Faktoren

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wurden die Untersuchungen auf ein Bakterium, *L. fermentum*, fokussiert und im nächsten Schritt versucht, den bakteriellen Faktor, der das antiinflammatorische Potential von *L. fermentum*

vermittelt, zu identifizieren. Zuerst wurde überprüft, ob es sich bei dem Faktor um ein sezerniertes bakterielles Protein handelt. Dazu wurde bakterieller Kulturüberstand von *L. fermentum* mit Proteinase K versetzt. Proteinase K katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen und baut dadurch eine große Anzahl von Proteinen ab. Es zeigte sich anschließend keine Veränderung der inhibierenden Eigenschaften des Überstandes von *L. fermentum*. Daraus wurde gefolgert, dass der antiinflammatorische Effekt von *L. fermentum* auf die *Y. enterocolitica* Invasin induzierte IL-8-Sekretion nicht durch ein sezerniertes Protein bedingt ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ménard et al., die Kulturüberstände von *Bifidobacterium breve* und *Streptococcus thermophilus* mit Pepsin und Trypsin versetzten, zwei proteolytischen Enzymen, die ebenfalls die Hydrolyse von Proteinen katalysieren. Es wurde keine Einschränkung der inhibierenden Kapazität der Überstände festgestellt. Daraus schlossen sie, dass der aktive bakterielle Metabolit kein Protein ist [70]. Auch der probiotische *Bacillus clausii* produziert eine antimikrobielle Substanz, die resistent gegen Proteinase K ist [71]. Im Gegensatz dazu fanden Touré et al. heraus, dass Bifidobakterien eine antibakterielle Substanz bilden, die zwar hitzeresistent, aber sensibel gegen Proteinase K ist und daher eher auf ein Protein hinweist [72]. Collado et al. stimmten damit überein, da sie bei der Untersuchung von Bifidobakterien ebenfalls einen Proteinase K sensitiven Faktor identifizierten, der für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich gemacht wird [73]. Hieraus kann man annehmen, dass unterschiedliche Bakterienstämme verschiedene antiinflammatorische und antimikrobielle Substanzen produzieren.

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob es sich bei dem antiinflammatorischen Faktor von *L. fermentum* um ein Siderophor handelt, das von *L. fermentum* sezerniert wird und durch die Bindung von Eisenmolekülen das Wachstum von *Y. enterocolitica* pYV$^-$ inhibiert. Es wird angenommen, dass Siderophore neben dem wachstumsfördernden Effekt auf das sezernierende Bakterium auch einen immunsupprimierenden Effekt auf den Wirt haben. Dadurch kann vor allem eine Infektion mit einem niedrig-virulenten *Y. enterocolitica* Stamm zu einer generalisierten Infektion führen [74]. Es könnte sich auch um einen von *L. fermentum* produzierten Stoff handeln, der Siderophore

von virulenter *Y. enterocolitica* inhibiert und somit die Eisenaufnahme und das Wachstum des pathogenen Bakteriums verhindert. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), ein Akute-Phase-Protein, das von Neutrophilen bei Infektion oder Inflammation freigesetzt wird, bindet zum Beispiel Eisensiderophore. Dadurch ist es unter eisenlimitierten Bedingungen ein potentes bakteriostatisches Agens, da es das Wachstum von Pathogenen verhindert [15]. Die Substitution von $FeCl_3$ im Überstand von *L. fermentum*, die einen möglicherweise vorhandenen Eisenmangel ausgleicht, zeigte im vorliegenden System keine Wirkung auf den IL-8 inhibierenden Effekt von *L. fermentum*. Deshalb wird angenommen, dass der antiinflammatorische Effekt von *L. fermentum* auf die *Y. enterocolitica* induzierte inflammatorische Wirtsantwort nicht durch bakterielle Siderophore oder Stoffe, die Siderophore hemmen, bedingt ist.

