

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

**Interaktion von enteroaggregativen E. coli
mit probiotischen Bakterien an Caco2-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Lehnhoff

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Schroten

Korreferent: apl. Prof. Dr. Richter

Für meine Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Professor Dr. med. H. Schroten für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Dissertation.

Herrn Dr. med. R. Adam danke ich für seine Unterstützung und Hilfe während der gesamten Erarbeitung der Dissertation.

Frau Mölleken und den Mitarbeitern des infektiologischen Labors der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Zentrums für Kinderheilkunde danke ich für die stets freundliche Unterstützung und Hilfe bei den Experimenten.

Herrn Dr. Willers vom Mathematischen Institut der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der statistischen Auswertung.

Die größte Anerkennung gebührt meiner Familie, die meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht hat und die mich stets unterstützt. Meinem Freund Jan danke ich für die anhaltende Motivation und liebevolle Unterstützung, besonders in der Endphase der Dissertation, ohne die diese Arbeit wohl nicht beendet worden wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Escherichia coli	1
1.2. Enteroaggregative E. coli (EAEC)	3
1.3. Diffus-adhärierende E. coli (DAEC).....	8
1.4. Enteropathogene E. coli (EPEC).....	8
1.5. Enterotoxische E. coli (ETEC).....	11
1.6. Enterohämorrhagische E. coli (EHEC).....	12
1.7. Enteroinvasive E. coli (EIEC)	13
1.8. Probiotika	14
2. Fragestellung.....	22
3. Material und Methoden.....	23
3.1. Caco2 - Zellkultur	23
3.2. Bakterien	24
3.3. Zellbindungsassay.....	26
3.4. Vorversuche	27
3.5. Bakterienadhäsion unter Zusatz von Mannose	28
3.6. Koinkubation E. coli mit probiotischen Bakterien auf Caco2-Zellen - Konkurrenz.....	28
3.7. Vorinkubation E. coli auf den Caco2-Zellen - Verdrängung.....	29
3.8. Vorinkubation der probiotischen Bakterien auf den Caco2-Zellen - Exklusion	29
3.9. Koinkubation E. coli mit UV-inaktiviertem Lactobacillus acidophilus bzw. mit Überständen von Lactobacillus (para)casei und acidophilus.....	29
3.10. Auswertung	31
3.11. Statistik.....	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Aussaatdichte der Caco2-Zellen	32
4.2. US-Lyse	32
4.3. Bakterizidieassay	33
4.4. Zellbindungsassay.....	33
4.5. Zellbindungsassay unter Zusatz von Mannose	35
4.6. Inhibition der Adhäsion von E. coli DEF40 an Caco2-Zellen durch Probiotika	36
4.7. Inhibition der Adhäsion von E. coli DEF40 an Caco2-Zellen durch Bakterienüberstand	40

4.8. Inhibition der Adhäsion von E. coli DEF40 durch UV-inaktivierten Lactobacillus acidophilus La5.....	40
5. Diskussion	43
6. Zusammenfassung	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Vergleich enterovirulenter E. coli	2
Tabelle 1-2:	Virulenzgene und –faktoren (Huang, Mohanty et al. 2006).....	5
Tabelle 1-3:	Häufigkeit von Diarrhoen, ausgelöst durch EAEC, aufgeschlüsselt nach betroffener Population und untersuchter Region (Huang and Dupont 2004)	7
Tabelle 1-4:	Anforderungen an probiotische Keime (de Roos and Katan 2000; Heyman and Menard 2002; van de Guchte, Serror et al. 2002; Collado, Gueimonde et al. 2005), WHO 2001.....	16
Tabelle 4-1:	Zellbindungsassay der einzelnen Keime, Inkubationsdauer 2 Stunden	34
Tabelle 4-2:	Vergleich Zellbindungsassay der einzelnen Keime mit und ohne Zusatz von Mannose.....	36
Tabelle 4-3:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Konkurrenz (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum)	37
Tabelle 4-4:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Verdrängung (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum).....	38
Tabelle 4-5:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Exklusion (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum)	38
Tabelle 4-6:	Vergleich unkonditionierte Überstände von Lb. acidophilus (a1) und Lb. (para)casei (c1), Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum.....	40
Tabelle 4-7:	Vergleich UV-inaktivierter Lb. acidophilus (UV) und unkonditionierter (a1) und konditionierter Überstand (a2) von Lb. acidophilus	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	HEp-2-Adhärenzmuster von enterovirulenten <i>E. coli</i> : a: Lokale Adhärenz (LA), typisch für EPEC b: Diffuse Adhärenz (DA), das DAEC zeigt c: Aggregative Adhärenz (AA), das EAEC definiert d: LAL (Localized-Adherence-Like), charakteristisch für atypische EPEC. Im Gegensatz zum LA weniger dichte und kompaktere Mikrokolonien (Scaletsky, Pedroso et al. 1999).....	3
Abbildung 1-2:	a: Aggregatives-Adhärenzmuster nach drei Stunden Inkubation von EAEC 042 mit HEp-2-Zellen. In der linken unteren Ecke befinden sich Bakterien, die an die Epithelzelloberfläche binden, auf dem zellfreien Untergrund sogenannte „stacked-brick“-Aggregate. b: Die Rasterelektronenphotographie von EAEC 042 zeigt die flexiblen AAF/II-Fimbrien, die sowohl die Bakterien aneinander als auch an den Untergrund binden (Nataro 2005).....	4
Abbildung 1-3:	a: Elektronenmikroskopisches Bild einer Kultur von EPEC-Bakterien, die so kultiviert wurden, dass sie Typ-IV-Pili (BFP) exprimieren. b: Elektronenmikroskopisches Bild eines EPEC, der eine A/E-Läsion an einer Wirtszelle ausbildet. Zu beachten ist der Verlust an Mikrovilli und die Ausbildung eines Sockels an der Wirtszelle, mit dem das Bakterium fest verbunden ist. (Donnenberg and Whittam 2001).....	9
Abbildung 1-4:	a: Elektronenphotographie, die EspA-Filamente zeigt (Schwarze Pfeile). Die Filamente verbinden EPEC-Bakterien mit HEL-Zellen und ermöglichen so die Translokation von Effektorproteinen. b: Die Filamente sind auch auf der Oberfläche von EPEC zu sehen, die bereits A/E-Läsionen gebildet haben (Knutton, Rosenshine et al. 1998).....	10
Abbildung 4-1:	Adhäsion von FITC-markiertem <i>Bifidobacterium lactis</i> an Plastik (links), FITC-markiertem <i>Lactobacillus acidophilus</i> an Plastik (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit.....	32
Abbildung 4-2:	Adhäsion von FITC-markiertem DEF40 an Plastik (links), Adhäsion von FITC-markiertem DEF40 an Caco2-Zellen (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit.....	33

Abbildung 4-3:	Zellbindungsassay der einzelnen Keime (a: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , Bb: <i>Bifidobacterium bifidum</i> , Bl: <i>Bifidobacterium lactis</i> , c: <i>Lactobacillus casei</i> , Ec: <i>Escherichia coli</i>).....	34
Abbildung 4-4:	Adhäsion von <i>Bifidobacterium lactis</i> an Caco2-Zellen (links), Adhäsion von <i>Lactobacillus (para)casei</i> an Caco2-Zellen (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit	35
Abbildung 4-5:	Adhäsion von <i>Lactobacillus salivarius</i> (starke Aggregatbildung) an Caco2-Zellen nach 2 Stunden Inkubationszeit.....	35
Abbildung 4-6:	Zellbindungsassay der einzelnen Keime mit und ohne Zusatz von Mannose	36
Abbildung 4-7:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Konkurrenz	38
Abbildung 4-8:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Verdrängung	39
Abbildung 4-9:	Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Exklusion	39
Abbildung 4-10:	Zellbindungsassay mit Überständen a1: unkonditionierter Überstand von <i>Lb. acidophilus</i> c1: unkonditionierter Überstand von <i>Lb. (para)casei</i>	41
Abbildung 4-11:	Zellbindungsassay mit Überständen und UV-inaktiviertem <i>Lb. acidophilus</i> a1: unkonditionierter Überstand von <i>Lb. acidophilus</i> a2: konditionierter Überstand von <i>Lb. acidophilus</i> UV: UV-inaktivierter <i>Lb. acidophilus</i>	42
Abbildung 5-1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, die die aggregative Adhärenz an den apikalen Bürstensaum von Caco2-Zellen zeigt. Vergrößerung 5000fach (Knutton, Shaw et al. 1992).....	47

Abkürzungsverzeichnis

A/E-Läsion	Attaching and Effacing Lesion
AA	Aggregative Adhäsion
AAF/I, II, III	Aggregative Adhärenzfimbrie I, II, III
aatA	Anti-Aggregationsprotein-Transportergen
AggR	Regulatorgen EAEC
BFP	Bundle-Forming Pilus
BSA	Bovines Serumalbumin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DA	Diffuse Adhäsion
DAEC	Diffus-adhärierende E. coli
EAEC	Enteroaggregative E. coli
Eae-Gen	E. coli Attaching and Effacing-Gen
EAF	EPEC Adherence Factor
EHEC	Enterohämorrhagische E. coli
EIEC	Enteroinvasive E. coli
EPEC	Enteropathogene E. coli
Esp	EPEC-sezerniertes Protein
ETEC	Enterotoxische E. coli
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
LA	Lokalisierte Adhärenz
LAL	Lokalisierte-Adhärenz-ähnlich (atypische E. coli)
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LT	Hitzelabiles ETEC-Toxin
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
pAA	Aggregative-Adhärenz Virulenzplasmid
ST	Hitzestabiles ETEC-Toxin
Stx	Shiga-ähnliches Toxin (EHEC)
Tir	Translozierter Intimin-Rezeptor
TLR	Toll-like-receptor, Transmembranprotein
TTSS	Type Three Secretion System, Typ-III-Sekretionssystem

1. Einleitung

Der menschliche Darm wird von einer komplexen Gemeinschaft von rund 100 Billionen (10^{14}) Mikroorganismen bevölkert, die in ihrer Gesamtheit umgangssprachlich als Darmflora, wissenschaftlich als Mikrobiota bezeichnet werden. In ihrem tiefgreifenden Einfluss auf die Stoffwechsellistung und immunologische Funktion können sie als ein postnatal erworbenes Organ aufgefasst werden, welches charakteristisch für den jeweiligen Wirt ist (Palmer, Bik et al. 2007). Die intestinale Flora stellt eines der stoffwechselaktivsten Kompartimente des Menschen dar, wobei die Funktion bisher nur unzureichend geklärt ist. Die Mikrobiota ist verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt und wird dadurch in ihrer Funktion und Zusammensetzung verändert, wenngleich sie grundsätzlich relativ standortstabil ist. In den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes dominieren je nach Milieubedingungen unterschiedliche Bakterienarten, in der überwiegenden Mehrzahl fakultativ pathogene anaerobe Mikroben. 1g Fäzes enthält etwa 10^{12} Bakterien, wovon ca. 99% Anaerobier sind, davon ca. 10^7 *E. coli*.

Bestimmten Bestandteilen der Mikrobiota, wie Laktobazillen oder Bifidobakterien, werden positive Effekte auf die Integrität des Darms, die Abwehr von Pathogenen, die Beeinflussung der Darmperistaltik, die Regulation der Körperfettspeicherung und die Modulierung des Immunsystems zugeschrieben (Eckburg, Bik et al. 2005). Die Interaktionen zwischen den autochthonen Bakterien des Darmes einerseits und Zellen der Darmwand oder extern zugeführten Mikroben andererseits, die für diese Effekte verantwortlich sind, sind bis heute Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen (Schiffrin and Blum 2002).

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) Bakterien wurden das erste Mal von Theodor Escherich im Jahre 1919 als Bestandteil der intestinalen Mikrobiota von Säuglingen beschrieben (Chen and Frankel 2005). Bei *E. coli* handelt es sich um ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, sporenloses Bakterium aus der Gruppe der Enterobacteriaceae, das peritrich begeißelt und dadurch beweglich ist. Man unterscheidet heute fakultativ pathogene *E. coli*, die ein normaler Bestandteil der menschlichen Mikrobiota sind und enterovirulente Stämme, die gastrointestinale Infektionen auslösen können. Beide

können in seltenen Fällen auch extraintestinale Erkrankungen wie eine Sepsis, Peritonitis oder eine Neugeborenen-Meningitis verursachen (Nataro and Kaper 1998).

Bei den enterovirulenten *E. coli* unterscheidet man sechs Gruppen, die alle einen spezifischen Besatz von Virulenzfaktoren wie Toxine, Kolonisationsfaktoren und Invasionsplasmide exprimieren und beim Menschen Infektionen des Gastrointestinaltraktes hervorrufen können: enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffus adhärierende *E. coli* (DAEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sowie enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (Robins-Browne and Hartland 2002; Kaper, Nataro et al. 2004). Unter bestimmten Umständen besitzen sie die Fähigkeit, trotz vorhandener Peristaltik und Konkurrenz um Nährstoffe mit der vorhandenen Mikrobiota die Mukosa des Darms zu kolonisieren. Der Übertragungsweg aller enterovirulenten *E. coli* ist fäkal-oral (Levine and Edelman 1984). Die Unterscheidung gelingt über den Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren mittels PCR. Außerdem adhären *E. coli* in verschiedenen, charakteristischen Mustern, wenn man einen Zellbindungsassay an HEp-2-Zellen durchführt (Abbildung 1-1) (Nataro and Kaper 1998; Kaper, Nataro et al. 2004; Weintraub 2007).

Tabelle 1-1: Vergleich enterovirulenter *E. coli*

	EAEC	EPEC	ETEC	EHEC	EIEC
Klinik	Wässrig, Reisediarrhoen	Wässrig	choleraartig; Reisediarrhoen	Meist wässrig, 10% extraintestinale Manifestation	Ruhrartig
Auftreten	weltweit	Entwicklungsländer, v.a. Kleinkinder	Weltweit, Häufung in tropischen Regionen	Weltweit	Weltweit, v.a. Entwicklungsländer
Reservoir	Mensch	Mensch	Mensch	Mensch, Rinder, Haustiere	Mensch
Übertragungsweg	Kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel				

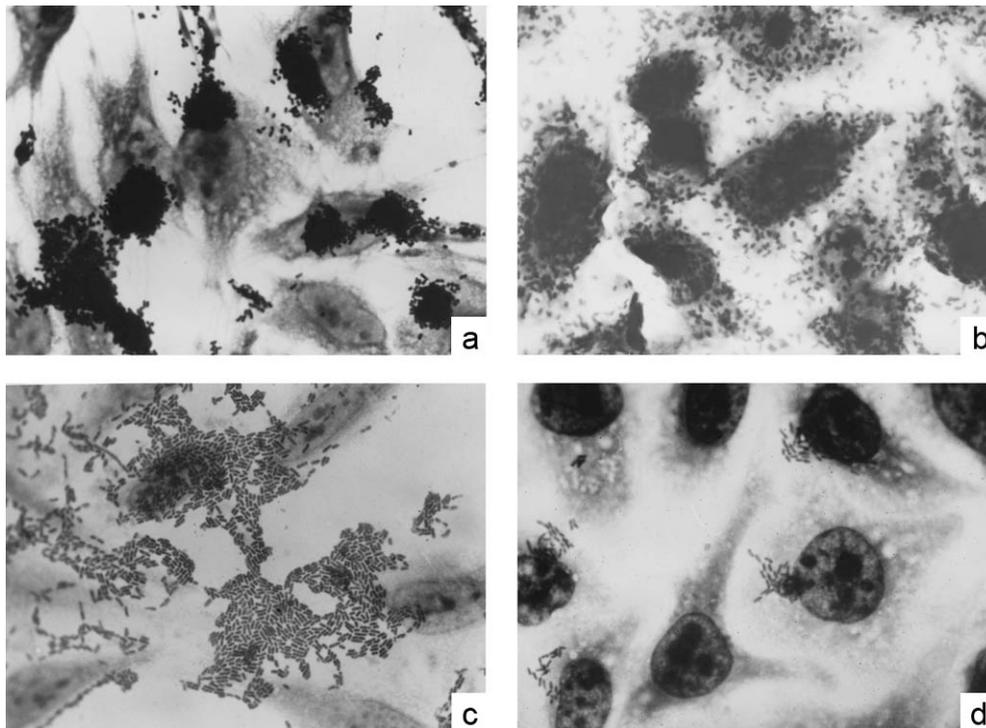


Abbildung 1-1: HEp-2-Adhärenzmuster von enterovirulenten *E. coli*:

a: Lokale Adhärenz (LA), typisch für EPEC

b: Diffuse Adhärenz (DA), das DAEC zeigt

c: Aggregative Adhärenz (AA), das EAEC definiert

d: LAL (Localized-Adherence-Like), charakteristisch für atypische EPEC. Im Gegensatz zum LA weniger dichte und kompaktere Mikrokolonien (Scaletsky, Pedroso et al. 1999)

1.2. *Enteroaggregative E. coli* (EAEC)

Enteroadhärenente *E. coli* wurden als eigene Gruppe innerhalb der pathogenen *E. coli* erstmals 1987 von Nataro beschrieben (Nataro, Kaper et al. 1987). Definiert werden EAEC als *E. coli*, die keine Enterotoxine LT (Hitzelabiles Toxin) oder ST (Hitzestabiles Toxin) sezernieren und in einem aggregativen Adhärenz-Muster adhären (Kaper, Nataro et al. 2004). Im Gegensatz zum EPEC adhären sie nicht in Mikrokolonien an HEp-2-Zellen, sondern diffus (Abbildung 1-1c). Die enteroadhärenenten *E. coli* werden unterschieden in *E. coli*, die aggregative und echte diffuse Adhäsion zeigen (diffus adhärenierende *E. coli*, s. 1.3). Die aggregative Adhäsion (AA) kommt durch die Autoagglutination der *E. coli* untereinander, sowohl an HEp-2-Zellen als auch an Glasflächen zustande. Dabei bilden sie ein sogenanntes „stacked-brick“-Muster (wie geschichtete Mauersteine, Abbildung 1-2: a), während sich die echt

diffus adhätierenden ohne Aggregation diffus auf den Zellen verteilen (Nataro and Kaper 1998).

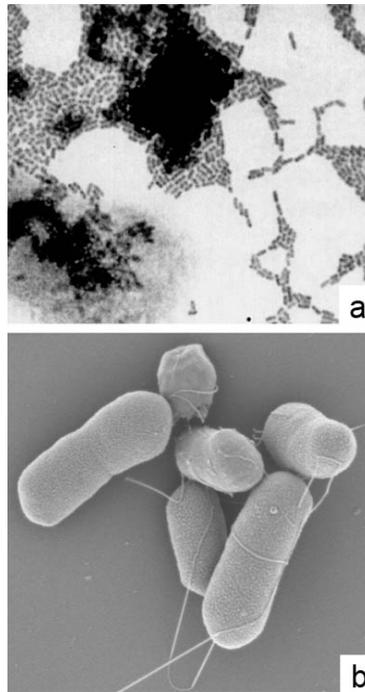


Abbildung 1-2: a: Aggregatives-Adhärenzmuster nach drei Stunden Inkubation von EAEC 042 mit HEp-2-Zellen. In der linken unteren Ecke befinden sich Bakterien, die an die Epithelzelloberfläche binden, auf dem zellfreien Untergrund sogenannte „stacked-brick“-Aggregate.
b: Die Rasterelektronenphotographie von EAEC 042 zeigt die flexiblen AAF/II-Fimbrien, die sowohl die Bakterien aneinander als auch an den Untergrund binden (Nataro 2005)

Die meisten EAEC beherbergen ein 60- bis 65-MDa Virulenzplasmid (pAA). Ein 1kb-Fragment dieses Plasmids, das *aatA* (Anti-Aggregationsprotein-Transportergen, früher EAEC-Sonde bzw. CVD 432 genannt), wird zum EAEC-Nachweis mittels PCR in epidemiologischen Studien verwendet (Zamboni, Fabbricotti et al. 2004; Nguyen, Le Van et al. 2005; Weintraub 2007). EAEC-Stämme, die das Virulenzplasmid exprimieren, werden als typisch, solche, die es nicht exprimieren, als atypische EAEC bezeichnet, wobei letztere trotzdem ein aggregatives Adhärenzmuster zeigen (Weintraub 2007). Das Virulenzplasmid kodiert zahlreiche Virulenzfaktoren, unter anderem die aggregativen Adhärenzfimbrien I, II und III, den Transkriptionsaktivator AggR, das enteroaggregative Enterotoxin EAST1, ein Zytotoxin (*pet*) und ein neues Antiaggregationsprotein (Dispersin), das vom *aap*-Gen kodiert wird (Tabelle 1-2:).

Zusätzlich exprimieren EAEC noch chromosomale Virulenzfaktoren, die aber nicht überall nachzuweisen sind. Bei den meisten der untersuchten EAEC-Stämme sind immer mehrere Virulenzfaktoren gleichzeitig nachweisbar (Sarantuya, Nishi et al. 2004; Zamboni, Fabbricotti et al. 2004).

Tabelle 1-2: Virulenzgene und –faktoren (Huang, Mohanty et al. 2006)

Gen	Beschreibung
Regulatorgen	
aggR	Hauptregulator der EAEC-Plasmid-Virulenzgene, schließt Gene ein, die Aggregative-Adhärenzfaktoren kodieren, Fimbrien AAF/I und AAF/II, Dispersin-Protein und weitere Genkomplexe
Fimbrien	
aggA	Kodiert AAF/I und die Hämagglutination von Erythrozyten
aafA	Kodiert AAF/II, das die Adhärenz an Kolonmukosa vermittelt
agg3	Kodiert AAF/III
Enterotoxine	
astA	Kodiert das enteroaggregative hitzestabile Toxin, das in Struktur und Funktion dem E. coli Sta-Toxin ähnlich ist
pet	Ein 108 kDa Autotransporter-Protein, das als hitzelabiles Entero- und Zytotoxin funktioniert
Dispersin Transporter	
aatA	Kodiert ein Protein, das das Dispersin-Protein aus der Zellmembran von EAEC transportiert
Sezernierte Proteine	
aap	Kodiert das 10 kDa Protein Dispersin und ist verantwortlich für die Verteilung der EAEC auf der Darmschleimhaut
pic	Kodiert ein 109 kDa Serin-Protease Protein, das u.a. zur Hämagglutination von Erythrozyten führen kann

EAEC-Infektionen haben eine Inkubationsdauer von acht bis achtzehn Stunden und verursachen meist wässrige, schleimige, sekretorische Durchfälle, die mit erhöhten Temperaturen und Übelkeit einhergehen können (Huang and Dupont 2004). In etwa einem Drittel der Fälle kommt es zu blutigen Stühlen (Cravioto, Tello et al. 1991). Nataro konnte 1995 durch die orale Gabe von EAEC an gesunde Probanden Diarrhoen auslösen (Nataro, Deng et al. 1995).

Enteroaggregative *E. coli* wurden vor allem in Entwicklungsländern (Tabelle 1-3) und dort vor allem bei persistierenden Diarrhoen, die länger als 14 Tage andauern, nachgewiesen (Henry, Udoy et al. 1992). In Indien (Kang, Mathan et al. 1995), in der Mongolei, Tanzania, Chile, Bangladesch und im Iran konnte EAEC als (Mit-)Auslöser für Diarrhoen, vor allem bei Kindern unter drei Jahren, isoliert werden (Nataro, Kaper

et al. 1987; Henry, Udoy et al. 1992; Bouzari, Jafari et al. 1994; Sarantuya, Nishi et al. 2004; Moyo, Maselle et al. 2007; Flores and Okhuysen 2009). In Brasilien konnten enteroaggregative *E. coli* in 68% der Fälle für persistierende Diarrhoen verantwortlich gemacht werden (Fang, Lima et al. 1995), auch in Mexiko (Cravioto, Tello et al. 1991) und Indien (Bhan, Khoshoo et al. 1989; Bhan, Raj et al. 1989; Bhatnagar, Bhan et al. 1993; Bhan, Bhandari et al. 1996) war der Nachweis von EAEC signifikant mit dem Auftreten von persistierenden Diarrhoen verbunden. Scaletsky konnte 1999 das aggregative Adhärenzmuster deutlich häufiger bei den *E. coli* aus dem Stuhl von Kindern mit Diarrhoen nachweisen, und zwar sowohl bei akuten als auch bei persistierenden Diarrhoen, der Unterschied erreichte allerdings keine Signifikanz (Scaletsky, Pedroso et al. 1999), genauso wie 2007 in Brasilien (Bueris, Sircili et al. 2007). In Hanoi, Vietnam war in einer Studie von Nguyen EAEC deutlich häufiger in der Patientengruppe mit Diarrhoen als in der Kontrollgruppe im Stuhl zu isolieren, in der Gruppe der Kinder unter zwei Jahren zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,005$) von 14,1% zu 5,9% in der Kontrollgruppe (Nguyen, Le Van et al. 2005). In einer Meta-Analyse konnte Huang 2006 zeigen, dass EAEC für 15% aller akuten Diarrhoen bei Kindern in Entwicklungsländern und für 4% in Industriestaaten verantwortlich ist (Huang, Nataro et al. 2006).

Aber auch in Industriestaaten konnte EAEC im Stuhl von Patienten mit Diarrhoen nachgewiesen werden (Huang, Nataro et al. 2006). EAEC sind das am häufigste isolierte bakterielle Pathogen bei Kindern mit Diarrhoe in den USA (Flores and Okhuysen 2009). Auch in Großbritannien (Smith, Scotland et al. 1994) und Deutschland (Huppertz, Rutkowski et al. 1997) wurde EAEC bei Kindern mit Durchfallerkrankungen nachgewiesen. 1997 erkrankten 2697 japanische Kinder (40,6%) nach einem Schulmittagessen an schweren Durchfällen, in 10% der Fälle konnte EAEC nachgewiesen werden (Itoh, Nagano et al. 1997). 2003 konnte Pabst in der Schweiz bei der Mehrzahl der untersuchten EAEC-Infektionen einen nahe zurückliegende Auslandsaufenthalt (v.a. Türkei und Balkan) nachweisen. Er konnte in 10% aller Durchfallerkrankungen EAEC nachweisen, das größte Risiko einer EAEC-Infektion mit einer Wahrscheinlichkeit von 11,9% hatten nach dieser Studie Kinder unter fünf Jahren (Pabst, Altwegg et al. 2003). In Italien führte der Verzehr von kontaminiertem Pecorino-Käse zur Infektion von insgesamt 24 Personen (Scavia, Staffolani et al. 2008). Möglicherweise ist die Zahl an EAEC-Infektionen auch grundsätzlich unterschätzt, da

viele an der Diagnostik Beteiligte möglicherweise nicht mit den entsprechenden Labormethoden vertraut sind (Huang, Mohanty et al. 2006).

Tabelle 1-3: Häufigkeit von Diarrhoen, ausgelöst durch EAEC, aufgeschlüsselt nach betroffener Population und untersuchter Region (Huang and Dupont 2004)

Betroffene Population	Untersuchte Regionen	Häufigkeit
Kinder	Entwicklungsländer	8-32% der Fälle von akuten Diarrhoen
		20-30% der Fälle von persistierenden Diarrhoen
Erwachsene Reisende	Entwicklungsländer/ Industriestaaten	9-26% der Fälle von akuter Reisediarrhoe
HIV-Infizierte	Bangui, Zentralafrika; Lusaka, Zambia; Nairobi, Kenya; USA	10-44% der Fälle von akuten Diarrhoen
	Bangui, Zentralafrika und Lusaka, Zambia	43-79% der Fälle von persistierenden Diarrhoen

Die Übertragung von Reisediarrhoen (Tabelle 1-3) erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel. Adachi konnte 2002 zeigen, dass enteroaggregative *E. coli* in mexikanischen Saucen in zahlreichen Restaurants nachgewiesen werden können. 66% der untersuchten Saucen aus bekannten Restaurants in Mexiko waren mit *E. coli* kontaminiert, davon konnten in 14 Fällen EAEC nachgewiesen werden. Dagegen konnten in 40% der untersuchten Saucen aus Houston, Texas *E. coli* in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Die mittlere Zahl der *E. coli* Kolonien pro Gramm Sauce war signifikant geringer in Houston (1000 bzw. 0 CFU/g, $p = 0,007$) (Adachi, Mathewson et al. 2002).

In den USA konnte Mayer EAEC bei Diarrhoen von HIV-Patienten (Tabelle 1-3) nachweisen (Mayer and Wanke 1995). Auch in Zentralafrika konnte gezeigt werden, dass persistierende Infektionen mit enteroaggregativen *E. coli* mit HIV-Infektionen assoziiert sind (Mossoro, Glaziou et al. 2002). In Südafrika war der Nachweis von EAEC signifikant mit Diarrhoen verbunden, außerdem wurde EAEC signifikant häufiger bei HIV-Patienten nachgewiesen (Huang, Nataro et al. 2006; Samie, Obi et al. 2007). In Brasilien konnte 1998 gezeigt werden, dass es bei Kindern, bei denen EAEC im Stuhl nachgewiesen werden konnte, unabhängig davon, ob eine Durchfallsymptomatik vorlag oder nicht, zu einer Wachstumsretardierung (signifikante Verrin-

gerung von Größe und Gewicht bezogen auf das Alter) kam (Steiner, Lima et al. 1998).

Da die EAEC-Infektion in den meisten Fällen selbstlimitierend ist, ist meist eine orale Rehydratationstherapie ausreichend. Falls doch notwendig, muss eine antimikrobielle Therapie individuell angepasst werden, da die Ansprechbarkeit geographisch durch Resistenzbildung variieren kann (Huang, Mohanty et al. 2006).

1.3. Diffus-adhärierende *E. coli* (DAEC)

Als weitere Gruppe der enterovirulenten *E. coli* gibt es die diffus adhärierenden *E. coli* (Abbildung 1-1b). Die Studienlage zur Pathogenität ist hier sehr widersprüchlich, da dieser Keim genauso häufig bei Patienten mit Diarrhoen wie auch bei gesunden Personen isoliert werden kann (Kaper, Nataro et al. 2004). Auch Scaletsky konnte 1999 keinen sicheren Zusammenhang zwischen dem diffusen Adhärenzmuster und dem Auftreten von Diarrhoen zeigen (Scaletsky, Pedroso et al. 1999). Sie wies 2002 DAEC in gleicher Häufigkeit bei Kindern mit und ohne Diarrhoen nach (Scaletsky, Fabbriotti et al. 2002).

1.4. Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

1995 wurde der enteropathogene *E. coli* vom 2. International Symposium on EPEC als *E. coli* definiert, der typische sogenannte A/E-Läsionen ausbildet und kein Shiga-Toxin produziert. EPEC, die das EAF-Plasmid besitzen, werden als typisch, solche, die es nicht besitzen, als atypisch bezeichnet. Dieses extrazelluläre Pathogen führt zu wässrigen Diarrhoen, Erbrechen und Fieber.

EPEC wurde zuerst von Bray 1945 als Ursache menschlicher Diarrhoen beschrieben (Chen and Frankel 2005) und war vor allem in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts für Ausbrüche von Gastroenteritiden bei Säuglingen verantwortlich, die mit einer hohen Mortalität einhergingen. Während Ausbrüche von EPEC-Infektionen bei Neugeborenen in Industriestaaten heute selten geworden sind, sind sie vor allem in Entwicklungsländern weiterhin eine wichtige Ursache für Diarrhoen bei Neugeborenen und Säuglingen. Sie haben dort immer noch eine Mortalität von bis zu 30% (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Nataro and Kaper 1998; Sarantuya, Nishi et al. 2004), da sie mit hohen Flüssigkeitsverlusten einhergehen können. Scaletsky konnte 1999

zeigen, dass typische EPEC die am häufigsten nachzuweisenden Bakterien bei Säuglingen mit Diarrhoen sind (Scaletsky, Pedroso et al. 1999). In Industriestaaten ist es im vergangenen Jahrhundert immer wieder zu EPEC-Ausbrüchen in Kindertagesstätten und Kinderkliniken gekommen (Nataro and Kaper 1998). Es ist unklar, warum vor allem Kinder unter 6 Monaten von EPEC-Infektionen betroffen sind, möglicherweise kommt es mit zunehmendem Alter zu einem Verlust von spezifischen Rezeptoren an Darmepithelien (Nataro and Kaper 1998). Risikogruppen wie Diabetiker, Menschen mit Achlorhydrie und alte Menschen sind gelegentlich von EPEC-Infektionen betroffen (Levine and Edelman 1984).

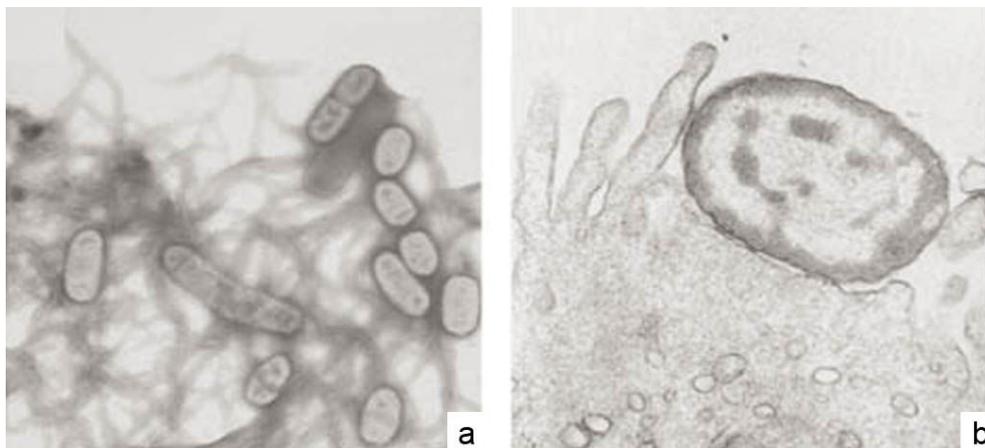


Abbildung 1-3: a: Elektronenmikroskopisches Bild einer Kultur von EPEC-Bakterien, die so kultiviert wurden, dass sie Typ-IV-Pili (BFP) exprimieren.
b: Elektronenmikroskopisches Bild eines EPEC, der eine A/E-Läsion an einer Wirtszelle ausbildet. Zu beachten ist der Verlust an Mikrovilli und die Ausbildung eines Sockels an der Wirtszelle, mit dem das Bakterium fest verbunden ist. (Donnenberg and Whittam 2001)

Die Pathogenese der enteropathogenen *E. coli* läuft in mehreren Schritten ab (Clarke, Haigh et al. 2003). Bei der Infektion kommt es zu einem spezifischen Adhäsionsmuster, der „lokalisierten Adhärenz“ (LA, Abbildung 1-1a) und zu sogenannten „attaching and effacing“-Läsionen (Anhaften und Auslösen, A/E-Läsionen) an den Enterozyten, die zuerst 1983 von Moon et al. beschrieben wurden (Moon, Whipp et al. 1983) (Abbildung 1-3b). Sie sind dadurch charakterisiert, dass es direkt unterhalb der adhärenierenden Bakterien zu einem lokalisierten Auslösen bzw. Zerstören der Mikrovilli und Veränderungen des Zytoskeletts kommt. Dabei kommt es durch die Akkumulation des Aktins zu einer sockelartigen Veränderung auf der Zelloberfläche,

auf der dann das Bakterium haftet. Durch diese A/E-Läsion wird der *E. coli* fest an die Zelloberfläche seiner Wirtszelle gebunden, was als wichtige Voraussetzung für seine Pathogenese angesehen wird. Denn nur unter dieser Bedingung kann es zu weiteren Interaktionen mit der Wirtszelle und damit zur Krankheitsentstehung kommen (Finlay and Falkow 1997).

Für die initiale Adhäsion der EPEC und Bildung von Mikrokolonien auf der Wirtszelloberfläche sind ungefähr 7nm große Fimbrien (Bundle-forming Pili - BFP) verantwortlich (Clarke, Haigh et al. 2003). Diese werden auf dem EAF (EPEC-Adhäsionsfaktor)-Plasmid kodiert (Chen and Frankel 2005) und führen sowohl zur Bildung von Mikrokolonien der Bakterien untereinander (Abbildung 1-3a), als auch zur Adhäsion der *E. coli* an die Wirtszelloberfläche (Clarke, Haigh et al. 2003).

Nach der initialen Adhäsion kommt es über verschiedene Effektorproteine zur Signaltransduktion in die Wirtszelle (Abbildung 1-4). Die Gene für die Signaltransduktion befinden sich alle auf einer „Pathogenitätsinsel“, genannt „locus of enterocyte effacement“ (LEE, Ort der Enterozytendestruktion), die weder bei den *E. coli* der menschlichen Mikrobiota noch beim ETEC nachgewiesen werden kann (Kaper, Nataro et al. 2004).

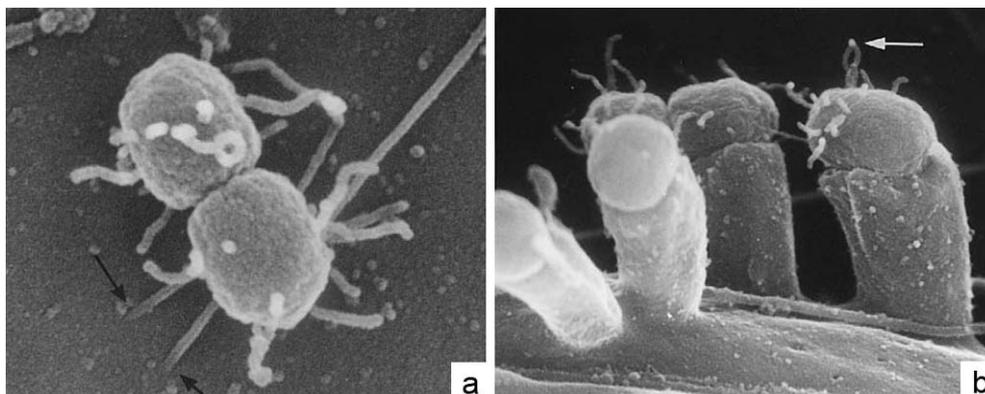


Abbildung 1-4: a: Elektronenphotographie, die EspA-Filamente zeigt (Schwarze Pfeile). Die Filamente verbinden EPEC-Bakterien mit HEL-Zellen und ermöglichen so die Translokation von Effektorproteinen.
b: Die Filamente sind auch auf der Oberfläche von EPEC zu sehen, die bereits A/E-Läsionen gebildet haben (Knutton, Rosenshine et al. 1998).

Auf der „Pathogenitätsinsel“ sind die Gene für verschiedene Effektorproteine kodiert, und zwar für die Esp (EPEC-sezernierte Proteine), Map (Mitochondrienassoziiertes

Protein), Intimin und sein Rezeptor, der Translozierte-Intimin-Rezeptor, die vom Bakterium nach der initialen Adhäsion produziert werden (Abbildung 1-4). EPEC ist nicht wie viele andere Bakterienarten auf einen Rezeptor der Wirtszelle angewiesen.

Im nächsten Schritt müssen die Proteine von der Bakterienzelle in die Wirtszelle transportiert werden, damit es zu einer Verstärkung der Bindung an die Wirtszelle kommen kann. Dafür ist bei vielen gram-negativen Darmpathogenen das sogenannte Typ-III-Sekretionssystem (Type Three Secretion System, TTSS) vorhanden. Es handelt sich um einen Multiproteinkomplex, der die Effektorproteine direkt in die Wirtszelle transportiert (Mecenas and Strauss 1996; Nougayrede, Fernandes et al. 2003; Chen and Frankel 2005). Erst dadurch kann es zur Zerstörung der Enterozyten, zur Sockelbildung und zu einer engen Bindung der Bakterien an die Wirtszelle kommen. Vermittelt wird das durch Intimin, ein bakterielles Protein, das vom *eae*-Gen kodiert wird (Chen and Frankel 2005). Etwa drei Stunden nach Infektion der Zelle beginnt die Ausbildung des Sockels (Abbildung 1-3b), der bis zu 10 µm hoch werden kann. Er sorgt für eine feste Haftung der Bakterien an der Wirtszelle, so dass sie nicht gewaschen werden können, aber trotzdem fast ausschließlich extrazellulär bleiben (Phillips, Giron et al. 2000; Chen and Frankel 2005). Die Sockel sind dynamische Strukturen, sie verändern ihre Form und Lage mit der Zeit, so dass sich die darauf befindlichen EPEC auf dem Darmepithel mit einer Geschwindigkeit von bis zu 0,07 µm/s bewegen (Sanger, Chang et al. 1996; Nataro and Kaper 1998).

Unklar ist bisher noch die Ursache für die klinisch nun folgende Gastroenteritis. Es bleibt fraglich, ob allein der Verlust der Mikrovilli und die dadurch resultierende Malabsorption zur Diarrhoe führt. Um die kurze Inkubationszeit von 4 bis 12 Stunden der EPEC-Infektion zu erklären, wird von einigen Autoren postuliert, dass es durch die EPEC (zusätzlich) zu einer aktiven Sekretion, z.B. von Chloridionen kommt (Chen and Frankel 2005).

1.5. Enterotoxische *E. coli* (ETEC)

Ein *E. coli*, der entweder ein hitzelabiles (LT – heat labile toxine) oder hitzestabiles (ST – heat stable toxine) Toxin oder sogar beide produzieren kann, ist ein enterotoxischer *E. coli* (Levine 1987). Man unterteilt das LT in LT I und II, wobei das LT I in Struktur und Funktion dem Cholera-toxin sehr ähnlich ist. Es gibt bisher keinen Hin-

weis darauf, dass LT II menschliche oder tierische Erkrankungen hervorruft (Nataro and Kaper 1998). ETEC wird vor allem verantwortlich gemacht für Diarrhoen bei Kindern in Entwicklungsländern und Reisediarrhoen (Nataro and Kaper 1998).