Im letzten Schritt wurden die Überstände von *L. fermentum* mit Phospholipase C behandelt. Phospholipasen sind hydrolysierende Enzyme, die Phospholipide in Fettsäuren und andere lipophile Substanzen spalten. Es stellte sich heraus, dass mit Phopholipase C behandelte Kulturüberstande von *L. fermentum* keinen antiinflammatorischen Effekt mehr auf *Y. enterocolitica* infizierte Zellen haben. Daher wird angenommen, dass die probiotische Wirkung von *L. fermentum* auf ein sezerniertes Phospholipid zurückzuführen ist, dass die *Y. enterocolitica*-Invasin vermittelte Wirtsantwort moduliert. Es ist bekannt, dass Butyrat, eine kurzkettige Fettsäure, die bei anaerober Fermentation im Darm entsteht, die entzündliche Antwort von Darmepithelzellen beeinflusst und man nimmt an, dass dies über eine Interaktion mit dem NF-κB Signalweg geschieht. Fehlen von Butyrat wird mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert. Offensichtlich inhibiert Butyrat einen Schritt der Aktivierung und Translokation der NF-κB-Untereinheit p50 über die Hemmung einer Deacetylase [75]. Lührs et al. stellten bei weiteren Untersuchungen fest, dass Butyrat die TNF-α übermittelte Phosphorylierung und den Abbau von IκB inhibiert. Folge davon ist die Inhibition der NF-κB Aktivierung, was letztendlich zu einem antiinflammatorischen Effekt führt [76]. Zusätzlich zu dem verminderten Abbau von IκB stellten Yin et al. auch eine Reduktion der Proteasomen-Aktivität fest.

Dadurch wird der Abbau von IκB ebenfalls inhibiert und NF-κB kann nicht in den Zellkern translozieren [77].

Zudem wurde beschrieben, dass bakterielle Phospholipide Entzündungsprozesse modulieren können. Phosphatidylinositol bindet zum Beispiel an den membranständigen CD14 Oberflächenrezeptor (mCD14), der unter anderem auch LPS (Lipopolysaccharid) bindet und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der TLR-4 Signalling Kaskade spielt. Bindet Phosphatidylinositol an mCD14, wird die Bindung von LPS an mCD14 verhindert und dadurch auch die induzierte zelluläre Entzündungsantwort [78]. Diese Studien machen deutlich, dass Lipide eine inhibierende Rolle in der Entzündungskaskade über NF-κB spielen. Anhand der hier vorliegenden Ergebnissen wird angenommen, dass für die Inhibition der NF-κB Aktivierung, die auf die Stimulation von HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* pYV$^-$ oder TNF-α folgt, ein Glycerophospholipid verantwortlich ist, das von *L. fermentum* gebildet wird. Bei der Fraktionierung des Überstandes von *L. fermentum* wurde herausgefunden, dass es sich bei dem Glycerophospholipid um einen Faktor mit Molekulargewicht <10kDa handelt. Ergebnisse aus anderen Studien, die einen Faktor <3kDa fanden, lassen vermuten, dass es sich bei dem gesuchten Lipid um eines mit geringem Molekulargewicht handelt [79].

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse ermöglichen eine neue Einsicht in die Mechanismen, die für die antiinflammatorische Wirkung von *L. fermentum* verantwortlich sein könnten. Dies wird in weiteren Projekten fortgeführt, die die Physiologie der Interaktion zwischen Bakterium und Wirt und die Rolle der verschiedenen probiotischen Bakterien untersuchen werden, die nachgewiesenerweise die Epithelzellreaktion modulieren. Ein weiterer Aspekt der Forschung wird die Identifikation des sezernierten, immunmodulierenden Glycerophospholipids und der Mechanismen sein, die den antiinflammatorischen Effekt dieses probiotischen bakteriellen Faktors vermitteln. Probiotika werden zwar in der Behandlung einiger Krankheiten, so