Eine mögliche Erklärung für die Pathogenese der ETEC ist die Endozytose der Toxine und nachfolgende Aktivierung der Adenylatzyklase an der basolateralen Zellmembran (Lencer, Constable et al. 1995). Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Chloridsekretion an der apikalen Zellmembran und einer Verminderung der Natriumchlorid-Absorption. Durch die erhöhte luminale Ionenkonzentration kommt es zum passiven Wassereinstrom ins Darmlumen und damit zu einer osmotischen Diarrhoe.

Hitzestabile Toxine (ST) werden in STa und STb unterteilt, sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Wirkmechanismus. Das STa führt, über eine Rezeptorbindung an der Wirtszelle, zu einer vermehrten Chloridsekretion und verminderten Natriumabsorption, was auch hier zu einem vermehrten Wassereinstrom ins Lumen führt (Nataro and Kaper 1998).

STb verursacht als einziges ETEC-Toxin direkte histologische Veränderungen am Darmepithel wie Mikrovillerverlust und -atrophie. Die Pathogenese ist noch relativ unklar, der Rezeptor an der Wirtszelle bislang noch unbekannt. Es wurde lediglich nachgewiesen, dass STb für eine erhöhte Bicarbonatsekretion ins Darmlumen verantwortlich ist (Sears and Kaper 1996).

1.6. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Enterohämorrhagische *E. coli* konnten erstmals 1983 als Ursache für hämorrhagische Colitiden (HC) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS, Kombination aus mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akuter Nephropathie) nachgewiesen werden (Karmali, Steele et al. 1983; Riley, Remis et al. 1983). Sie sind durch die Produktion eines Shiga-ähnlichen Toxins (Stx) und die Fähigkeit, A/E-Läsionen zu bilden, gekennzeichnet (Nataro and Kaper 1998). Durch das Stx kommt es zu einer Flüssigkeitsakkumulation im Darmlumen und histologischen Veränderungen an der Darmmukosa (O'Brien and Holmes 1987), möglicherweise verursacht durch eine selektive Destruktion der Mikrovilli (Keenan, Sharpnack

et al. 1986). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch den EHEC alleine zu unblutigen Diarrhoen kommt, Stx aber notwendig für die HC ist (Nataro and Kaper 1998). Auch wenn heute weitere Pathogene und auch Medikamente (z.B. das Chemotherapeutikum Gemcitabine) als Auslöser eines HUS gefunden wurden, ist in 90% der Fälle der Shiga-Toxin-produzierende *E. coli* die Ursache (Siegler and Oakes 2005).

Der wichtigste und am besten untersuchte Serotyp ist O157:H7 (Nataro and Kaper 1998), er verursacht in 10% aller Infektionen eine unblutige Diarrhoe, in 90% der Fälle eine HC. Bei Kindern unter 10 Jahren kommt es in 15% der Fälle zu einem HUS (Tarr, Gordon et al. 2005), in weniger als 5% der Fälle kann es zu zusätzlichen intestinalen und/ oder extraintestinalen Symptomen wie Cholezystitis, Pankreatitis, Darmperforation, Lungenödem oder neurologischen Symptomen kommen (Tarr 1995; Nataro and Kaper 1998; Siegler and Oakes 2005). EHEC ist, im Gegensatz zum EPEC, in Industrienationen ein wichtiges Pathogen. Warum es so selten bei Diarrhoen in Entwicklungsländern isoliert werden kann, ist bis heute unklar.

Die Übertragung erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, wie z.B. Hamburger und über das Trinkwasser (Nataro and Kaper 1998; Tarr, Gordon et al. 2005). Als Reservoir von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* sind Rinder, Schafe, Ziegen und Hühner bekannt (Beutin, Geier et al. 1993; Nataro and Kaper 1998).

1.7. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Als letzte Gruppe der enterovirulenten *E. coli* gibt es noch die enteroinvasiven *E. coli*, die biochemisch, genetisch und pathogenetisch sehr stark den Shigellen gleichen. Die Pathogenese ist bisher noch weitgehend unerforscht, sicher ist nur, dass es wie bei den Shigellen zu einer Invasion des Kolonepithels kommt.

EIEC verursacht wässrige Diarrhoen, die selten von blutigen und/ oder schleimigen Diarrhoen gefolgt sind und klinisch meist nicht von ETEC-Infektionen zu unterscheiden sind (Nataro and Kaper 1998).

1.8. Probiotika

Der Begriff Probiotikum stammt ursprünglich aus dem griechischen (pro bios), und bedeutet „für das Leben“. Schon Elie Metchnikoff, ein russischer Biologe und Nobelpreisträger, erkannte vor über hundert Jahren die Bedeutung von milchsäureproduzierenden Bakterien und führte die überdurchschnittlich hohe Lebenserwartung der Kosaken auf deren hohen Genuss von fermentierten Milchprodukten zurück. Für die Fermentation verantwortlich machte er einen Mikroorganismus, den er *Lactobacillus bulgaricus* nannte. Der Begriff Probiotikum wurde erstmals 1965 von Lilly und Stillwell verwendet (Lilly and Stillwell 1965).

Fuller definierte Probiotika 1989 als „Zubereitung mit lebenden Mikroorganismen, welche nach oraler Aufnahme die intestinale bakterielle Flora verändern und dadurch spezifische Gesundheitsstörungen beseitigen oder verhüten“ (Fuller 1989). Salminen et al. definierten Probiotika 1998 als „einen lebenden mikrobiellen Zusatz, der für die Gesundheit von Vorteil ist“. Die aktuelle Definition für probiotische Bakterien stammt von der WHO/ FAO aus dem Jahre 2002: Probiotika sind lebende Organismen, die, in adäquater Menge zugeführt, dem Wirt einen gesundheitlichen Vorteil bringen.

Zur Stoffgruppe der Probiotika gehören sowohl Bakterien wie Laktobazillen, Bifidobakterien, als auch manche *E. coli*-Stämme (z.B. *E. coli* Nissle 1917), aber auch bestimmte Pilze, vor allem Hefen (*Saccharomyces*).

Bifidobakterien sind gram-positive, nicht-sporenbildende, obligat anaerobe Stäbchen, die je nach Wachstumsbedingungen sehr unregelmäßig geformt sein können. Die mehr als 30 unterschiedlichen Spezies können sowohl Milchsäure als auch Essigsäure produzieren (Poupard, Husain et al. 1973).

Vor allem im Darm gestillter Kinder scheinen Bifidobakterien die dominierende Bakterienspezies zu sein (Ramakrishna 2007), während der Darm nicht-gestillter Kinder schon sehr früh auch andere Arten von Bakterien enthält (Kleerebezem and Vaughan 2009). Bei Erwachsenen machen sie weniger als 10 % der intestinalen Mikrobiota aus (Poupard, Husain et al. 1973; Tannock 2002), nach einer Studie von Sghir sogar weniger als 1 % (Sghir, Gramet et al. 2000). Schon 1955 stellten Rose und

Gyorgy einen inhibitorischen Effekt von *Bifidobacterium bifidum* auf das Wachstum anderer Bifidobakterienstämme und *E. coli* fest (Gyorgy and Rose 1955).

Zur Gruppe der *Laktobazillen* gehören mehr als 70 verschiedene Spezies. Es handelt sich um gram-positive, nicht-sporenbildende, mikroaerophile Stäbchen, die zur natürlichen Mikrobiota des Menschen gehören (Penders, Thijs et al. 2006). Allerdings machen sie nach den Beobachtungen von Sghir nur etwa 1 % der Mikrobiota aus (Sghir, Gramet et al. 2000). Sie werden, genauso wie auch Bifidobakterien, als Milchsäureproduzenten in vielen Produkten wie Käse-, Fleisch- und Wurstwaren, sowie Sauerkraut gefunden. Wenn auch äußerst selten, können sie bei Patienten mit einem gestörten Immunsystem generalisierte Infektionen wie eine Endokarditis (*Lactobacillus acidophilus*, *casei* subsp. *rhamnosus*) oder eine Urosepsis verursachen (Griffiths, Daly et al. 1992; Saxelin, Chuang et al. 1996; Husni, Gordon et al. 1997; Carr, Chill et al. 2002; Tannock 2002; Tannock 2004; Salvana and Frank 2006; Vresse 2008). 1999 konnte als Ursache eines Leberabszesses bei einer 74-jährigen Diabetikerin *Lactobacillus rhamnosus* nachgewiesen werden, der von dem probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* GG, den sie in hoher Zahl in Form von Trinkjoghurt zu sich genommen hatte, nicht zu unterscheiden war (Rautio, Jousimies-Somer et al. 1999). 2005 führte ein *Lactobacillus*-Stamm, der von *Lactobacillus rhamnosus* GG nicht zu unterscheiden war, bei zwei Patienten zu einer Bakteriämie. Beide hatten zuvor *Lactobacillus rhamnosus* GG oral erhalten (Land, Rouster-Stevens et al. 2005). Es handelte sich hierbei um ein Kind mit einem korrigierten komplexen Herzfehler und ein Kind mit infantiler Zerebralparese, das kurz zuvor operiert worden war.

Probiotika sind heutzutage zahlreichen Lebensmitteln wie zum Beispiel Joghurts, anderen Milchprodukten und Säuglingsmilchen zugesetzt. Außerdem befinden sie sich in Pulver- und Kapselform auf dem Markt. Die Keime müssen zahlreiche Anforderungen erfüllen, damit sie als probiotische Keime verwendet werden dürfen (s. Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Anforderungen an probiotische Keime (de Roos and Katan 2000; Heyman and Menard 2002; van de Guchte, Serror et al. 2002; Collado, Gueimonde et al. 2005), WHO 2001

Anforderungen an probiotische Keime
- Menschliche Herkunft
- Fehlende Pathogenität und Toxizität
- Widerstandsfähigkeit beim Verarbeitungsprozess
- Fähigkeit, den Transit durch den Gastrointestinaltrakt zu überleben (Magensäure, Gallensalze)
- Adhäsionsfähigkeit an Enterozyten
- Zumindest temporäre Kolonisierung und Vermehrung
- Produktion antimikrobieller Substanzen
- Fähigkeit, metabolische Aktivität zu beeinflussen

Adhärenz und Kolonisierung des Darms sind wichtige Voraussetzungen für Probiotika. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Bakterienstämme, die nicht zur autochthonen Mikrobiota gehören, nicht persistieren, wenn man die orale Zufuhr stoppt (Sanders and Klaenhammer 2001). Wichtig ist außerdem, dass Probiotika selbst nicht Krankheiten beim Menschen auslösen (Sanders and Klaenhammer 2001). Probiotika müssen magensäureresistent sein oder es muss durch ihre Darreichungsform oder Konsum mit anderen Lebensmitteln (z.B. Milch) sichergestellt werden, dass sie nicht mit ihr in Berührung kommen (Dunne, Murphy et al. 1999; Sanders and Klaenhammer 2001).

Probiotika senken den intestinalen pH-Wert (Gibson, McCartney et al. 2005) und produzieren antimikrobielle Substanzen: Milch- und Essigsäure, Wasserstoffperoxid (wenn Sauerstoff verfügbar ist), Diacetyl, und möglicherweise auch bakterio-statische oder bakteriozide Peptide bzw. Proteine (Sanders and Klaenhammer 2001) wie Nisin (gewonnen aus *Lactococcus lactis*) (Jack, Tagg et al. 1995). Bakteriozine wie Nisin sind Proteinbestandteile, die eine bakterio-statische oder bakteriozide Wirkung gegen andere, artverwandte Bakterien entwickeln (Jack, Tagg et al. 1995). Für *Lactobacillus acidophilus* konnte ein Bakteriozin namens Lactacin B nachgewiesen werden, dass allerdings nur andere Laktobazillen und *Enterococcus faecalis* inhibierte, Aktivität gegen Pathogene konnte nicht nachgewiesen werden (Sanders and Klaenhammer 2001).

Da den Probiotika zahlreiche positive Effekte auf die Gesundheit zugeschrieben werden, ist das Interesse an ihrer klinischen Nutzung und kommerziellen Anwendung sehr groß. So sollen sie Harnwegsinfekten und vaginalen Infektionen vorbeugen können (Sanders and Klaenhammer 2001; Gorbach 2002; Macfarlane and Cummings 2002; Hay 2009). Außerdem sollen sie Diarrhoen verhindern oder zumindest den klinischen Verlauf abschwächen, da die probiotischen Keime unter anderem mit den Pathogenen um Bindungsstellen an den Enterozyten konkurrieren (de Roos and Katan 2000; Forestier, De Champs et al. 2001; Macfarlane and Cummings 2002; Gibson, McCartney et al. 2005; Vandenplas, Salvatore et al. 2007).

In zahlreichen Studien konnten *Lactobacillus GG* die Diarrhoedauer bei hospitalisierten Kindern mit Rotavirus-Infektion von durchschnittlich 3,5 auf 2,5 Tage verkürzen (de Roos and Katan 2000; Gorbach 2002; Goldin and Gorbach 2008; Guandalini 2008). Saavedra konnte zeigen, dass die prophylaktische Gabe einer Kombination aus *B. bifidum* und *S. thermophilus* die Inzidenz einer Gastroenteritis bei hospitalisierten Kindern vermindern kann (Saavedra, Bauman et al. 1994). Sarker wies 2006 nach, dass der *Lactobacillus paracasei* ST11 zwar in der Therapie von Rotavirusinfektionen nicht effektiv ist, aber eine klinische Verbesserung bei Patienten mit Diarrhoen, die nicht durch Rotaviren induziert sind, bewirkt (Sarker, Sultana et al. 2005).

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Laktobazillen die Inzidenz von Diarrhoen bei Kindern vermindern können (Szajewska, Kotowska et al. 2001; Mastretta, Longo et al. 2002; Szajewska, Ruszczynski et al. 2006; Szajewska, Setty et al. 2006; Szajewska, Skorka et al. 2007; Ruszczynski, Radzikowski et al. 2008). Wenus konnte 2007 mit einem probiotischen Milchtrunk, bestehend aus LGG, La-5 und Bb-12, allerdings mit einer sehr kleinen Fallzahl, das Risiko einer antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankung bei Erwachsenen um 80% reduzieren (Wenus, Goll et al. 2007).

Szajewska stellte 2006 fest, dass die Mikrobiota von Frühgeborenen im Gegensatz zu reifen Neugeborenen praktisch keine Bifidobakterien beinhaltet. Diese veränderte Mikrobiota scheint die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) bei Frühgeborenen zu begünstigen (Szajewska, Setty et al. 2006; Caplan 2009). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Gabe von Probiotika präventiv auf die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis bei Frühgeborenen auswirkt,

offenbar wird durch die Aufnahme der Probiotika die Mikrobiota des Darmes so modifiziert, dass die Pathogene durch die neu hinzugekommenen Keime im Wachstum inhibiert werden (Hoyos 1999; Bin-Nun, Bromiker et al. 2005; Lin, Su et al. 2005; Barclay, Stenson et al. 2007; Alfaleh and Bassler 2008; Claud and Walker 2008; Martin and Walker 2008). Walker geht davon aus, dass die NEC durch eine inadäquate, unreife und überschießende Entzündungsreaktion sowohl durch pathogene als auch durch symbiotische Bakterien ausgelöst werden kann (Walker 2008). Dani konnte 2002 dagegen die Inzidenz der nekrotisierenden Enterokolitis bei Frühgeborenen durch die prophylaktische Gabe von *Lactobacillus GG* nicht reduzieren (Dani, Biadaioli et al. 2002). Mohan konnte nachweisen, dass die Gabe von *Bifidobacterium lactis Bb12* an Frühgeborene zu einer Erhöhung der Anzahl an Bifidobakterien und Verringerung von Enterobakterien und Clostridien führte (Mohan, Koebnick et al. 2006). Problematisch bleibt hierbei, dass es Fallberichte über Bakteriämie und Sepsis durch Laktobazillen bei kritisch kranken Kindern und Erwachsenen gibt (Thompson, McCarter et al. 2001; Salminen, Rautelin et al. 2004; Land, Rouster-Stevens et al. 2005).

Über die Gabe von Probiotika bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gibt es vielversprechende Ergebnisse (Vanderpool, Yan et al. 2008). Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist bis heute noch nicht genau geklärt, es werden unter anderem Interaktionen zwischen dem Wirt, der Schleimhautimmunität und dem Darmmilieu verantwortlich gemacht. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass sich die Mikrobiota von Patienten mit CED von gesunden Probanden unterscheidet und zudem instabil ist. Bei Patienten mit CED konnten einerseits immer wieder höhere Konzentrationen an *Bacteroides vulgatus* und einigen *E. coli*, andererseits eine Reduktion an Laktobazillen und Bifidobakterien im Stuhl nachgewiesen werden (Marteau, Lepage et al. 2004). In zwei Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von *Escherichia coli* Nissle 1917 genauso erfolgreich ist wie die Gabe von Mesalazin zur Remissionserhaltung bei Patienten mit einer Colitis ulcerosa (Kruis, Schutz et al. 1997; Rembacken, Snelling et al. 1999). Auch Patienten mit einer Pouchanlage bei Colitis ulcerosa wurden mit Probiotika (Mischung VSL#3, bestehend aus *Lactobacillus acidophilus*, *paracasei*, *plantarum* und *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *breve* und *infantis* und *Streptococcus thermophilus*) bzw. Antibiotika behandelt, um einer Pouchitis vorzubeugen oder sie

zu therapieren. Auch hier schienen Probiotika wie VSL#3 sowohl zur primären als auch zur sekundären Prävention bei Erwachsenen gut geeignet und den Antibiotika nicht unterlegen zu sein (Gionchetti, Rizzello et al. 2000; Gionchetti, Rizzello et al. 2003; Chapman, Plosker et al. 2006; Chapman, Plosker et al. 2007; Liptay 2008).

Zur Therapie des Morbus Crohn gibt es sehr widersprüchliche Ergebnisse, bisher konnte noch kein sicherer Effekt der Probiotika auf die Erkrankung nachgewiesen werden (Szajewska, Setty et al. 2006). Auch gibt es leider bisher kaum Studien zur Effektivität der Probiotikagabe bei Kindern mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Liptay 2008).

Probiotika werden immer wieder zahlreiche weitere positive Effekte auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben, wie Senkung des Cholesterinspiegels, Verhinderung der Karzinogenese, Verminderung des Tumorwachstums, dazu ist die Studienlage aber sehr widersprüchlich (de Roos and Katan 2000; Sanders and Klaenhammer 2001; Vrese 2008). Das Immunsystem des Darms muss auf der einen Seite Pathogene abwehren, auf der anderen Seite aber eine Toleranz gegenüber harmlosen Lebensmitteln und Bakterien entwickeln (orale Toleranz des Immunsystems), ansonsten kann es unter anderem zu Lebensmittelallergien kommen (Vaarala 2003). Orale Toleranz entsteht, wenn harmlose Antigene und symbiotische Bakterien die Mukosa überqueren und mit mukosalen regulatorischen T-Zellen interagieren, die Zytokine freisetzen (z.B. TGF- β , Wachstumsfaktor). Diese Zytokine vermitteln daraufhin die Down-Regulation der humoralen und zellulären Immunantwort auf diese Antigene (Walker 2008). In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Behandlung von Kindern mit Lebensmittelallergien und atopischen Ekzemen mit Probiotika (Gorbach 2002; Macfarlane and Cummings 2002; Szajewska, Setty et al. 2006). Bjorksten konnte in einer Studie zeigen, dass die intestinale Mikrobiota eine mögliche Quelle für die Entwicklung von Allergien ist. Bei Kindern, die später Allergien entwickelten, fanden sich im ersten Lebensmonat deutlich weniger Bifidobakterien und Enterokokken in der Mikrobiota, aber mehr Clostridien und Staphylococcus aureus im Vergleich zu gesunden Kindern (Bjorksten, Sepp et al. 2001).

In einer Studie von Kalliomäki wurde der Einfluss von Lactobacillus GG auf die Prävention eines atopischen Ekzems bei Säuglingen mit einem hohen Risiko (Familienanamnese von Atopie) untersucht. Lactobacillus GG wurde Schwangeren 2-4 Wo-

chen vor und nach der Geburt für 6 Monate entweder der stillenden Mutter oder dem Kind in Form von Kapseln verabreicht. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko, ein atopisches Ekzem zu entwickeln, nur halb so hoch war wie in der Placebogruppe. Auch in den Follow-Up-Studien verminderten Probiotika, und auch die vermehrte Einnahme von Retinol, Calcium und Zink, das Risiko eines atopischen Ekzems in den ersten vier Lebensjahren (Kalliomaki, Salminen et al. 2001; Kalliomaki, Salminen et al. 2003; Laitinen, Kalliomaki et al. 2005; Isolauri and Salminen 2008). Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten den protektiven Effekt der Probiotika nicht nachvollziehen oder bei Subgruppen sogar eine verstärkte Ausprägung der atopischen Dermatitis nachweisen (Brouwer, Wolt-Plompen et al. 2006; Taylor, Dunstan et al. 2007; Kopp 2008).

Besselink konnte 2008 zeigen, dass die Gabe von Probiotika an Patienten, die an einer akuten schweren Pankreatitis erkrankt sind, ein erhöhtes Mortalitätsrisiko zur Folge hat (Besselink, van Santvoort et al. 2008).

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Darms ist die Fähigkeit von probiotischen Keimen, an die Darmmukosa bzw. an mukosale Glykoproteine zu adhären, da dies die Voraussetzung für die Inhibition der Pathogene (Coconnier, Lievin et al. 1997; Collins and Gibson 1999; Forestier, De Champs et al. 2001; Gopal, Prasad et al. 2001; He, Ouwehand et al. 2001; Juntunen, Kirjavainen et al. 2001) und die Modulation des Immunsystems ist (Isolauri, Sutas et al. 2001). Enteropathogene Keime können die Synthese von Interleukinen (unter anderem Interleukin-6 und 8) durch Kontakt mit Darmepithelzellen induzieren. Morita konnte 2002 nachweisen, dass von den von ihm untersuchten 30 Probiotika nur zwei zu einer geringen Interleukinproduktion führten, während der enteropathogene *Bacillus subtilis* einen signifikanten Anstieg in der Interleukinproduktion von Caco2-Zellen hervorrief. Steiner konnte bereits 2000 zeigen, dass auch der enteroaggregative *E.coli* 042 zu einer Interleukin-8-Freisetzung aus Caco2-Zellen führt (Steiner, Nataro et al. 2000). Morita führte diese Ergebnisse darauf zurück, dass Probiotika im Gegensatz zu enteropathogenen Keimen an Darmepithelzellen adhären können, ohne eine lokale Entzündungsreaktion hervorzurufen und stattdessen auf andere Weise mit den Zellen interagieren (Morita, He et al. 2002). In anderen Studien erhöh-

ten Probiotika die Synthese von Interferonen, die antagonistisch zu Interleukinen wirken, was zusätzlich antiinflammatorisch wirken kann (Cross and Gill 2001).

2. Fragestellung

Enteroaggregative *E. coli* gehören zu den wichtigsten Auslösern von akuten und persistierenden Diarrhoen sowohl in Entwicklungsländern als auch in Industriestaaten, insbesondere bei Kindern im ersten Lebensjahr. In der vorliegenden Arbeit sollen die Interaktionen zwischen enteroaggregativen *E. coli* und probiotischen Bakterien untersucht werden, da die genauen Mechanismen, durch welche Probiotika in der Lage sind, Infektionen mit *E. coli* zu verhindern, noch nicht genau bekannt sind.

Um die Interaktion zwischen Probiotika und *E. coli* näher zu betrachten, werden Zellbindungsassays an einem Dünndarmmukosamodell, den Caco2-Zellen, durchgeführt. Um zu überprüfen, inwieweit die Adhäsionsfähigkeit der Probiotika von Bedeutung ist, soll in einem ersten Schritt festgestellt werden, ob Probiotika an Darmepithel adhären und auf diese Weise dadurch dann möglicherweise die Mikrobiota des Darms verändern könnten.

Abschließend soll die Frage beantwortet werden, ob sezernierte Proteine oder Zellwandbestandteile die Adhäsionsfähigkeit von EAEC verändern. Dafür werden Zellbindungsassays mit bakterienfreien Überständen bzw. mit Hilfe von UV-Licht inaktivierten Probiotika durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Caco2 - Zellkultur

Die verwendeten Caco2-Zellen stammen aus der American Type Culture Collection, Rockville, USA (Stamm HTB-37). Es werden die Passagen 36 bis 47 verwendet. Alle Arbeiten mit der Zellkultur werden in einer Laminar-Air-Flow-Arbeitsbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Die Zellen werden bei 37°C, 5 % Kohlendioxidgehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Als Kulturmedium wird dem Minimum Essential Eagle's Medium (Sigma) 20 % FCS (Biochrom AG), 50 U/ml Penicillin/ Streptomycin (Sigma), je 1 % Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren und Natriumpyruvat (Gibco) zugefügt. Der Mediumwechsel erfolgt dreimal pro Woche.

Das Passagieren der Zellen erfolgt bei Subkonfluenz durch enzymatisch-proteolytisches Ablösen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/ 0,02 % (w/ v), Biochrom AG). Dazu werden die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS pH 7,3 Serag Wiessner) gewaschen und dann hiermit für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient dazu, Serumrückstände auf den Zellen zu entfernen, die später zu einer Trypsininhibition führen würden. Außerdem wird den Zellen durch das calciumfreie PBS Calcium entzogen, so dass sich die Zell-Zell-Verbände lockern.

Danach wird das PBS entfernt, die Zellen mit Trypsin bei 37°C für 10 min inkubiert und dann die Zellen möglichst vollständig abgelöst. Als nächstes wird die Trypsin-Zell-Suspension in Kulturmedium (s.o.) überführt, um das Trypsin zu inaktivieren und somit die Proteolyse zu stoppen. Anschließend wird die Suspension für 5 Minuten bei 20°C und 302 x g zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Rotixa 120 RS), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert.

Im Folgenden werden die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:6 auf Zellkulturflaschen verteilt oder auf 12-Well-Platten (Falcon, Firma Becton-Dickinson) ausgesät. Hierfür wird die Anzahl der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit einer Dichte von 5×10^5 bzw. 1×10^5 Caco2-Zellen auf jedes Well verteilt.

Die Zellen waren auf den 12-Well-Platten am 3. bis 4. Tag nach Aussaat konfluent, die Versuche werden am 13. bis 15. Tag nach Aussaat durchgeführt. Vor und nach jedem Arbeitsschritt wird die Zellkultur mikroskopisch kontrolliert.

3.2. Bakterien

Escherichia coli

Der in den Versuchen verwendete Stamm DEF40 ist ein klinisches Isolat und wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um einen enteroaggregativen *E. coli*, ein klinisches Isolat (Diarrhoe), Serogruppe O78, eae-, stx1-, stx2-, O157-Gen-, clyA+ (Ludwig, von Rhein et al. 2004)

Für alle Versuche wird der bei -80°C aufbewahrte *E. coli* DEF40 für 16-18 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C auf Müller-Hinton- oder Columbia-Blutagarplatten (Biomérieux) angezüchtet.

Probiotische Bakterien

Die untersuchten Stämme wurden vom Institut für Mikroökologie, Herborn zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um:

Lactobacillus (para)casei DSM 11358

Lactobacillus acidophilus La5

Lactobacillus salivarius DSM 11361

Bifidobacterium lactis Bb12

Bifidobacterium bifidum DSM 16781

Lactococcus lactis DSM 11360

Alle Stämme werden auf deMan-Rogosa-Sharpe-Agar (M.R.S.; Oxoid) 48 Stunden bei 37°C angezüchtet. Die Keime werden in einem Anaerobentopf (Oxoid) inkubiert und mit Hilfe des Anaerogenkits (Oxoid) in anaerobem Milieu mit 8-14 % CO₂ inkubiert. Der *Lactococcus lactis* (aerob) wird auf Müller-Hinton-Platten angezüchtet und in aerobem Milieu mit 8-14 % CO₂ inkubiert. Alle probiotischen Keime werden immer mit einer Inokulationsdosis von 1x10⁸ CFU/ml eingesetzt.

Kryokonservierung

Die Bakterien werden in THB (*E. coli* DEF40) bzw. MRS-Brühe (*Lactobacillus* (*para*)*casei* DSM 11358, *Lactobacillus acidophilus* La5, *Lactobacillus salivarius* DSM 11361, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Bifidobacterium bifidum* DSM 16781, *Lactococcus lactis* DSM 11360) für 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dann wird 20 % Glycerol (Sigma) hinzugefügt und die Bakterien bei -80°C eingefroren.

Wachstumskurven

Alle probiotischen Keime hatten bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm ab einer photometrisch eingestellten Extinktion von 0,650 eine Konzentration von 1x10⁸ CFU/ml und ließen sich auch nach 8 Stunden Wachstum nicht weiter konzentrieren.

Für den DEF40 wurden keine Wachstumskurven erstellt, da er auf Agarplatten angezüchtet wurde. Wenn sie in Medium gewachsen wären, wäre das Erreichen der log-Phase wichtig gewesen, um sicher zu sein, dass die Bakterien nicht in der Brühe absterben.

Markierung der Bakterienstämme mit Fluorescein-Isothiocyanat

Die angezüchteten Bakterien werden mit kaltem Boratpuffer (20 mM Borsäure in 0,9 % NaCl, pH 9), von den Agarplatten gelöst und zweimal gewaschen (4000 x g, 4°C, 10 min).

Danach wird das Sediment in 1 ml Boratpuffer resuspendiert, 200 µl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Sigma) zugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Um den freien Farbstoff von den markierten

Bakterien zu trennen, werden 10 ml 0,01-molares PBS unter Zugabe von 6 % BSA (Sigma) mit der Bakteriensuspension überschichtet und bei 4000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (4000 x g, 4°C, 10 min) mit 0,01 M PBS, supplementiert mit 0,1 % BSA, war der Überstand klar und die Bakterien werden mit serum- und antibiotikafreiem Medium photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm auf eine Extinktion von $0,650 \pm 0,05$ eingestellt. Die Extinktion entspricht beim *E. coli* DEF40 einer Bakteriendichte von 1×10^9 CFU/ml, bei den probiotischen Keimen 1×10^8 CFU/ml.

An jedem Versuchstag werden von allen eingestellten Bakteriensuspensionen Verdünnungsreihen erstellt und ausplattiert, um die Inokulationsdosen zu überprüfen.

Unmarkierte Bakterienstämme

Für die Versuche, bei denen die Interaktion zwischen *E. coli* und Probiotikum untersucht wird, ist immer der *E. coli* FITC-markiert, die Probiotika werden mit PBS von der Agarplatte gelöst und einmal bei 4392 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und in serum- und antibiotikafreiem Medium resuspendiert, bevor sie photometrisch auf eine Extinktion von 0,650 eingestellt werden.

3.3. Zellbindungsassay

Adhäsion von FITC-markierten Bakterien an Caco2-Zellen

Alle Versuche werden im Dreifachansatz durchgeführt.

Nach dreimaligem Waschen der Caco2-Zellen mit serum- und antibiotikafreiem Caco2-Medium wird jedem Well 1 ml der FITC-markierten Bakterien mit einer Inokulationsdosis von 1×10^8 CFU/ml (gegebenenfalls verdünnt mit serum- und antibiotikafreiem Medium) zugegeben und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um alle nicht adhärenen Bakterien zu entfernen. Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten mit Formalin fixiert, damit es zu keiner weiteren Zell-Bakterieninteraktion mehr kommen kann und mikroskopisch ausgezählt.

Ultraschalllyse

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung ist das Lysieren der Caco2-Zellen am Ende der Inkubationszeit und Ausplattieren der *E. coli* DEF40.

Nach Kultivierung werden die Probiotika mit PBS (37°C) von den Agarplatten gelöst und zweimal gewaschen (4000 x g, 4°C, 10 min). Dann folgt die photometrische Einstellung der Bakterien mit serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium. Nach dreimaligem Waschen der Caco2-Zellen mit warmem PBS wird 1 ml der eingestellten Probiotika auf jedes Well gegeben.

Nach Beendigung der zweistündigen Inkubationszeit bei 37°C werden die Caco2-Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor anschließend 2 ml HBSS/ HEPES auf die Zellen gegeben werden.

Zum Lysieren der Zellen wird jedes Well mit der Sonotrode (Bandelin Electronics) für 20 Sekunden beschallt. Von dem Lysat werden Verdünnungsreihen angefertigt und auf MRS-Agar ausplattiert, um möglicherweise adhärente Bakterien auszuzählen.

Adhäsion der Bakterien an die Multiwell-Platten

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Ultraschalllyse allein auf die Bakterienadhäsion an die Caco2-Zellen oder auch auf Adhäsion an das Plastik der Multiwell-Platten zurückzuführen sind, werden die photometrisch eingestellten Bakteriensuspensionen auf neue 12-Well-Platten ohne Zellrasen gegeben und unter gleichen Bedingungen (s. 3.1) inkubiert. Danach werden die Platten auch hier dreimal mit PBS gewaschen und dann wird die Bakterienadhäsion fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

3.4. Vorversuche

Zellkultur

Es werden sowohl 1×10^5 Zellen als auch 5×10^5 Zellen pro Well ausgesät und die Bakterienadhäsion mit verschiedenen *E. coli*-Inokulationsdosen verglichen.

Bakterienkonzentration

Nach Vorversuchen wird als Bakterienkonzentration 1×10^8 CFU/ml photometrisch eingestellt.

Bakterizidieassay

Um das Wachstum der einzelnen Bakterienstämme im Medium zu überprüfen, werden die Bakterien mit Medium in 12-well-Platten ohne Zellrasen für zwei Stunden inkubiert (s. Zellbindungsassay 3.3.1). Des Weiteren werden auch Koinkubationen auf die gleiche Weise mit *E. coli* DEF40 und den Probiotika durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Bakterien bereits ohne Caco2-Zellen miteinander interagieren.

3.5. Bakterienadhäsion unter Zusatz von Mannose

Da Mannose die Adhäsion von *E. coli* an Darmepithelzellen hemmen soll, wird dem FITC-markierten Bakterienstamm 1 % D(+)-Mannose (Merck) zugefügt, damit die Typ-I-Fimbrien der Bakterien durch die Mannose besetzt sind. Die Mannose-Bakteriensuspension wird 15 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wird der Zellbindungsassay mit der Bakterien-Mannose-Suspension wie oben beschrieben durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob Mannose einen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der Probiotika hat, werden die Versuche mit allen probiotischen Keimen analog zum DEF40 durchgeführt.

3.6. Koinkubation *E. coli* mit probiotischen Bakterien auf Caco2-Zellen - Konkurrenz

Um herauszufinden, ob es durch gleichzeitige Zugabe der verschiedenen Bakterienarten auf die Caco2-Zellen zu einer Verminderung der Adhäsion der *E. coli* kommt, werden 1 ml Probiotikum bzw. 1 ml serumfreies Medium als Kontrollwert gleichzeitig mit 100 μ l *E. coli* DEF40 (1×10^9 CFU/ml) auf die Caco2-Zellen gegeben und wie unter 3.1 beschrieben inkubiert.

3.7. Vorinkubation *E. coli* auf den Caco2-Zellen - Verdrängung

Um die Frage zu beantworten, ob Probiotika in der Lage sind, schon adhärierende *E. coli* wieder von ihren Bindungsstellen zu entfernen, wird eine Versuchsreihe zur Verdrängung durchgeführt.

Nach einstündiger Inkubation der Caco2-Zellen mit den *E. coli* DEF40 (Inokulationsdosis: 1×10^8 CFU/ml) werden die nicht adhärierenden *E. coli* mit PBS von den Caco2-Zellen gewaschen und anschließend 1 ml Probiotikum bzw. 1 ml serumfreies Medium als Kontrollwert auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit nach Zugabe des Probiotikums beträgt zwei weitere Stunden.

3.8. Vorinkubation der probiotischen Bakterien auf den Caco2-Zellen - Exklusion

Umgekehrt soll jetzt die Frage beantwortet werden, ob Probiotika in der Lage sind, zu verhindern, dass *E. coli* überhaupt adhären können.

Nach einstündiger Inkubation der Caco2-Zellen mit Probiotikum bzw. serumfreiem Medium werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 1 ml *E. coli* DEF40 (1×10^8 CFU/ml) zugegeben und weitere 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.9. Koinkubation *E. coli* mit UV-inaktiviertem *Lactobacillus acidophilus* bzw. mit Überständen von *Lactobacillus (para)casei* und *acidophilus*

Probiotika sezernieren zahlreiche Proteine. Um zu klären, ob diese einen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit von *E. coli* haben, wird *Lactobacillus acidophilus* mit Hilfe von UV-Licht inaktiviert und es werden Überstände von *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus (para)casei* hergestellt und Adhäsionsassays durchgeführt.

Sowohl für die folgende Herstellung der Überstände als auch für die Inaktivierung durch UV-Licht wird *Lactobacillus acidophilus* auf MRS-Agar 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert und danach in 10 ml Minimum Essential Eagle's Medium (Sigma) ohne Phenolrot, mit Glutamin und $MgCl_2$ gegeben und gewaschen (4392 x g, 4°C, 10 min). Anschließend wird die Bakterienkonzentration photometrisch mit einer Verdünnungsreihe bestimmt (1×10^8 CFU/ml).

Inaktivierung von Lactobacillus acidophilus mit UV-Licht

Für die UV-Bestrahlung werden je 5ml Bakteriensuspension (s. 3.9) in eine pyrogenfreie Petrischale gegeben und dann in einem Abstand von 15 cm von der UV-Lampe 25 Minuten mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt, dabei werden die Schalen zweimal geschwenkt. Nach dem Bestrahlen wird durch Ausplattieren eine Kontrolle auf Sterilität der Probe durchgeführt. Zum Schluss wird die Suspension aliquotiert eingefroren.

Herstellen eines unkonditionierten Überstandes von Lactobacillus (para)casei und acidophilus

Die Bakteriensuspension (s. 3.9) wird in einer Zellkulturflasche für drei Stunden im Brutschrank inkubiert, bei 4392 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und dann die restlichen Bakterien durch Minisart-Sterilfilter (0,20 µm, Sartorius) von den Überständen getrennt. Die Überstände werden bei -70°C gelagert, vor Versuchsbeginn erfolgte jeweils durch Ausplattieren eine Kontrolle auf Sterilität der Probe.

Herstellen eines konditionierten Überstandes von Lactobacillus acidophilus

Die Bakteriensuspension (s. 3.9) wird für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, danach werden pro Milliliter Lactobacillus acidophilus 100 µl DEF40 mit einer Inokulationsdosis von 1×10^9 CFU/ml zugefügt und zusammen für weitere zwei Stunden inkubiert.

Danach wird die Suspension bei 31232 x g für 10 Minuten zentrifugiert, sterilfiltriert (Minisart-Sterilfilter, 0,20 µm, Sartorius) und aliquotiert. Die Überstände werden bei -70°C gelagert, vor Versuchsbeginn erfolgte auch hier jeweils durch Ausplattieren eine Kontrolle auf Sterilität des Überstandes.

Adhäsionsassay

Es wird 1 ml des UV-Licht-behandelten Lactobacillus acidophilus bzw. 1 ml Überstand mit 100 µl DEF40 (Inokulationsdosis 1×10^9 CFU/ml) eine halbe Stunde auf Eis im Dunkeln vorinkubiert, dann auf die Caco2-Zellen gegeben und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.10. Auswertung

Nach Entfernen des Formalins werden Deckgläschen mit Citifluor[®] (Glycerol/ PBS-Lösung) auf die Caco2-Zellen gegeben, um die FITC-markierten Bakterien auszu zählen. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss) und der Computersoftware ImagePro Plus (MediaCybernetics) werden die adhätierenden DEF40 pro Blickfeld ausgezählt. Es wird der Mittelwert aus anfangs 20, später 10 Blickfeldern gebildet, da in Voruntersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Modalitäten gesehen wurde.

3.11. Statistik

Die Verwaltung und Aufbereitung der Messergebnisse wird mit Microsoft Excel ausgeführt, die statistische Auswertung sowie die Erstellung der gezeigten Boxplots zu den einzelnen Versuchsreihen mit dem Programm MiniTab. Die Berechnung der Signifikanzniveaus, ob sich die Mittelwerte der in den Boxplots gezeigten Verteilungen unterscheiden, erfolgt über einen zweiseitigen Wilcoxon-Test, ebenfalls mittels MiniTab.

4. Ergebnisse

4.1. Aussaatdichte der Caco2-Zellen

Die Zellbindungsassays wurden zu Beginn mit verschiedenen Aussaatdichten der Caco2-Zellen (1×10^5 und 5×10^5 Zellen pro Well) durchgeführt. Da es bei der höheren Aussaatdichte mit 5×10^5 Zellen pro Well zu einer deutlich größeren Schwankungsbreite in den Ergebnissen (DEF40 pro Blickfeld) kommt, werden alle weiteren Zellbindungsassays mit 1×10^5 Zellen pro Well durchgeführt.

4.2. US-Lyse

Bei den Versuchen zur Adhäsion der Probiotika an die Multiwellplatten ist nach zweistündiger Inkubation deutlich zu erkennen, dass die Bakterien eine sehr starke Adhäsion an das Plastik zeigen (Abbildung 4-1; Abbildung 4-2). Aufgrund dessen ist eine Auswertung der Adhäsionsfähigkeit der Probiotika an die Caco2-Zellen in den Multiwellplatten mittels Ultraschalllyse nicht möglich.