zum Beispiel der Erhaltungstherapie bei CU eingesetzt, aber die Mechanismen der probiotischen Wirkungsweise sind noch nicht verstanden.
Zudem müssen im Mausmodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen die Zusammenhänge und Interaktionen zwischen Probiotika und dem ganzem Organismus näher beleuchtet werden. Dabei kann auch der antiinflammatorische Effekt des von *L. fermentum* produzierten Faktors auf eine Darmentzündung im Mausmodell untersucht werden.
Die Identifikation des probiotischen Faktors von *L. fermentum* könnte zu einem besseren Verständnis der Symbiose zwischen dem Wirt und der mukosalen Mikroflora führen. Im Gleichgewicht könnte die Verminderung einer akuten entzündlichen Antwort durch bestimmte Probiotika zur oralen Toleranz des Immunsystems der Mukosa beitragen, wohingegen die Zerstörung des Gleichgewichts bei der Pathogenese einer intestinalen Infektion oder einer idiopathischen chronisch entzündlichen Darmerkrankung mitwirken könnte. Die Identifizierung des antiinflammatorischen Faktors ist auch für die Prävention oder für neue Therapieansätze bei gastrointestinalen inflammatorischen Wirtsantworten und entzündlichen Darmerkrankungen von großem Interesse. Ein Weg der probiotischen Therapie könnte über die pharmazeutische und diätetische Modulation der NF-κB Aktivität führen, die letztendlich die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind dabei ein Gebiet, auf dem der Einsatz protektiver Bakterien besonders naheliegt und auch intensiv erforscht wird. Eine Kombinationsbehandlung mit Antibiotika und Probiotika der kommensalen Darmflora könnte in Zukunft effektiver sein und besser toleriert werden, als eine immunsuppressive Therapie, wie sie zur Zeit noch standardmäßig angewandt wird. Immunsuppressive Medikamente bringen zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen mit sich, wodurch die Lebensqualität der Patienten deutlich beeinträchtigt werden kann. Der Einsatz antiinflammatorischer Mikroorganismen der physiologischen Darmflora zur Regulation der gastrointestinalen Immunsituation dieser Patienten könnte als ergänzende Therapiestrategie eine Verbesserung der Lebensqualität erzielen.

5 Zusammenfassung

Die Bakterien der physiologischen Darmflora spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase des Gastrointestinaltraktes. Von besonderem Interesse sind hierbei sogenannte probiotische Bakterien, also Mikroorganismen, die per Definition für den Wirt vorteilhafte Wirkungen entfalten.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt kommensaler Bakterienstämme auf eine *Yersinia enterocolitica* pYV$^-$ Infektion menschlicher Epithelzellen *in vitro* zu untersuchen und den Faktor, der die Wirkung kommensaler Bakterien vermittelt, zu identifizieren. Als Modell einer proinflammatorischen Reaktion wurde die Yersinia-Invasin-induzierte IL-8-Sekretion in HeLa-Zellen gewählt. Bei den Testbakterien handelte es sich um kommensale Stämme, die aus den Fäzes gesunder Erwachsener isoliert wurden und zu den Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* und *Streptococcus* gehören.

Es wurde festgestellt, dass Kulturüberstände der kommensalen Bakterien die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion inhibieren. Eine Ausnahme stellte *Streptococcus salivarius* dar, der in hitzeinaktivierter Form, nicht aber als Kulturüberstand die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8-Sekretion inhibierte. Daher wird davon ausgegangen, dass mit Ausnahme von *S. salivarius* ein löslicher bakterieller Faktor die *Y. enterocolitica* pYV$^-$ induzierte IL-8 Sekretion inhibiert.
Dieser sezernierte bakterielle Faktor wurde für *L. fermentum* genauer untersucht. Zunächst wurde die Größe des gesuchten Faktors mittels Filtration der bakterielle Kulturüberstände auf eine Molekülgröße <10kDa eingegrenzt. Durch Inkubation der Kulturüberstände von *Lactobacillus fermentum* mit proteolytischen und hydrolytischen Enzymen, wurde der gesuchte lösliche Faktor genauer bestimmt. Proteinase K zeigte keine Auswirkung auf die inhibitorische Wirkung der Kulturüberstände. Behandlung mit verschiedenen Phospholipasen zeigte eine Aufhebung der Inhibition durch die Überstände nach Behandlung mit Phospholipase C. Auf Grund dieser Ergebnisse wird die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem antiinflammatorischen Faktor von

L. fermentum um ein Glycerophospholipid mit einem Molekulargewicht <10kDa handelt.

Diese Ergebnisse ermöglichen eine neue Einsicht in Mechanismen, die eine antiinflammatorische Wirkung probiotischer Bakterien vermitteln. In weiteren Studien soll das immunmodulierende Glycerophospholipid und die Mechanismen, die den antiinflammatorischen Effekt dieses probiotischen bakteriellen Faktors vermitteln, untersucht werden. Der Einsatz antiinflammatorischer Mikroorganismen der physiologischen Darmflora zur Regulation der gastrointestinalen Immunsituation von Patienten könnte als ergänzende Therapiestrategie eine Verbesserung der Lebensqualität bei entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes erzielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science 2001;292:1115-1118.