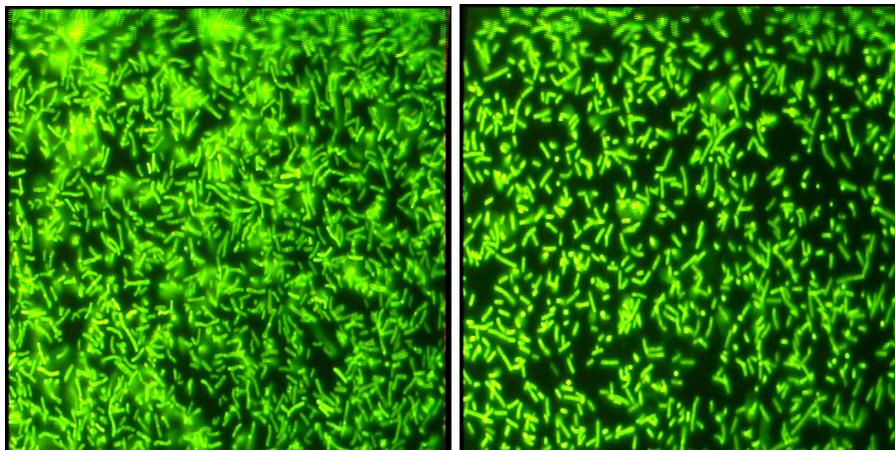


Abbildung 4-1: Adhäsion von FITC-markiertem *Bifidobacterium lactis* an Plastik (links), FITC-markiertem *Lactobacillus acidophilus* an Plastik (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit

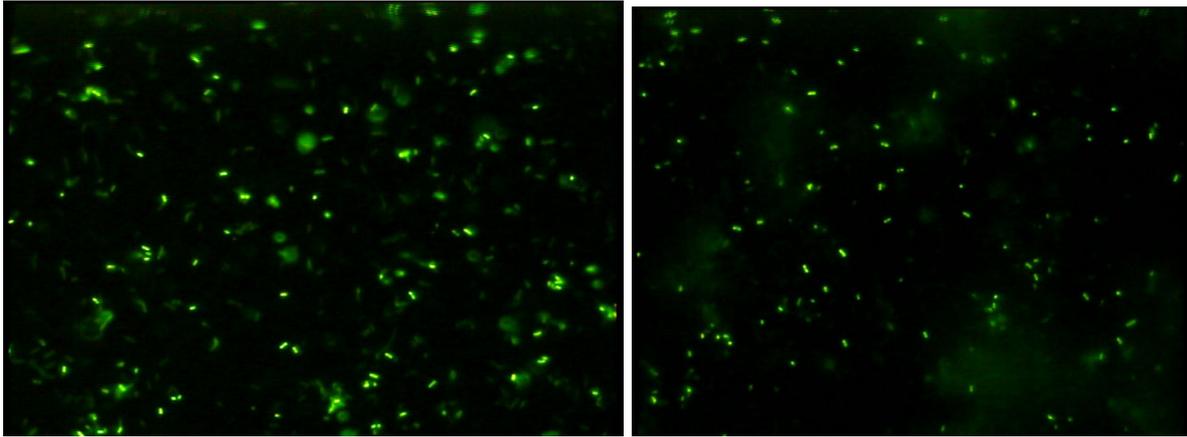


Abbildung 4-2: Adhäsion von FITC-markiertem DEF40 an Plastik (links), Adhäsion von FITC-markiertem DEF40 an Caco2-Zellen (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit

4.3. *Bakterizidieassay*

Nach zwei Stunden Inkubation der Bakterien im Caco2-Medium zeigten sich keine bzw. nur geringfügige Veränderungen der eingesetzten Inokulationsdosen, so dass ausgeschlossen werden kann, dass das Medium einen Effekt auf das Wachstum der Bakterien hat. Auch in den Koinkubationsversuchen von *E. coli* DEF40 mit probiotischen Stämmen zeigten sich nur geringe Veränderungen der eingesetzten Inokulationsdosen, so dass auch hier nennenswerte Interaktionen der Keime untereinander sehr unwahrscheinlich sind.

4.4. *Zellbindungsassay*

Lactobacillus (para)casei DSM 11358, Lactobacillus acidophilus La5, Bifidobacterium lactis Bb12, Bifidobacterium bifidum DSM 16781, Lactobacillus salivarius DSM 11361, Lactococcus lactis DSM 11360 und *E. coli* DEF40 wurden auf ihre Adhäsionsfähigkeit an menschliche Caco2-Zellen untersucht (Abbildung 4-4). Von den untersuchten Keimen zeigte der *E. coli* DEF40 mit $72,29 \pm 31,89$ Bakterien pro Blickfeld die stärkste Adhäsionsfähigkeit. Lactobacillus acidophilus La5 adhärte von den probiotischen Keimen mit $16,95 \pm 10,83$ DEF40 pro Blickfeld am besten, dicht gefolgt von Bifidobacterium bifidum DSM 16781 mit $14,37 \pm 5,74$, Bifidobacterium lactis Bb12 mit $10,47 \pm 5,94$. Lactobacillus (para)casei DSM 11358 adhärte mit $0,72 \pm 0,41$ DEF40 pro Blickfeld kaum (Abbildung 4-3; Tabelle 4-1). Aufgrund von Aggregation und un-

genügender Fluoreszenzmarkierung wurden keine weiteren Versuche mit *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus salivarius* durchgeführt (Abbildung 4-5).

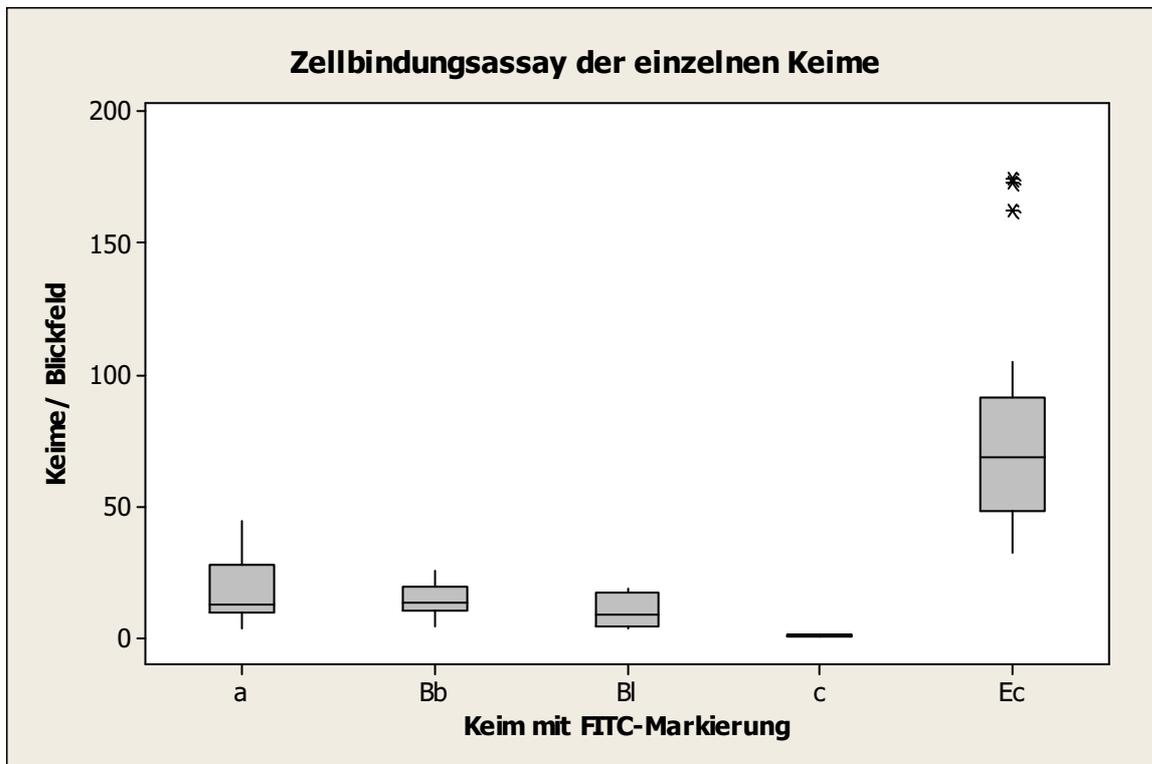


Abbildung 4-3: Zellbindungsassay der einzelnen Keime (a: *Lactobacillus acidophilus*, Bb: *Bifidobacterium bifidum*, Bl: *Bifidobacterium lactis*, c: *Lactobacillus casei*, Ec: *Escherichia coli*)

Tabelle 4-1: Zellbindungsassay der einzelnen Keime, Inkubationsdauer 2 Stunden

	Keime/ Blickfeld			
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.
Bb. bifidum	20	13,75	14,37	5,74
Bb. lactis	15	9,10	10,47	5,94
E. coli	55	68,90	72,29	31,89
Lb. acidophilus	26	12,35	16,95	10,83
Lb. casei	5	0,70	0,72	0,41



Abbildung 4-4: Adhäsion von *Bifidobacterium lactis* an Caco2-Zellen (links), Adhäsion von *Lactobacillus (para)casei* an Caco2-Zellen (rechts), jeweils nach 2 Stunden Inkubationszeit

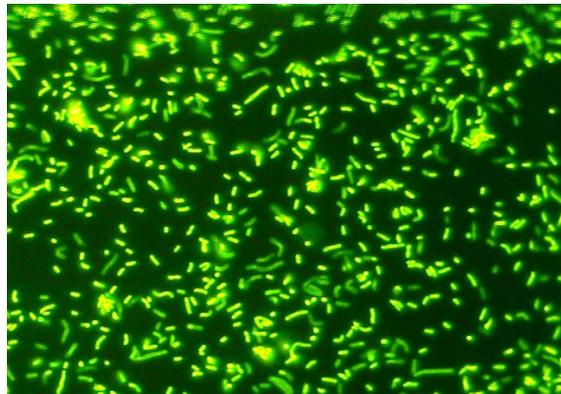


Abbildung 4-5: Adhäsion von *Lactobacillus salivarius* (starke Aggregatbildung) an Caco2-Zellen nach 2 Stunden Inkubationszeit

4.5. Zellbindungsassay unter Zusatz von Mannose

Mannose hemmt die Adhäsion von *E. coli* DEF40 durch Typ-I-Pili. Die Adhäsionsfähigkeit vom DEF40 konnte durch den Zusatz von Mannose um 20% reduziert werden, während sich die Adhäsion der Probiotika an Caco2-Zellen durch den Zusatz von Mannose nicht veränderte (Abbildung 4-6; Tabelle 4-2).

Da es nur zu einer geringen Veränderung der Adhäsionsfähigkeit des DEF40 durch Mannose kam, wurde bei den weiteren Versuchen auf den Zusatz der D(+)-Mannose verzichtet.

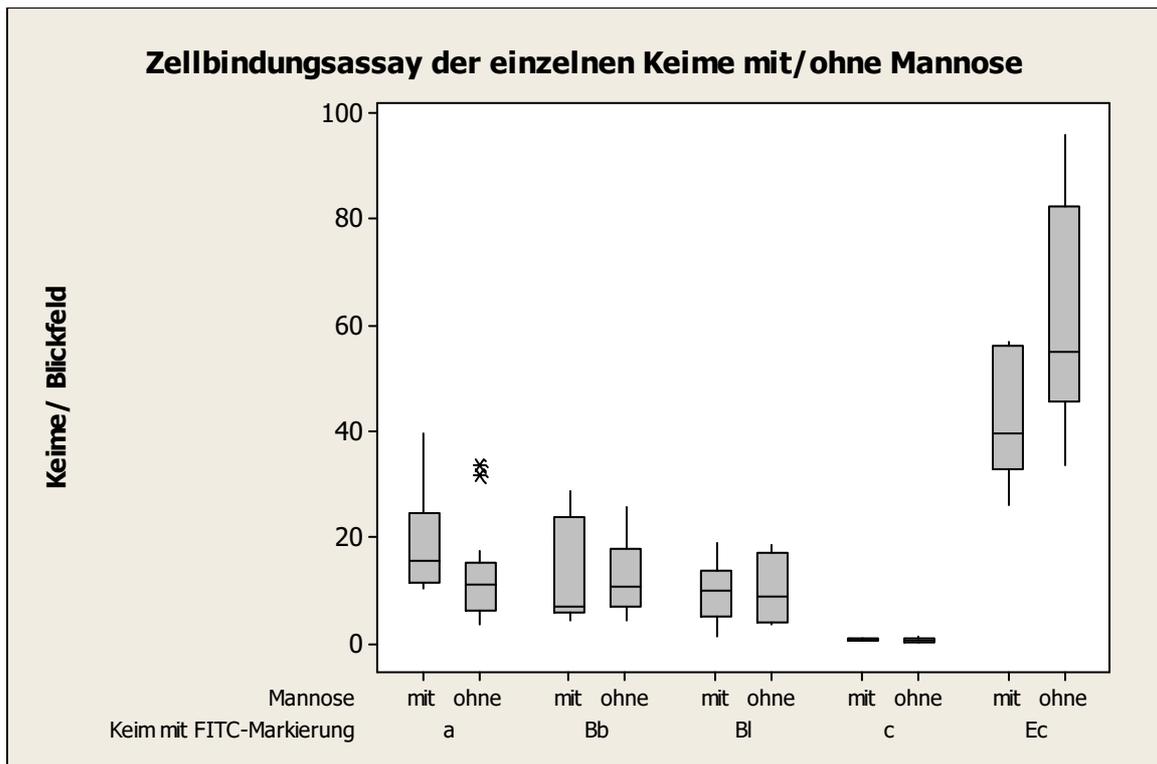


Abbildung 4-6: Zellbindungsassay der einzelnen Keime mit und ohne Zusatz von Mannose

Tabelle 4-2: Vergleich Zellbindungsassay der einzelnen Keime mit und ohne Zusatz von Mannose

	Keime/ Blickfeld							
	mit Mannose				ohne Mannose			
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.
Bb. bifidum	9	6,90	12,81	9,79	8	10,75	12,60	7,09
Bb. lactis	15	9,90	9,85	5,14	15	9,10	10,47	5,94
E. coli	9	39,50	42,23	11,48	9	51,90	54,13	15,54
Lb. acidophilus	14	15,55	18,85	9,55	14	11,10	13,53	9,06
Lb. casei	6	0,80	0,85	0,22	5	0,70	0,72	0,41

4.6. Inhibition der Adhäsion von *E. coli* DEF40 an Caco2-Zellen durch Probiotika

Lactobacillus acidophilus und *Lactobacillus (para)casei* können die Adhäsion des DEF40 an Caco2-Zellen vermindern, wenn die Probiotika zuvor mit den Caco2-Zellen vorinkubiert wurden (Exklusion). Die DEF40 pro Blickfeld werden von $86,44 \pm 16,61$ (Medium) auf $59,37 \pm 27,45$ (*Lb. acidophilus*) bzw. $61,24 \pm 27,79$ (*Lb. casei*) reduziert. Die Signifikanz p gibt dabei an, ob sich der Mittelwert des DEF40/

Blickfeld durch Inkubation mit dem jeweils betrachteten Probiotikum gegenüber der Inkubation mit Medium signifikant verändert hat. Grundlage der Berechnung ist ein zweiseitiger Wilcoxon-Test. Für die Bifidobakterien konnte kein Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 4-9, Tabelle 4-5).

Unter der Bedingung der Verdrängung konnte für den *Lactobacillus acidophilus* eine signifikante Inhibition der DEF40-Adhäsion an die Caco2-Zellen beobachtet werden ($18,42 \pm 14,18$ im Vergleich zur Kontrolle $22,48 \pm 6,31$). Für das *Bifidobacterium bifidum* zeigte sich ein deutlicher Trend zur Adhäsionsinhibition des DEF40 (Abbildung 4-8, Tabelle 4-4).

Bei der Koinkubation des *E. coli* DEF40 mit den Probiotika konnte für *Lactobacillus acidophilus* La5, *Lactobacillus (para)casei* und *Bifidobacterium bifidum* DSM 16781 eine verminderte Adhäsionsfähigkeit des DEF40 gezeigt werden, nicht aber für *Bifidobacterium lactis* (Tabelle 4-5). Den stärksten kompetitiven Effekt auf den DEF40 zeigte *Lactobacillus acidophilus* La5 mit einer signifikanten Reduktion der Adhäsion von $52,35 \pm 19,95$ auf $26,85 \pm 13,02$ DEF40 pro Blickfeld, gefolgt von *Lactobacillus (para)casei* mit einer signifikanten Reduktion auf $34,53 \pm 14,32$ DEF40 pro Blickfeld. Auch *Bifidobacterium bifidum* zeigte eine deutliche Tendenz zur Adhäsionsinhibition, während *Bifidobacterium lactis* die Adhäsionsfähigkeit nicht veränderte (Tabelle 4-3, Abbildung 4-7).

Tabelle 4-3: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Konkurrenz (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum)

	Keime/ Blickfeld				
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	p
Bb. bifidum	18	32,55	35,02	12,19	0,00317
Bb. lactis	6	51,80	54,12	10,24	0,50889
Lb. acidophilus	39	23,80	26,85	13,03	0,00000
Lb. casei	33	31,60	34,53	14,32	0,00018
Medium	32	47,10	52,35	19,95	--

Tabelle 4-4: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Verdrängung (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum)

	Keime/ Blickfeld				
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	p
Bb. bifidum	12	14,75	15,69	6,17	0,00583
Bb. lactis	33	19,80	27,42	18,60	0,86859
Lb. acidophilus	63	13,80	18,42	14,18	0,00000
Lb. casei	39	19,30	23,91	16,76	0,13905
Medium	42	21,95	22,48	6,31	--

Tabelle 4-5: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Exklusion (Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum)

	Keime/ Blickfeld				
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	p
Bb. bifidum	9	87,00	80,80	20,39	0,43519
Bb. lactis	24	78,20	78,91	15,72	0,06345
Lb. acidophilus	57	59,40	59,37	27,45	0,00000
Lb. casei	36	61,60	61,24	27,79	0,00005
Medium	36	89,30	86,44	16,61	--

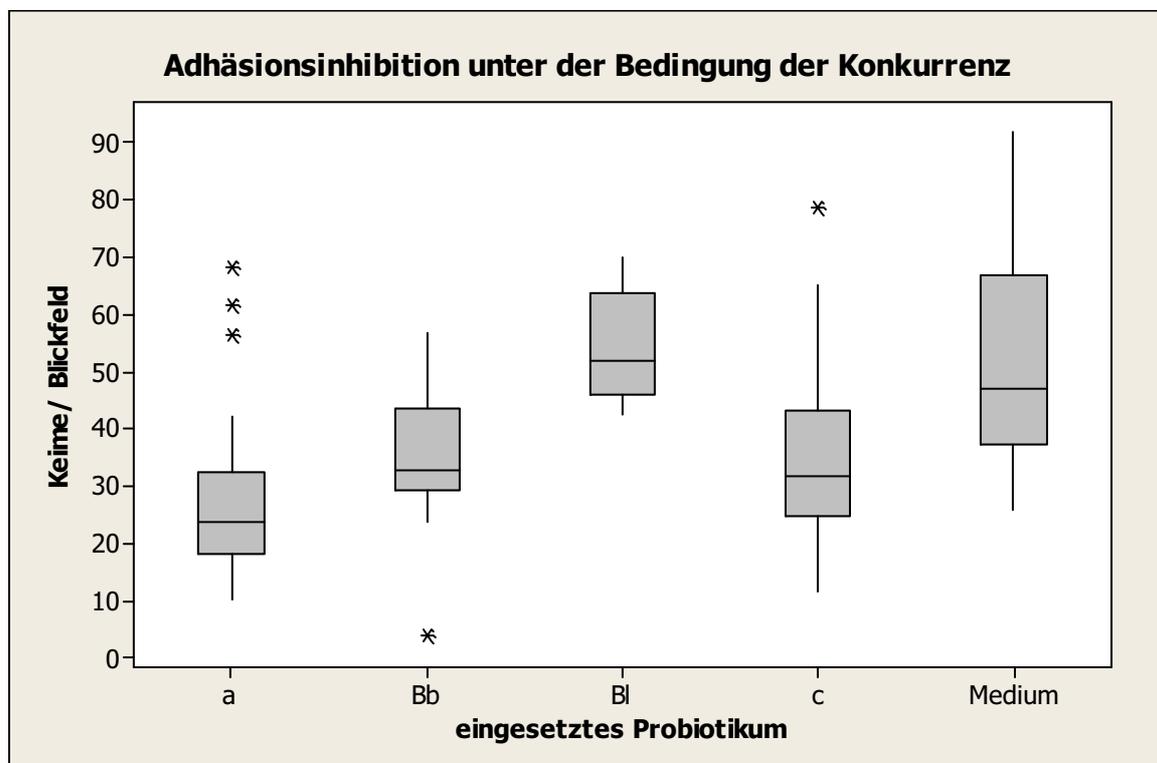


Abbildung 4-7: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Konkurrenz

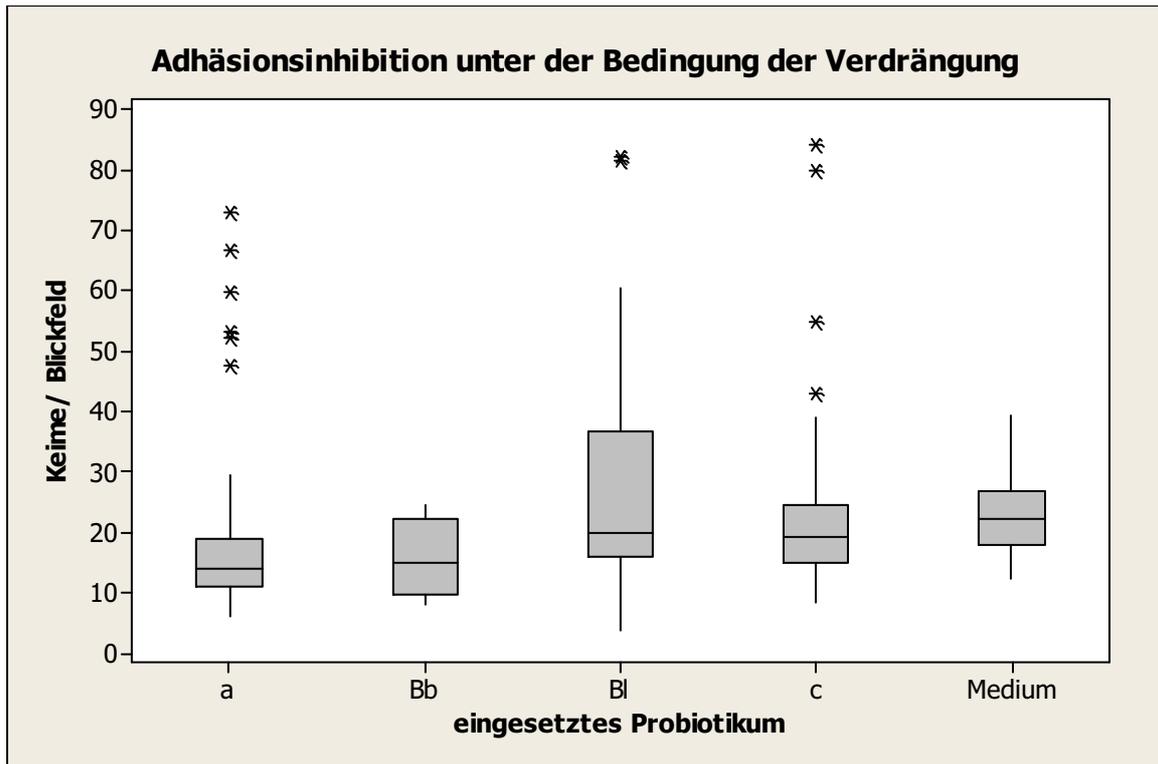


Abbildung 4-8: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Verdrängung

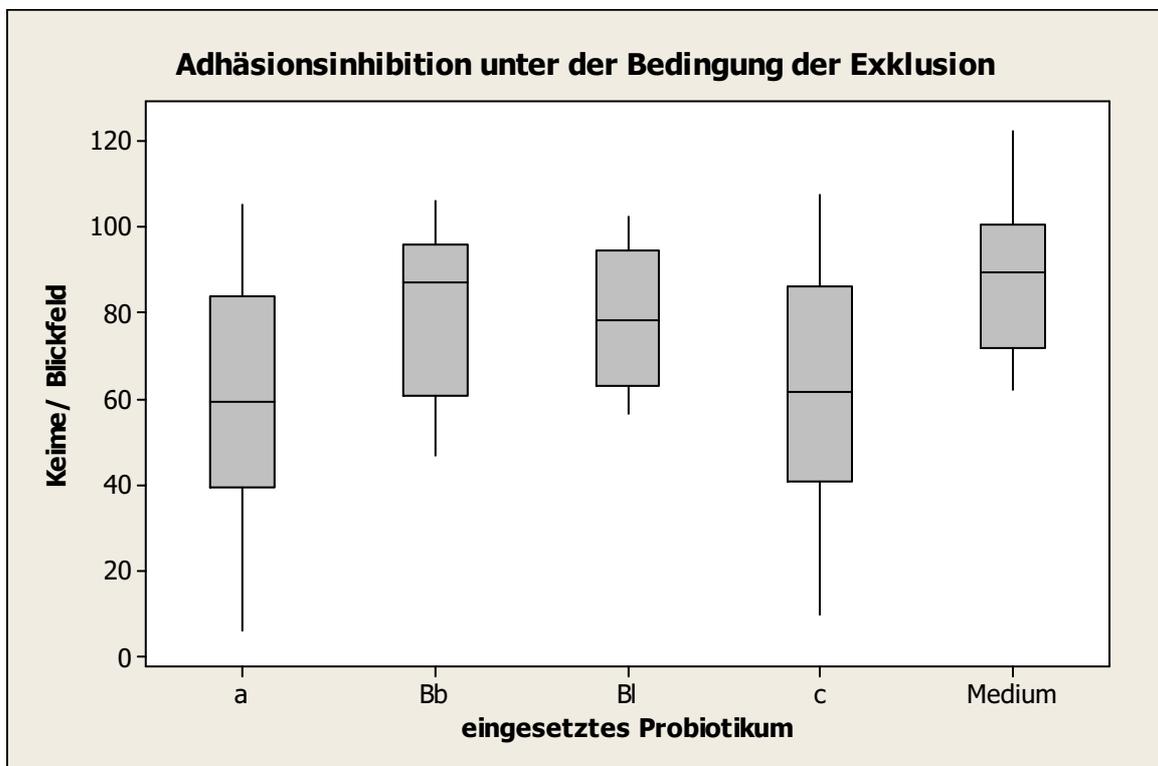


Abbildung 4-9: Adhäsionsinhibition unter der Bedingung der Exklusion

4.7. *Inhibition der Adhäsion von E. coli DEF40 an Caco2-Zellen durch Bakterienüberstand*

Um festzustellen, ob extrazelluläre Bakterienprodukte für die Inhibition der Adhäsion des *E. coli* DEF40 verantwortlich sind, wurde der DEF40 mit Bakterienüberständen einzelner Probiotika koinkubiert. Hierbei wurde zunächst ein unkonditionierter Überstand hergestellt, bei dem das Probiotikum bei der Inkubation keinen Kontakt mit dem *E. coli* hatte. Für den unkonditionierten Überstand von *Lactobacillus acidophilus* La5 und *Lactobacillus (para)casei* DSM 11358 zeigte sich kein Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit des *E. coli* DEF40 (Tabelle 4-6). Daraufhin wurde ein konditionierter Überstand von *Lactobacillus acidophilus* La5 hergestellt, bei dem das Probiotikum mit *E. coli* zusammen inkubiert wurde, um eine mögliche Produktion von protektiven Proteinen zu induzieren. Auch hier zeigte sich keine Inhibition der Adhäsion des *E. coli* DEF40 an die Caco2-Zellen (Tabelle 4-6, Tabelle 4-7).

4.8. *Inhibition der Adhäsion von E. coli DEF40 durch UV-inaktivierten Lactobacillus acidophilus La5*

Um festzustellen, ob Zellwandbestandteile der Probiotika für die verminderte Adhäsionsfähigkeit des *E. coli* DEF40 verantwortlich sind, wurde *Lactobacillus acidophilus* La5 mit UV-Licht inaktiviert und mit *E. coli* DEF40 koinkubiert. Wie in Abbildung 4-11 und Tabelle 4-7 zu sehen, kam es dadurch zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion im Vergleich zur Inkubation von *E. coli* mit Nährmedium ($11,30 \pm 3,07$ im Vergleich zu $38,29 \pm 5,18$ DEF40 pro Blickfeld).

Tabelle 4-6: Vergleich unkonditionierte Überstände von *Lb. acidophilus* (a1) und *Lb. (para)casei* (c1), Medium: Kontrollwert, Inkubation ohne Probiotikum

	Keime/ Blickfeld				
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	p
a1	18	69,40	67,16	16,11	0,2057
c1	18	69,50	69,97	17,15	0,4290
Medium	18	77,95	72,35	16,13	--

Tabelle 4-7: Vergleich UV-inaktivierter *Lb. acidophilus* (UV) und unkonditionierter (a1) und konditionierter Überstand (a2) von *Lb. acidophilus*

	Keime/ Blickfeld				
	N	Median	Mittelw.	Std.Abw.	p
UV	9	11,90	11,30	3,07	0,0004
a1	9	40,00	42,91	13,27	0,2510
a2	9	52,00	46,04	11,95	0,2164
Medium	9	36,80	38,29	5,18	--

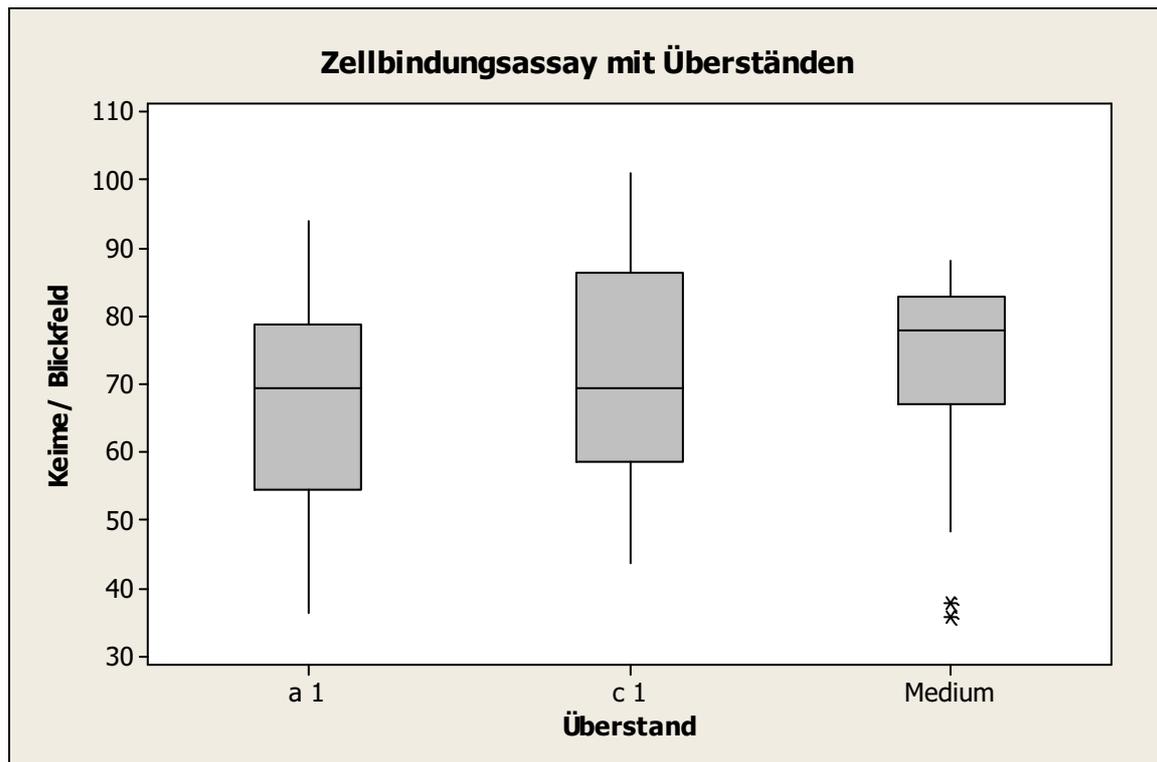


Abbildung 4-10: Zellbindungsassay mit Überständen

a1: unkonditionierter Überstand von *Lb. acidophilus*

c1: unkonditionierter Überstand von *Lb. (para)casei*

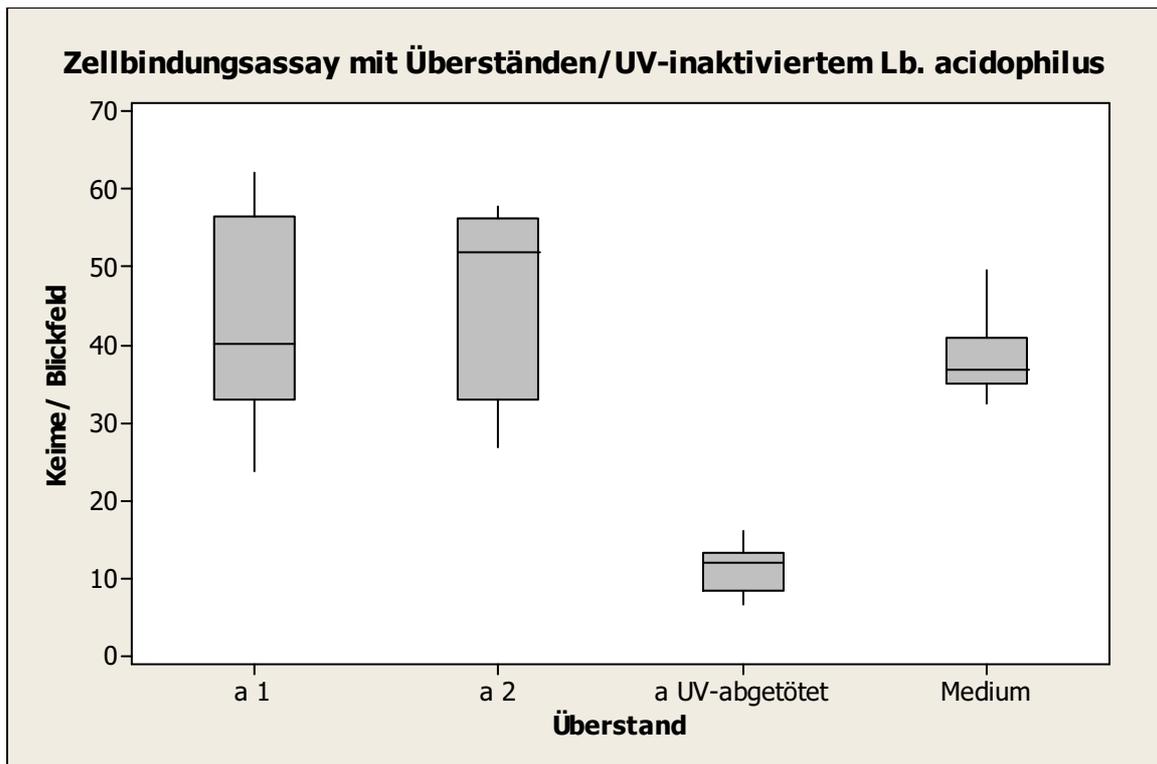


Abbildung 4-11: Zellbindungsassay mit Überständen und UV-inaktiviertem *Lb. acidophilus*

a1: unkonditionierter Überstand von *Lb. acidophilus*

a2: konditionierter Überstand von *Lb. acidophilus*

UV: UV-inaktivierter *Lb. acidophilus*

5. Diskussion

Probiotische Bakterien sind heutzutage ein häufiger Bestandteil von Lebensmitteln, da ihnen zahlreiche positive Effekte auf die Gesundheit zugeschrieben werden. Bis heute ist allerdings noch nicht genau geklärt, auf welche Weise Probiotika diese Effekte vermitteln.

Die Adhäsionsfähigkeit ist eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisierung des Darms und die Abwehr von Pathogenen (Ouwehand 1998). Zwischen den verschiedenen Laktobazillen- und Bifidobakterienarten variiert die Fähigkeit, an Caco2-Zellen zu adhären, sehr stark (Chauviere, Coconnier et al. 1992; Coconnier, Klaenhammer et al. 1992; Bernet, Brassart et al. 1993; Greene and Klaenhammer 1994; Tuomola and Salminen 1998; Todoriki, Mukai et al. 2001; Morita, He et al. 2002; Fernandez, Boris et al. 2003). Die Ergebnisse der Zellbindungsassays zeigen auch in der hier vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede. So adhärert *Lactobacillus (para)casei* kaum, *Lactobacillus acidophilus La5* dagegen sehr gut an Caco2-Zellen.

Ouwehand konnte 1999 zeigen, dass *Bifidobacterium bifidum* Bb12 gut an intestinalen Mucus adhärert und dass probiotische Keime auch in Anwesenheit weiterer probiotischer Keime nicht in ihrer Adhäsionsfähigkeit an intestinalen Mucus inhibiert werden (Ouwehand, Isolauri et al. 1999; Ouwehand, Niemi et al. 1999). Auch Collado zeigt deutliche Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit der eingesetzten Bifidobakterien an ein intestinales Mucus-Modell. Trotzdem waren alle Keime in der Lage, die später hinzugefügten Pathogene zu verdrängen, so dass kein Rückschluss von der Adhäsionsfähigkeit auf die Wirksamkeit der Probiotika gezogen werden konnte (Collado, Gueimonde et al. 2005).

An der Adhäsion an Zelloberflächen wirken sehr viele verschiedene Komponenten mit. Dazu zählen Proteine und Glykoproteine auf der Bakterienoberfläche oder möglicherweise eine Kombination aus Proteinen und Kohlenhydratbestandteilen (Chauviere, Coconnier et al. 1992; Coconnier, Klaenhammer et al. 1992; Bernet, Brassart et al. 1993; Reid, Servin et al. 1993; Greene and Klaenhammer 1994; Fernandez, Boris et al. 2003). Lee postulierte 2000, dass die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszellen auf einem Gleichgewicht beruht, das man durch eine Dissoziationskonstante beschreiben kann. *Lactobacillus casei* Shirota, der gut an Caco2-

Zellen adhärirt, habe dementsprechend eine niedrige Dissoziationskonstante, *Lactobacillus rhamnosus* GG, der wenig adhärirt, eine hohe (Lee, Lim et al. 2000). Sowohl Greene und Klaenhammer als auch Tuomola konnten in einer Untersuchung zeigen, dass der Adhärenzgrad verschiedener Laktobazillen mit steigender Bakterienkonzentration steigt (Greene and Klaenhammer 1994; Tuomola and Salmiinen 1998). In der hier vorliegenden Untersuchung konnte nicht weiter verfolgt werden, ob sich mit steigender Bakterienkonzentration der Adhärenzgrad erhöhen würde, da sich die Inokulationsdosis nicht über 1×10^8 CFU/ml steigern ließ.

Ouwehand konnte 2000 *in vitro* durch die Kombination von *Lactobacillus* GG bzw. *Lactobacillus bulgaricus* mit *Bifidobacterium lactis* Bb12 die Adhäsion von Bb12 an immobilisierte Ileostomieglykoproteine in einem Schleimhautmodell mehr als verdoppeln. Da es nicht zu einer Aggregation zwischen den verschiedenen Probiotika kam, lässt sich vermuten, dass die verschiedenen Stämme synergistische Effekte auf die Adhäsionsfähigkeit haben (Ouwehand, Isolauri et al. 2000).

In der Literatur gibt es zur Adhäsionsfähigkeit von EAEC an Caco2-Zellen bzw. andere Darmzelllinien sehr unterschiedliche Angaben. In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich eine sehr gute Adhäsionsfähigkeit des DEF40 an Caco2-Zellen (Abbildung 4-2 rechts). Die Caco2-Zelllinie ist ursprünglich ein Isolat aus einem menschlichen Kolonkarzinom. Sie differenziert spontan unter Standardkulturbedingungen und exprimiert dann Charakteristika aus reifen Enterozyten (Pinto 1983). Nataro konnte 1996 keine Adhäsion seines untersuchten EAEC-Stammes 042 an Caco2-Zellen nachweisen, an T84-Zellen jedoch schon. Er führte das darauf zurück, dass EAEC 042 eine stärkere Toxizität gegenüber Kolonepithel als gegenüber Dünndarmmukosa aufweist (Nataro, Hicks et al. 1996). In einer Studie von Knutton adhärirten alle von ihm untersuchten EAEC-Stämme an kultivierte Kolonmukosa und Caco2-Zellen (Abbildung 5-1), keiner dagegen an kultivierter Duodenalschleimhaut, was er als Hinweis darauf wertete, dass es sich bei der Kolonmukosa auch um den *in vivo* bevorzugten Kolonisierungsort handelt (Knutton, Shaw et al. 1992). Abe konnte 2001 bestätigen, dass EAEC sowohl an Caco2-Zellen als auch an T84-Zellen adhärirt, was zeigte, dass die Adhäsionsfähigkeit an kultivierte Zellen stammabhängig zu sein scheint (Abe, Knutton et al. 2001). Ruiz-Perez konnte 2004 zeigen, dass EAEC 042 säuretolerant ist und damit erklären, dass EAEC 042 in der Lage ist, die

Magenpassage in hoher Keimzahl zu überleben (Ruiz-Perez, Sheikh et al. 2004). Außerdem führte ein niedriger pH (ähnliche Bedingungen wie im Colon ascendens) dazu, dass EAEC 042 die symbiotischen Wildtyp-*E. coli* aus dem Feld schlug und sich stark vermehrte, woraus Ruiz-Perez schloss, dass das Colon ascendens auch der in vivo bevorzugte Kolonisierungsort der EAEC ist.

Man unterscheidet zwischen unspezifischen und spezifischen Mechanismen für die Adhäsion, wobei die unspezifischen in der Natur wesentlich häufiger zu finden sind. Unspezifische Adhäsion beinhaltet elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen (Hydrogen Bonds) und van-der-Waals-Kräfte. Spezifische Adhäsion wird über Rezeptoren vermittelt: Fimbrien und Glycolipidrezeptoren. Rezeptoren führen zur Wirts- bzw. Gewebespezifität, da Rezeptoren nur auf bestimmten Epithelien exprimiert werden.