2. Hart AL, Stagg AJ, Frame M, Graffner H, Glise H, Falk P, Kamm MA. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:1383-1393.

3. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol 1996;4:430-435.

4. Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. Infect Immun 1995;63:3904-3913.

5. Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. J Appl Bacteriol 1994;77:412-420.

6. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology 1984;86:174-193.

7. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001;73:361S-364S.

8. Marth T, Zeitz M. Orale Toleranz:Immunologische Mechanismen und potentielle klinische Anwendung. DtÄrztebl 1999;96:A-1568-A-1570.

9. Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. How the gut senses its content. Cell Microbiol 2002;4:61-72.

10. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr 2001;73:386S-392S.

11. Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2003;18:45-56.

12. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis - a molecular approach. 2002.

13. Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. Am J Clin Nutr 2001;73:1124S-1130S.

14. Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;286:G613-G626.

15. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol Cell 2002;10:1033-1043.

16. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. Infect Immun 2004;72:5750-5758.

17. Neumann E, Oliveira MA, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, Cara DC, Podoprigora GI, Vieira LQ. Monoassociation with Lactobacillus acidophilus UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. Braz J Med Biol Res 1998;31:1565-1573.

18. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. J Dairy Sci 1995;78:1597-1606.

19. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of oral feeding of Lactobacillus casei strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J Dairy Sci 1998;81:48-53.

20. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology 2001;121:580-591.

21. Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live Lactobacillus reuteri is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. Infect Immun 2004;72:5308-5314.

22. Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, Kagnoff MF. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. J Immunol 1999;163:1457-1466.

23. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. Nat Immunol 2004;5:104-112.

24. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev 2002;15:79-94.

25. Nayar M, Rhodes JM. Management of inflammatory bowel disease. Postgrad Med J 2004;80:206-213.

26. Bernstein CN, Nayar G, Hamel A, Blanchard JF. Study of animal-borne infections in the mucosas of patients with inflammatory bowel disease and population-based controls. J Clin Microbiol 2003;41:4986-4990.

27. Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am 1995;24:475-507.

28. Hollander D. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. Curr Gastroenterol Rep 1999;1:410-416.

29. O'Farrelly C. Just how inflamed is the normal gut? Gut 1998;42:603-604.

30. Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2004;10:1521-1525.

31. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. Gut 2005;54:242-249.

32. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther 1997;11:853-858.

33. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. Med Sci Monit 2004;10:I126-I131.

34. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. Lancet 1999;354:635-639.

35. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr 2001;73:421S-429S.

36. Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. Dig Dis Sci 1998;43:133-137.

37. Mahe S, Marteau P, Huneau JF, Thuillier F, Tome D. Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. Br J Nutr 1994;71:169-180.

38. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am J Clin Nutr 2001;73:430S-436S.

39. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics 2002;109:678-684.

40. Ahrne S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G. The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. J Appl Microbiol 1998;85:88-94.

41. Molin G, Jeppsson B, Johansson ML, Ahrne S, Nobaek S, Stahl M, Bengmark S. Numerical taxonomy of Lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. J Appl Bacteriol 1993;74:314-323.

42. Pant AR, Graham SM, Allen SJ, Harikul S, Sabchareon A, Cuevas L, Hart CA. Lactobacillus GG and acute diarrhoea in young children in the tropics. J Trop Pediatr 1996;42:162-165.

43. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. J Pediatr 1999;135:564-568.

44. Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and Dead Lactobacillus rhamnosus GG Decrease Tumor Necrosis Factor-{alpha}-Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. J Nutr 2005;135:1752-1756.

45. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y. Protective effect of Lactobacillus casei strain Shirota on Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 infection in infant rabbits. Infect Immun 2001;69:1101-1108.

46. Nader de Macias ME, Apella MC, Romero NC, Gonzalez SN, Oliver G. Inhibition of Shigella sonnei by Lactobacillus casei and Lact. acidophilus. J Appl Bacteriol 1992;73:407-411.

47. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. Clin Exp Immunol 2005;140:417-426.

48. Bohn E, Muller S, Lauber J, Geffers R, Speer N, Spieth C, Krejci J, Manncke B, Buer J, Zell A, Autenrieth IB. Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of Yersinia enterocolitica. Cell Microbiol 2004;6:129-141.

49. Grassl GA, Kracht M, Wiedemann A, Hoffmann E, Aepfelbacher M, Eichel-Streiber C, Bohn E, Autenrieth IB. Activation of NF-kappaB and IL-8 by Yersinia enterocolitica invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. Cell Microbiol 2003;5:957-971.

50. Schulte R, Zumbihl R, Kampik D, Fauconnier A, Autenrieth IB. Wortmannin blocks Yersinia invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. Med Microbiol Immunol (Berl) 1998;187:53-60.

51. Schulte R, Grassl GA, Preger S, Fessele S, Jacobi CA, Schaller M, Nelson PJ, Autenrieth IB. Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. FASEB J 2000;14:1471-1484.

52. Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. Am J Gastroenterol 2002;97:1182-1186.

53. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest 1995;95:55-65.

54. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. Infect Immun 1993;61:4569-4574.

55. Schmid Y, Grassl GA, Buhler OT, Skurnik M, Autenrieth IB, Bohn E. Yersinia enterocolitica adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. Infect Immun 2004;72:6780-6789.

56. Trulzsch K, Sporleder T, Igwe EI, Russmann H, Heesemann J. Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. Infect Immun 2004;72:5227-5234.

57. Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Kohler S, Heesemann J, Rouot B. Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. J Exp Med 1998;187:1069-1079.

58. Ruckdeschel K, Richter K, Mannel O, Heesemann J. Arginine-143 of Yersinia enterocolitica YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. Infect Immun 2001;69:7652-7662.

59. Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trulzsch K, Rouot B, Heesemann J. Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear

factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. J Immunol 2001;166:1823-1831.

60. Schulte R, Wattiau P, Hartland EL, Robins-Browne RM, Cornelis GR. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent Yersinia enterocolitica. Infect Immun 1996;64:2106-2113.

61. Cover TL, Aber RC. Yersinia enterocolitica. N Engl J Med 1989;321:16-24.

62. Bai AP, Ouyang Q, Zhang W, Wang CH, Li SF. Probiotics inhibit TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion of HT29 cells. World J Gastroenterol 2004;10:455-457.

63. Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. Gastroenterology 2004;127:1474-1487.

64. Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. Gastroenterology 2004;126:1358-1373.

65. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology 2004;126:520-528.

66. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Use of probiotics in children with acute diarrhea. Paediatr Drugs 2005;7:111-122.

67. Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Fiorentino M, d'Errico A, Volk HD, Campieri M. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. Inflamm Bowel Dis 2005;11:447-454.

68. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut 2004;53:1617-1623.

69. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. Science 2000;289:1560-1563.

70. Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. Gut 2004;53:821-828.

71. Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. J Clin Gastroenterol 2004;38:S86-S90.

72. Toure R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes. J Appl Microbiol 2003;95:1058-1069.

73. Collado MC, Hernandez M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. J Food Prot 2005;68:1034-1040.

74. Autenrieth I, Hantke K, Heesemann J. Immunosuppression of the host and delivery of iron to the pathogen: a possible dual role of siderophores in the pathogenesis of microbial infections? Med Microbiol Immunol (Berl) 1991;180:135-141.

75. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. Gastroenterology 2000;118:724-734.

76. Luhrs H, Gerke T, Schauber J, Dusel G, Melcher R, Scheppach W, Menzel T. Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate. Int J Colorectal Dis 2001;16:195-201.

77. Yin L, Laevsky G, Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. J Biol Chem 2001;276:44641-44646.

78. Wang PY, Kitchens RL, Munford RS. Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide. J Biol Chem 1998;273:24309-24313.