Um die spezifische Adhäsion an Caco2-Zellen über bakterielle Typ-I-Fimbrien zu verhindern, wurde der Zellbindungsassay unter Zusatz von einprozentiger D-Mannoselösung durchgeführt (Bernet, Brassart et al. 1993). Es konnte in den hier vorliegenden Versuchen gezeigt werden, dass der Zusatz von Mannose keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der eingesetzten Probiotika hat, während die Adhäsionsfähigkeit des DEF40 leicht abnahm. Ofek konnte 1978 nachweisen, dass D-Mannose bzw. Methyl- α -D-Mannopyranosid die Adhäsion von *E. coli* an Hefezellen inhibieren oder sie von ihren Bindungsstellen wieder verdrängen kann. Die verdrängten *E. coli* hatten deutlich mehr Pili als die ursprünglichen *E. coli* und hatten eine deutlich höhere Fähigkeit zur Aggregation der Hefezellen (Ofek and Beachey 1978). Adlerberth konnte 1996 die Adhäsionsfähigkeit einiger *E. coli*-Stämme an HT-29-Zellen sowohl durch α -D-Methylmannose als auch durch D-Mannose um bis zu 94% hemmen. Sie konnte zudem die Adhäsion von *Lactobacillus plantarum* 299/ 299v an HT-29 durch D-Mannose um 46 bzw. 35% hemmen, durch α -D-Methylmannose um 45 bis 73%. Verantwortlich für die Mannose-spezifische Adhäsion machte sie ein bakterielles Protein (Adlerberth, Ahrne et al. 1996).

Lee konnte in seiner Studie keine Abnahme der Adhäsionsfähigkeit an Caco2-Zellen von *Lactobacillus rhamnosus* GG oder *Lactobacillus casei* Shirota durch Zusatz von Kohlenhydraten zeigen. Pathogene Keime, unter anderem verschiedene *E. coli*, wurden dagegen durch einige Kohlenhydrate in ihrer Adhäsion um bis zu 50% ver-

mindert (Lee and Puong 2002). Da es zu keiner Veränderung der Adhäsionsfähigkeit der Probiotika kam, sind Kohlenhydrat-Rezeptor-Interaktionen als Mechanismus für die Adhäsion der in dieser Untersuchung verwandten Probiotika an Caco2-Zellen unwahrscheinlich. Möglicherweise sind unspezifische Interaktionen aufgrund der sehr hydrophoben Oberfläche zumindest für den *Lactobacillus rhamnosus* GG als wichtige Ursache für die Adhäsionsfähigkeit zu sehen. Lee postuliert, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG durch sterische Hinderung zu einer Inhibition der Adhäsion von *E. coli* an Caco2-Zellen führt (Chauviere, Coconnier et al. 1992; Lee and Puong 2002).

Die Pathogenese des EAEC ist noch nicht endgültig geklärt, aber es gibt ein dreistufiges Modell zur Pathogenese der Diarrhoe (Nataro 2005). In einem ersten Schritt kommt es zur initialen Adhärenz der EAEC durch 2-3 nm große Bündel-formende Fimbrien (aggregative Adhärenzfimbrien, Abbildung 1-2: b) von denen mittlerweile drei identifiziert wurden (Czeczulin, Balepur et al. 1997; Bernier, Gounon et al. 2002; Torres, Zhou et al. 2005). Czeczulin konnte 1997 zeigen, dass AAF/II-negative EAEC in vitro nicht adhären können, wies aber gleichzeitig nach, dass AAF/I und AAF/II nur von einer kleinen Zahl von EAEC-Stämmen exprimiert werden. Das legt die Vermutung nahe, dass es noch andere Adhäsionsfaktoren gibt (Czeczulin, Balepur et al. 1997). Das konnte Sarantuya 2004 bestätigen, er konnte die Gene für AAF/I, AAF/II und AAF/III in nur 5,5%, 11,1% bzw. 13,8% der untersuchten EAEC-Stämme nachweisen. Aus der Tatsache, dass die Adhärenzfimbrien nur in der Patientengruppe, nicht aber in der gesunden Kontrollgruppe nachweisbar waren, schloss er, dass die Fimbrien mit großer Wahrscheinlichkeit wichtig seien für die EAEC-Pathogenese, dass aber noch nicht alle Fimbrien nachgewiesen wurden (Sarantuya, Nishi et al. 2004), was von Boisen und Kaper bestätigt wurde, der ein neues Aggregative-Adhärenz-Pilus bei EAEC nachweisen konnte, die keine bisher bekannten AAF exprimieren (Kaper, Nataro et al. 2004; Boisen, Struve et al. 2008; Flores and Okhuysen 2009). Bisher konnte noch nicht genau nachgewiesen werden, woran sich die EAEC bei ihrer Kolonisation initial binden. Farfan stellte 2008 die Hypothese auf, dass enteroaggregative *E. coli* an extracelluläre Proteine wie Fibronectin, Laminin und Typ-IV-Kollagen im Darm binden, da die Adhäsionsfähigkeit des EAEC 042 deutlich besser war, wenn eine apikale Fibronectin-Produktion von T84-Zellen induziert wurde (Farfan, Inman et al. 2008).

Nach der initialen Adhärenz kommt es im Folgenden zu einer vermehrten Mukussekretion, die zur Entstehung eines Biofilms mit Einschluss der *E. coli* führt, was die Kolonisierung der Mukosa erleichtert und wahrscheinlich auch zur konsekutiven Mangelernährung des Wirts führt. Im letzten Schritt zerstören Zytotoxine die Darmzellen, es kommt zu destruktiven Läsionen mit Verkürzung der Villi, zu hämorrhagischen Nekrosen der Villusspitzen und zu einer leichten Entzündungsreaktion der Submukosa mit Ödembildung (Nataro, Hicks et al. 1996; Weintraub 2007).

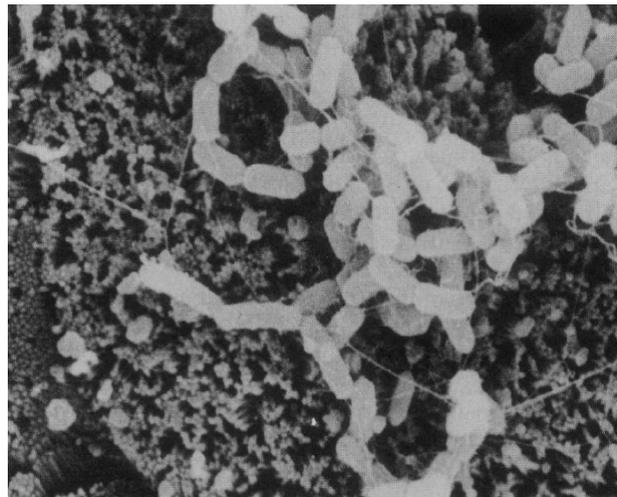


Abbildung 5-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, die die aggregative Adhärenz an den apikalen Bürstensaum von Caco2-Zellen zeigt. Vergrößerung 5000fach (Knutton, Shaw et al. 1992)

Typisch für die Infektion mit EAEC ist der Nachweis von fäkalem Laktoferrin als Indikator für die Aktivität intestinaler neutrophiler Granulozyten bei den Probanden (Steiner, Lima et al. 1998), die mit Virulenzgen-tragenden EAEC infiziert sind (Huang, Mohanty et al. 2006).

Dies legt die Vermutung nahe, dass EAEC-Infektionen zu einer Entzündungsreaktion der Mukosa führen. Steiner konnte zeigen, dass es nach drei Stunden Inkubation sowohl von EAEC 042 als auch von zellfreiem Überstand der EAEC mit Caco2-Zellen zu einer vermehrten Interleukin-8-Freisetzung aus den Caco2-Zellen kam. Verantwortlich machte er dafür die Interaktion eines flagellaren Proteins mit dem Epithel, da aflagellare Stämme diese Aktivität nicht besitzen. Keines der Gene auf dem AA-Plasmid oder die AA-Fimbrien scheinen für die Interleukinfreisetzung notwendig zu sein, auch ein EAEC 042-Mutant, der kein AA-Plasmid besitzt, führte zu

einer IL-8-Freisetzung (Steiner, Nataro et al. 2000). Huang konnte 2004 bestätigen, dass Flagellin für die Interleukin-Produktion wichtig ist. Diese Entzündungsreaktion wird über Transmembranproteine, sogenannte Toll-like-receptors (TLR) vermittelt, insbesondere TLR-5. TLRs spielen eine wichtige Rolle innerhalb der körpereigenen Immunität durch das Erkennen von mikrobiellen Partikeln und folgender Aktivierung von Immunzellen. Interleukin-8 ist verantwortlich für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur epithelialen Mukosa und erleichtert die Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen (Huang, Okhuysen et al. 2004; Kaper, Nataro et al. 2004; Harrington, Dudley et al. 2006; Huang, Mohanty et al. 2006). Möglicherweise kommt es durch die IL-8-Freisetzung zu einer vermehrten Effektivität anderer EAEC-Toxine, bisher gibt es dazu aber noch nicht ausreichend Studien (Steiner, Nataro et al. 2000).

Bei AggR handelt es sich um den am besten untersuchten Virulenzfaktor der enteroaggregativen *E. coli*. Er kontrolliert die Expression der Adhärenzfaktoren, eines Dispersin-Proteins und eines Clusters von Genen, die auf dem EAEC-Chromosom kodiert werden (Nataro 2005). In vielen Studien war der Nachweis von AggR-positiven EAEC-Stämmen in der Patientengruppe mit Diarrhoe signifikant höher als in der Kontrollgruppe, Sarantuya ging deshalb davon aus, dass AggR als Marker für die Virulenz eines EAEC anzusehen ist (Sarantuya, Nishi et al. 2004). Huang konnte 2003 keinen Zusammenhang zeigen zwischen dem Nachweis von bestimmten Virulenzfaktoren und dem Auftreten von Reisediarrhoen (Huang, Jiang et al. 2003).

Nataro konnte ein hitzestabiles Toxin (EAST1) in 40% der von ihm untersuchten EAEC-Stämme nachweisen, da es aber sowohl bei Patienten mit Diarrhoen als auch bei gesunden Probanden vorkam und auch von enterohämorrhagischen *E. coli* exprimiert wurde, ist seine Bedeutung derzeit unklar (Nataro and Kaper 1998; Kaper, Nataro et al. 2004). Auch Sarantuya konnte das EAST1 nicht nur bei EAEC, sondern auch bei anderen *E. coli* nachweisen, in dieser Studie war der Nachweis jedoch signifikant mit dem Auftreten von Diarrhoen verbunden (Sarantuya, Nishi et al. 2004).

Auf dem Virulenzplasmid ist außerdem noch eine zytopathische Serin-Protease, Pet, kodiert. Pet führt zur Ballonierung von kultivierten Epithelzellen und zum Auflösen des Aktinzytoskeletts in betroffenen Zellen, gefolgt von einer Zellelongation und Ablösung von der Zellschicht (Kaper, Nataro et al. 2004; Nataro 2005; Huang, Mohanty et al. 2006).

Dispersin ist ein niedermolekulares sezerniertes Protein, das für die Verteilung der enteroaggregativen *E. coli* über die intestinale Mukosa verantwortlich gemacht wird, was wichtig ist für die effiziente Adhärenz und Aggregation der Bakterien (Huang, Mohanty et al. 2006). Es scheint dadurch zu agieren, dass es die negativ geladenen Lipopolysaccharide auf der EAEC-Oberfläche neutralisiert, so dass sich die positiv geladenen AAF-Fimbrien vom Bakterium ausbreiten und auf diese Weise Interaktionen mit den Wirtszellen herbeiführen können (Nataro 2005; Huang, Mohanty et al. 2006). Die Sekretion von Dispersin ist abhängig von der Anwesenheit eines ABC-Transporter-Komplexes, der auch auf dem Virulenzplasmid pAA kodiert wird (Harrington, Dudley et al. 2006).

Um die Frage zu beantworten, ob die hier verwendeten Probiotika in der Lage sind, die Adhäsion von *E. coli* an Caco2-Zellen zu verhindern, werden kompetitive Bindungsassays durchgeführt, unter der Bedingung der Konkurrenz, Exklusion und Verdrängung.

Bei der Konkurrenz von Probiotikum und DEF40 kam es in den hier vorliegenden Versuchen durch *Lactobacillus acidophilus* ($26,85 \pm 13,03$) und *Lactobacillus (para)casei* ($34,53 \pm 14,32$) zu einer signifikanten Adhäsionsinhibition im Vergleich zur Inkubation mit Medium ($52,35 \pm 19,95$). *Bifidobacterium bifidum* reduzierte die Adhäsion auf $35,02 \pm 12,19$ DEF40 pro Blickfeld, *Bifidobacterium lactis* zeigte keinen Effekt. *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus (para)casei* konnten in den hier vorliegenden Versuchen die Adhäsion des *E. coli* unter der Bedingung der Exklusion signifikant auf $59,37 \pm 27,45$ bzw. $61,24 \pm 27,79$ DEF40 pro Blickfeld im Vergleich zur Inkubation mit Medium ($86,44 \pm 16,61$) hemmen. Auch in den Zellbindungsassays unter der Bedingung der Verdrängung war *Lactobacillus acidophilus* in der Lage, die Adhäsionsfähigkeit des DEF40 $22,48 \pm 6,31$ (Inkubation mit Medium) auf $18,42 \pm 14,18$ DEF40 pro Blickfeld zu reduzieren.

Jin konnte in seiner Studie 1998 weder unter der Bedingung der Exklusion noch der Verdrängung eine signifikante Reduktion in der Adhäsion von *E. coli* an Ileumepithelzellen durch Laktobazillen erreichen (Jin, Ho et al. 1998). In ähnlichen Versuchen konnte Fernandez dagegen zeigen, dass *Lactobacillus gasseri* unter der Bedingung der Exklusion in der Lage ist, die Adhäsion von EPEC an Caco2-Zellen zu vermindern (Fernandez, Boris et al. 2003). Todoriki konnte ebenfalls zeigen, dass bereits

adhärierende *Lactobacillus reuteri* und *Lactobacillus crispatus* in der Lage sind, die Adhäsion von ETEC an Caco2-Zellen um etwa die Hälfte zu vermindern (Todoriki, Mukai et al. 2001), was die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Lee konnte das gleiche für *Lactobacillus casei* Shirota unter der Bedingung der Exklusion nachweisen. Für *Lactobacillus rhamnosus* GG zeigte sich kein Effekt, während beide in der Lage waren, bereits adhärierende *E. coli* aus seiner Bindung an Caco2-Zellen zu verdrängen (Lee, Lim et al. 2000).

In einer Studie im Jahr 2003 zeigte Lee, dass sowohl die Exklusion als auch die Verdrängung keimabhängig sind. Sowohl *Lactobacillus casei* Shirota als auch *Lactobacillus rhamnosus* GG konnten einige intestinale Pathogene an der Adhäsion an Caco2-Zellen hindern, andere wiederum nicht (Lee, Puong et al. 2003). Diesen Effekt konnte man in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachten. Für alle drei verschiedenen Zellbindungsassays zeigte sich, dass *Lactobacillus acidophilus* am effektivsten in der Konkurrenz um Bindungsstellen mit dem EAEC DEF40 ist. Lee sieht ein Problem in der Tatsache, dass Nahrungsmittel (und damit aufgenommene Laktobazillen) nur durchschnittlich zwei Stunden im Dünndarm verweilen, was es für die Laktobazillen sehr schwierig macht, in so kurzer Zeit pathogene Keime aus ihrer Bindung an Epithelzellen zu verdrängen. Deshalb sei es wichtig, eine Trägersubstanz für Probiotika zu finden, durch die ausreichend Zeit für die Interaktion zwischen Bakterien und Adhäsionsoberfläche bleibt (Lee, Puong et al. 2003).

Resta-Lenert konnte 2003 durch Versuche unter der Bedingung der Exklusion die Invasion von Caco2-Zellen durch enteroinvasive *E. coli* verhindern, während Versuche in Koinkubation beider Keime kaum Auswirkung auf die Invasion zeigten. Die Verdrängung war hier überhaupt keine Möglichkeit zur Prävention von Kolonisierung oder Invasion der Caco2-Zellen, was sich als Problem bei der Therapie von bereits vorhandenen gastrointestinalen Infektionen durch EIECs darstellt, da die Gabe von Probiotika so höchstens in hohen Dosen erfolgversprechend sein könnte (Resta-Lenert and Barrett 2003).

Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus für Probiotika ist die kompetitive Inhibition um Bindungsstellen an der Wirtszelle, möglicherweise durch sterische Hinderung zwischen den verschiedenen Keimen. Von den hier getesteten Keimen zeigten *Lactobacillus acidophilus* La5, *Lactobacillus (para)casei* und *Bifidobacterium bifidum*

einen Effekt auf die Prävention der Adhärenz von *E. coli* DEF40, wenn sie simultan inkubiert wurden. Jin dagegen konnte unter der Bedingung der Konkurrenz keine Reduktion in der Adhäsion von *E. coli* nachweisen (Jin, Ho et al. 1998). Ruiz-Perez konnte 2004 zeigen, dass die Expression des Virulenzfaktors AggR in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Mikrobiota stark variierte. Er konnte nachweisen, dass es bei gemeinsamer Inkubation von EAEC mit *Enterococcus* oder *Clostridium* zu einer zwei- bis fünffach vermehrten Expression des Virulenzgens AggR kam, während es bei gemeinsamer Inkubation mit *Lactobacillus* oder *Veillonella* zu einer sechsfach geringeren Expression von AggR kam. Für Bifidobakterien konnte er keinen Effekt nachweisen (Ruiz-Perez, Sheikh et al. 2004). Er vermutet deshalb, dass die Regulation der Expression von Virulenzgenen ein spezifischer Effekt sei, mit dem die mikrobiotischen Bakterien einen Beitrag für die intestinale Gesundheit leisten. Der genaue Mechanismus, durch den die Expression reguliert wird, ist bisher noch nicht geklärt.

Die Bakterienüberstände in der vorliegenden Arbeit werden durch Inkubation der Bakterien und anschließende Sterilfiltration der Bakteriensuspension gewonnen, so dass am Ende des Herstellungsprozesses in der Lösung nur noch mögliche sezernierte Proteine und Zellbestandteile, aber keine Bakterien, vorhanden sind.

Coconnier beobachtete für den Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LB eine Verminderung der Adhäsion zahlreicher Pathogene an Caco2-Zellen, auf die Adhäsionsfähigkeit der ebenfalls getesteten probiotischen Stämme hatte der Überstand keinen Effekt (Coconnier, Lievin et al. 1997). Im Jahr 2000 konnte sie bestätigen, dass *Lactobacillus acidophilus* LB eine antimikrobielle Substanz sezerniert, die eine Aktivität gegen *Salmonella enterica* aufweist. Sie ließ sich im Überstand nachweisen und hemmte die durch Salmonellen verursachte F-Aktin-Veränderungen, verringerte deren transzelluläre Passage und verhinderte das intrazelluläre Wachstum der Salmonellen, wenn sie mit infizierten Caco2- oder TC7-Zellen inkubiert wurde (Coconnier, Lievin et al. 2000). Liévin-Le Moal zeigte 2002, dass der Überstand des *Lactobacillus acidophilus* LB in der Lage ist, diffus adhärierende *E. coli* abzutöten. Es konnten sowohl die Bakterien abgetötet werden, die schon an Caco2- oder TC7-Zellen adhärirt waren, als auch im direkten Kontakt zwischen Überstand und *E. coli* (Liévin-Le Moal, Amsellem et al. 2002).

Auch Hudault konnte nachweisen, dass *Lactobacillus casei* GG eine antimikrobielle Substanz in den Überstand sezerniert. Diese ist in der Lage, die Invasion von Caco2-Zellen durch *Salmonella typhimurium* C5, einem invasiven Pathogen, zu vermindern (Hudault, Lievin et al. 1997). Resta-Lenert wies nach, dass Probiotika verschiedene Bakteriozine produzieren, die gegen unterschiedliche Pathogene effektiv sind (Resta-Lenert and Barrett 2003). Die Substanzen, die für die antibakterielle Aktivität verantwortlich gemacht werden, sind hitzestabil, haben ein niedriges Molekulargewicht und sind unabhängig von der Milchsäureproduktion. Bisher sind diese sezernierten Substanzen aber noch nicht ausreichend isoliert und chemisch charakterisiert (Coconnier, Lievin et al. 1997; Lievin-Le Moal, Amsellem et al. 2002).