79. Mellits KH, Mullen J, Wand M, Armbruster G, Patel A, Connerton PL, Skelly M, Connerton IF. Activation of the transcription factor NF-kappaB by Campylobacter jejuni. Microbiology 2002;148:2753-2763.

7 Abkürzungen

In der folgenden Aufführung nicht enthalten sind Elemente des Periodensystems.

Abb.	Abbildung
AIEC	adhärenter invasiver *Escherichia coli*
B.	*Bacteroides*
B.	*Bifidobacterium*
BHI	brain heart infusion
C.	*Campylobacter*
C.	*Clostridium*
°C	Grad Celcius
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming union
CIN	Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CMC	chopped meat carbohydrate
CU	Colitis ulcerosa
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid
DSS	dextran sulfate sodium
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	*et alii* (lat.: und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GG	Gorbach *and* Goldin (Entdecker von *Lactobacillus* GG)

Gln	Glutamin
GTP	Guanosin triphosphat
h	Stunde
hBD-2	humanes β-Defensin-2
HeLa	Helene Lang
HLA	human leukocyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	inhibitor of NF-κB kinase
IL	Interleukin
IκB	inhibitor of NF-κB
JNK	c-Jun N-terminal protein kinase
k	Kilo
Kap.	Kapitel
l	Liter
L.	*Lactobacillus*
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	mol/l
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MC	Morbus Crohn
MEK	MAP/ERK Kinase
MEK1	MAP-Kinase-Kinase 1
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MOI	multiplicity of infection

mRNA	messenger ribonucleic acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
NF-κB	nuclear factor-κB
ng	Nanogramm
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NIK	NF-κB-inducing kinase
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OT	orale Toleranz
PBS	phosphate buffered saline
pg	Picogramm
pH	**p**ondus **H**ydrogenii
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
pYV	*Yersinia* virulence plasmid
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rel	relish
mRNA	messenger ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S.	*Streptococcus*
S.	*Saccharomyces*
S.	*Salmonella*
sIgA	sekretorisches IgA
SPF	specific pathogen-free
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like receptor
TM	trademark

TNF	tumor necrosis factor
WHO	World Health Organization
Y.	*Yersinia*
Yop	Yersinia outer protein
z.B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. I. B. Autenrieth für die Überlassung der Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie Dr. med. Julia-Stefanie Frick für die Betreuung und Anleitung bei der Durchführung und die Zeit und das offene Ohr, die sie immer für mich eingeplant hat.

Außerdem möchte ich mich bei Matteo Quitadamo bedanken, der die Vorversuche mit lebenden Bakterien durchgeführt hat sowie bei Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke für die Bereitstellung der Testbakterien.

Danken möchte ich auch sehr Frauke Kahl und Juliane Krejci, die mich durch professionelle und geduldige Einarbeitung in zellbiologische und bakteriologische Arbeitstechniken in der praktische Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke auch für die gemeinsamen Pausen!

Besonderen Dank an alle, die mir den Laboralltag erleichtert haben und Freud und Leid mit mir geteilt haben: Danke Benni, Simon, Andi, Martina, Holger, Martin, Oli Bechthold. Und an Sabina, die geduldig Korrektur gelesen hat.

Allen anderen Mitgliedern des Instituts für medizinische Mikrobiologie ein herzliches Danke für diese Zeit.

Vor allem danken möchte ich allen, die diese Arbeit im Gebet mitgetragen haben und meinem Vater im Himmel, der mich durch diese Zeit durchgetragen hat!

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Vanderelst, geb. Schenk
Geburtstag	05.06.1980
Geburtsort	Aalen

Schulbildung

1987-1991	Grundschule Wittlensweiler
1991-2000	Kepler-Gymnasium Freudenstadt
07/2000-03/2001	Freiwilliges Soziales Jahr im Krankenhaus Kirchheim unter Teck

Studium

seit 04/2001:	Medizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
03/2003:	Physikum

Promotion

01/2004 – 01/2006:	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Professor Dr. I. B. Autenrieth
15.05.2008	Ärztliche Prüfung