In den hier vorliegenden Versuchen konnte weder für den unkonditionierten Überstand von *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus (para)casei* noch für den konditionierten Überstand vom *Lactobacillus acidophilus* eine Reduktion der Adhäsion nachgewiesen werden. Fraglich bleibt hier, ob die Bakterien ausreichend konditioniert wurden und ob diese Bakterienstämme überhaupt bakterizide Proteine sezernieren. Eine weitere Ursache für die fehlende Hemmung könnte darin bestehen, dass, wie bereits von Jack beschrieben, Bakteriozine keimspezifisch wirksam sind (Jack, Tagg et al. 1995). Im vorliegenden Fall könnte es bedeuten, dass die eingesetzten Probiotika Proteine in den Überstand sezernieren, diese aber nicht gegen *E. coli* DEF40 aktiv sind.

Der mit UV-Licht inaktivierte *Lactobacillus acidophilus* reduzierte die Adhäsion der *E. coli* DEF40 an die Caco2-Zellen von $38,29 \pm 5,18$ (Inkubation mit Medium) auf $11,30 \pm 3,07$ DEF40 pro Blickfeld. In den Versuchen zur kompetitiven Inhibition konnte ebenfalls eine starke Reduktion der Adhäsionsfähigkeit des *E. coli* DEF40 durch *Lactobacillus acidophilus* von $52,35 \pm 19,95$ auf $26,85 \pm 13,02$ DEF40 pro Blickfeld nachgewiesen werden. Durch die Zellbindungsassays mit Überständen vom *Lactobacillus acidophilus* konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus acidophilus* keine gegen *E. coli* DEF40 aktive Substanz sezerniert. Da aber sowohl die aktiven Bakterien als auch die mit Hilfe von UV-Licht inaktivierten Bakterien eine deutliche Adhäsionshemmung zeigen, lässt sich vermuten, dass ein Zellwandbestandteil des *Lactobacillus acidophilus* zumindest teilweise für die Inhibition verantwortlich ist.

Warum der UV-inaktivierte *Lactobacillus acidophilus* im Vergleich zum lebenden *Lactobacillus acidophilus* die Adhäsion des EAEC stärker inhibiert, ist nicht abschließend zu erklären. Gründe hierfür könnten möglicherweise bei der Abtötung freigesetzte oder demaskierte Zellwandbestandteile sein.

Auch wenn die Ergebnisse aus in vitro-Studien nicht direkt auf die in vivo-Situation übertragen werden können, gibt es Hinweise darauf, dass die Adhäsion der Probiotika in Zusammenhang mit einer temporären Kolonisierung des Darmes steht. Crociani hat 1995 gezeigt, dass die Adhäsionsfähigkeit und Kolonisierung des Darms von bestimmten Bifidobakterien in vivo und in vitro an Caco2-Zellen ähnlich ist (Crociani, Grill et al. 1995). Ein Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass Probiotika eine hohe Spezifität für bestimmte Pathogene haben und deshalb weniger zur allgemeinen Prophylaxe, als vielmehr zur spezifischen Prävention oder Therapie von Erkrankungen, die durch bestimmte Pathogene hervorgerufen sind, geeignet sein könnten (Collado, Gueimonde et al. 2005).

Zusammenfassend kann man sagen, dass probiotische Keime, oral zugeführt, positive Effekte auf unterschiedlichste Erkrankungen haben. Die Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind bisher weitgehend unbekannt. Es konnten einige Bakteriozine identifiziert werden, die im Darm mit enteropathogenen Bakterien interagieren und so die Adhäsion an Darmepithel inhibieren. Auf welche Weise diese dann mit anderen Bakterien oder dem Epithel agieren, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Nicht ausreichend geklärt werden konnte bisher, welche Probiotika die größte Effektivität aufweisen oder ob die Verwendung krankheitsspezifisch erfolgen sollte. Fraglich bleibt auch, ob die Verwendung eines einzelnen probiotischen Stammes sinnvoll ist oder ob eine Kombination aus unterschiedlichen Laktobazillen und Bifidobakterien verwendet werden sollte.

Enteroaggregative *E. coli* sind ein wichtiges Pathogen bei intestinalen Infektionen. Die hier untersuchten probiotischen Keime interagierten in unterschiedlichem Maße mit dem enteroaggregativen *E. coli* DEF40. Insbesondere *Lactobacillus acidophilus* war in der Lage, bei gleichzeitiger oder vorzeitiger Applikation die Adhäsion von

DEF40 zu vermindern. Aus diesem Grund könnte eine orale Zufuhr von Probiotika eine präventive Wirkung hinsichtlich einer EAEC-Infektion haben.

Liptay und Burdach sprachen sich 2008 gegen eine prophylaktische Anwendung von Probiotika zur Prävention von infektiösen Gastroenteritiden bei Kindern aus, da die Wirksamkeit der Probiotika in den bisher durchgeführten Studien nur von fraglicher klinischer Relevanz sei (Liptay 2008). Zu klären bleibt allerdings, ob diese Empfehlung auch auf Erwachsene übertragbar ist. Die hier erzielten Ergebnisse sprechen für eine therapeutische oder auch präventive Einnahme von *Lactobacillus acidophilus* bei einer wahrscheinlichen oder nachgewiesenen EAEC-Infektion. Da in dieser Studie nur enteroaggregative *E. coli* untersucht wurden, muss die Wirksamkeit bei anderen enterovirulenten *E. coli* noch überprüft werden.

6. Zusammenfassung

Enteroaggregative *E.coli* sind eine wichtige Ursache von Diarrhoen. Probiotischen Bakterien werden zahlreiche positive Effekte auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben. Es wurde untersucht, inwieweit die Bakterien in der Lage sind, an Darmepithel zu adhären und ob der Kontakt der Bakterien untereinander eine Veränderung der Adhäsionsfähigkeit bewirkt.

Es wurden mit dem EAEC-Stamm DEF40 und unterschiedlichen probiotischen Keimen Zellbindungsassays an Caco2-Zellen durchgeführt. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* und *Bifidobacterium bifidum* führten zu einer Adhäsionsinhibition des DEF40 unter der Bedingung der Konkurrenz (gleichzeitige Inkubation). Unter der Bedingung der Exklusion (Vorinkubation mit Probiotikum) zeigten *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus casei* eine Adhäsionsminderung des DEF40. Unter der Bedingung der Verdrängung (Vorinkubation DEF40) kam es durch *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium bifidum* zu einer Reduktion der Adhäsion. *Bifidobacterium lactis* führte zu keiner Adhäsionsinhibition.

Die untersuchten Probiotika, vor allem sowohl lebender als auch mit Hilfe von UV-Licht abgetöteter *Lactobacillus acidophilus*, waren in der Lage, die Adhäsion des pathogenen DEF40 an Caco2-Zellen zu inhibieren und könnten so zur Prophylaxe von EAEC-Infektionen eingesetzt werden. Da die bakterienfreien Überstände der untersuchten Keime keine Wirkung auf die Adhäsionsfähigkeit zeigten, lässt sich vermuten, dass hier keine Proteine sezerniert wurden, die gegen DEF40 wirksam wären.

Literaturverzeichnis

- Abe, C. M., S. Knutton, et al. (2001). "An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 199-205.
- Adachi, J. A., J. J. Mathewson, et al. (2002). "Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas." Ann Intern Med **136**(12): 884-7.
- Adlerberth, I., S. Ahrne, et al. (1996). "A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29." Appl Environ Microbiol **62**(7): 2244-51.
- Alfaleh, K. and D. Bassler (2008). "Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005496.
- Barclay, A. R., B. Stenson, et al. (2007). "Probiotics for necrotizing enterocolitis: a systematic review." J Pediatr Gastroenterol Nutr **45**(5): 569-76.
- Bernet, M. F., D. Brassart, et al. (1993). "Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions." Appl Environ Microbiol **59**(12): 4121-8.
- Bernier, C., P. Gounon, et al. (2002). "Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family." Infect Immun **70**(8): 4302-11.
- Besselink, M. G., H. C. van Santvoort, et al. (2008). "Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet **371**(9613): 651-9.
- Beutin, L., D. Geier, et al. (1993). "Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals." J Clin Microbiol **31**(9): 2483-8.
- Bhan, M. K., N. Bhandari, et al. (1996). "Epidemiology & management of persistent diarrhoea in children of developing countries." Indian J Med Res **104**: 103-14.
- Bhan, M. K., V. Khoshoo, et al. (1989). "Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea." Pediatr Infect Dis J **8**(8): 499-502.
- Bhan, M. K., P. Raj, et al. (1989). "Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India." J Infect Dis **159**(6): 1061-4.
- Bhatnagar, S., M. K. Bhan, et al. (1993). "Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea." Scand J Infect Dis **25**(5): 579-83.
- Bin-Nun, A., R. Bromiker, et al. (2005). "Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates." J Pediatr **147**(2): 192-6.
- Bjorksten, B., E. Sepp, et al. (2001). "Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life." J Allergy Clin Immunol **108**(4): 516-20.

- Boisen, N., C. Struve, et al. (2008). "New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family." *Infect Immun* **76**(7): 3281-92.
- Bouzari, S., A. Jafari, et al. (1994). "Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells." *J Med Microbiol* **40**(2): 95-7.
- Brouwer, M. L., S. A. Wolt-Plompen, et al. (2006). "No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial." *Clin Exp Allergy* **36**(7): 899-906.
- Bueris, V., M. P. Sircili, et al. (2007). "Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**(7): 839-44.
- Caplan, M. S. (2009). "Probiotic and prebiotic supplementation for the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis." *J Perinatol* **29 Suppl 2**: S2-6.
- Carr, F. J., D. Chill, et al. (2002). "The lactic acid bacteria: a literature survey." *Crit Rev Microbiol* **28**(4): 281-370.
- Chapman, T. M., G. L. Plosker, et al. (2006). "VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases." *Drugs* **66**(10): 1371-87.
- Chapman, T. M., G. L. Plosker, et al. (2007). "Spotlight on VSL#3 probiotic mixture in chronic inflammatory bowel diseases." *BioDrugs* **21**(1): 61-3.
- Chauviere, G., M. H. Coconnier, et al. (1992). "Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells." *J Gen Microbiol* **138 Pt 8**: 1689-96.
- Chen, H. D. and G. Frankel (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis." *FEMS Microbiol Rev* **29**(1): 83-98.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, et al. (2003). "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen." *Clin Microbiol Rev* **16**(3): 365-78.
- Claud, E. C. and W. A. Walker (2008). "Bacterial Colonization, Probiotics, and Necrotizing Enterocolitis." *J Clin Gastroenterol*.
- Coconnier, M. H., T. R. Klaenhammer, et al. (1992). "Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture." *Appl Environ Microbiol* **58**(6): 2034-9.
- Coconnier, M. H., V. Lievin, et al. (1997). "Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(5): 1046-52.
- Coconnier, M. H., V. Lievin, et al. (2000). "Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells." *Appl Environ Microbiol* **66**(3): 1152-7.
- Collado, M. C., M. Gueimonde, et al. (2005). "Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion." *J Food Prot* **68**(12): 2672-8.
- Collins, M. D. and G. R. Gibson (1999). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut." *Am J Clin Nutr* **69**(5): 1052S-1057S.

- Cravioto, A., A. Tello, et al. (1991). "Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea." Lancet **337**(8736): 262-4.
- Crociani, J., J. P. Grill, et al. (1995). "Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study." Lett Appl Microbiol **21**(3): 146-8.
- Cross, M. L. and H. S. Gill (2001). "Can immunoregulatory lactic acid bacteria be used as dietary supplements to limit allergies?" Int Arch Allergy Immunol **125**(2): 112-9.
- Czczulin, J. R., S. Balepur, et al. (1997). "Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*." Infect Immun **65**(10): 4135-45.
- Dani, C., R. Biadaioli, et al. (2002). "Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study." Biol Neonate **82**(2): 103-8.
- de Roos, N. M. and M. B. Katan (2000). "Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998." Am J Clin Nutr **71**(2): 405-11.
- Donnenberg, M. S. and T. S. Whittam (2001). "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J Clin Invest **107**(5): 539-48.
- Dunne, C., L. Murphy, et al. (1999). "Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 279-92.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, et al. (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-8.
- Fang, G. D., A. A. Lima, et al. (1995). "Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study." J Pediatr Gastroenterol Nutr **21**(2): 137-44.
- Farfan, M. J., K. G. Inman, et al. (2008). "The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins." Infect Immun **76**(10): 4378-84.
- Fernandez, M. F., S. Boris, et al. (2003). "Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract." J Appl Microbiol **94**(3): 449-55.
- Finlay, B. B. and S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." Microbiol Mol Biol Rev **61**(2): 136-69.
- Flores, J. and P. C. Okhuysen (2009). "Enteroaggregative *Escherichia coli* infection." Curr Opin Gastroenterol **25**(1): 8-11.
- Forestier, C., C. De Champs, et al. (2001). "Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties." Res Microbiol **152**(2): 167-73.
- Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals." J Appl Bacteriol **66**(5): 365-78.
- Gibson, G. R., A. L. McCartney, et al. (2005). "Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections." Br J Nutr **93** Suppl 1: S31-4.

- Gionchetti, P., F. Rizzello, et al. (2003). "Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **124**(5): 1202-9.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, et al. (2000). "Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **119**(2): 305-9.
- Goldin, B. R. and S. L. Gorbach (2008). "Clinical indications for probiotics: an overview." Clin Infect Dis **46 Suppl 2**: S96-100; discussion S144-51.
- Gopal, P. K., J. Prasad, et al. (2001). "In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*." Int J Food Microbiol **67**(3): 207-16.
- Gorbach, S. L. (2002). "Probiotics in the third millennium." Dig Liver Dis **34 Suppl 2**: S2-7.
- Greene, J. D. and T. R. Klaenhammer (1994). "Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells." Appl Environ Microbiol **60**(12): 4487-94.
- Griffiths, J. K., J. S. Daly, et al. (1992). "Two cases of endocarditis due to *Lactobacillus* species: antimicrobial susceptibility, review, and discussion of therapy." Clin Infect Dis **15**(2): 250-5.
- Guandalini, S. (2008). "Probiotics for Children With Diarrhea: An Update." J Clin Gastroenterol.
- Gyorgy, P. and C. S. Rose (1955). "Further observations on the metabolic requirements of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*." J Bacteriol **69**(5): 483-90.
- Harrington, S. M., E. G. Dudley, et al. (2006). "Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection." FEMS Microbiol Lett **254**(1): 12-8.
- Hay, P. (2009). "Recurrent bacterial vaginosis." Curr Opin Infect Dis **22**(1): 82-6.
- He, F., A. C. Ouwehan, et al. (2001). "Adhesion of *Bifidobacterium* spp. to human intestinal mucus." Microbiol Immunol **45**(3): 259-62.
- Henry, F. J., A. S. Udoy, et al. (1992). "Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh." Acta Paediatr Suppl **381**: 27-31.
- Heyman, M. and S. Menard (2002). "Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology." Cell Mol Life Sci **59**(7): 1151-65.
- Hoyos, A. B. (1999). "Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit." Int J Infect Dis **3**(4): 197-202.
- Huang, D. B. and H. L. Dupont (2004). "Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children." Semin Pediatr Infect Dis **15**(4): 266-71.
- Huang, D. B., Z. D. Jiang, et al. (2003). "Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico." Am J Trop Med Hyg **69**(5): 506-8.
- Huang, D. B., A. Mohanty, et al. (2006). "A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*." J Med Microbiol **55**(Pt 10): 1303-11.
- Huang, D. B., A. Mohanty, et al. (2006). "A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*." J Med Microbiol **55**(10): 1303-1311.

- Huang, D. B., J. P. Nataro, et al. (2006). "Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis." Clin Infect Dis **43**(5): 556-63.
- Huang, D. B., P. C. Okhuysen, et al. (2004). "Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen." Am J Gastroenterol **99**(2): 383-9.
- Hudault, S., V. Lievin, et al. (1997). "Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection." Appl Environ Microbiol **63**(2): 513-8.
- Huppertz, H. I., S. Rutkowski, et al. (1997). "Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe." Lancet **349**(9066): 1660-2.
- Husni, R. N., S. M. Gordon, et al. (1997). "Lactobacillus bacteremia and endocarditis: review of 45 cases." Clin Infect Dis **25**(5): 1048-55.
- Isolauri, E. and S. Salminen (2008). "Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report." J Clin Gastroenterol **42 Suppl 2**: S91-6.
- Isolauri, E., Y. Sutas, et al. (2001). "Probiotics: effects on immunity." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 444S-450S.
- Itoh, Y., I. Nagano, et al. (1997). "Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness." J Clin Microbiol **35**(10): 2546-50.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, et al. (1995). "Bacteriocins of gram-positive bacteria." Microbiol Rev **59**(2): 171-200.
- Jin, L. Z., Y. W. Ho, et al. (1998). "Note: lack of influence of adherent *Lactobacillus* isolates on the attachment of *Escherichia coli* to the intestinal epithelial cells of chicken in vitro." J Appl Microbiol **84**(6): 1171-4.
- Juntunen, M., P. V. Kirjavainen, et al. (2001). "Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection." Clin Diagn Lab Immunol **8**(2): 293-6.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, et al. (2001). "Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **357**(9262): 1076-9.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, et al. (2003). "Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial." Lancet **361**(9372): 1869-71.
- Kang, G., M. M. Mathan, et al. (1995). "Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from south Indian children with acute diarrhea and controls." J Clin Microbiol **33**(8): 2204-5.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-40.
- Karmali, M. A., B. T. Steele, et al. (1983). "Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools." Lancet **1**(8325): 619-20.
- Keenan, K. P., D. D. Sharpnack, et al. (1986). "Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and *E coli* Shiga-like toxin on the rabbit intestine." Am J Pathol **125**(1): 69-80.

- Kleerebezem, M. and E. E. Vaughan (2009). "Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity." Annu Rev Microbiol.
- Knutton, S., I. Rosenshine, et al. (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells." EMBO J **17**(8): 2166-76.
- Knutton, S., R. K. Shaw, et al. (1992). "Ability of enteroaggregative Escherichia coli strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa." Infect Immun **60**(5): 2083-91.
- Kopp (2008). "Probiotika in der Prävention und Therapie von Atopien." Monatsschr Kinderheilkd **156**: 1084-1092.
- Kruis, W., E. Schutz, et al. (1997). "Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis." Aliment Pharmacol Ther **11**(5): 853-8.
- Laitinen, K., M. Kalliomaki, et al. (2005). "Evaluation of diet and growth in children with and without atopic eczema: follow-up study from birth to 4 years." Br J Nutr **94**(4): 565-74.
- Land, M. H., K. Rouster-Stevens, et al. (2005). "Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy." Pediatrics **115**(1): 178-81.
- Lee, Y. K., C. Y. Lim, et al. (2000). "Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria." Appl Environ Microbiol **66**(9): 3692-7.
- Lee, Y. K. and K. Y. Puong (2002). "Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate." Br J Nutr **88 Suppl 1**: S101-8.
- Lee, Y. K., K. Y. Puong, et al. (2003). "Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli." J Med Microbiol **52**(Pt 10): 925-30.
- Lencer, W. I., C. Constable, et al. (1995). "Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL." J Cell Biol **131**(4): 951-62.
- Levine, M. M. (1987). "Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent." J Infect Dis **155**(3): 377-89.
- Levine, M. M. and R. Edelman (1984). "Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis." Epidemiol Rev **6**: 31-51.
- Lievins-Le Moal, V., R. Amsellem, et al. (2002). "Lactobacillus acidophilus (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic Escherichia coli in human enterocyte-like cells." Gut **50**(6): 803-11.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." Science **147**: 747-8.
- Lin, H. C., B. H. Su, et al. (2005). "Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants." Pediatrics **115**(1): 1-4.

- Liptay, B. (2008). "Probiotika bei Kindern und Jugendlichen mit Darmerkrankung." Monatsschr Kinderheilkd **156**: 1076-1083.
- Ludwig, A., C. von Rhein, et al. (2004). "Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic Escherichia coli strains." J Bacteriol **186**(16): 5311-20.
- Macfarlane, G. T. and J. H. Cummings (2002). "Probiotics, infection and immunity." Curr Opin Infect Dis **15**(5): 501-6.
- Marteau, P., P. Lepage, et al. (2004). "Review article: gut flora and inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **20 Suppl 4**: 18-23.
- Martin, C. R. and W. A. Walker (2008). "Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis." Semin Perinatol **32**(2): 127-37.
- Mastretta, E., P. Longo, et al. (2002). "Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection." J Pediatr Gastroenterol Nutr **35**(4): 527-31.
- Mayer, H. B. and C. A. Wanke (1995). "Enteroggregative Escherichia coli as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient." N Engl J Med **332**(4): 273-4.
- Mecas, J. J. and E. J. Strauss (1996). "Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands." Emerg Infect Dis **2**(4): 270-88.
- Mohan, R., C. Koebnick, et al. (2006). "Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study." J Clin Microbiol **44**(11): 4025-31.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, et al. (1983). "Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines." Infect Immun **41**(3): 1340-51.
- Morita, H., F. He, et al. (2002). "Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion." Microbiol Immunol **46**(4): 293-7.
- Mossoro, C., P. Glaziou, et al. (2002). "Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEP-2 adherent Escherichia coli in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic." J Clin Microbiol **40**(8): 3086-8.
- Moyo, S. J., S. Y. Maselle, et al. (2007). "Identification of diarrheagenic Escherichia coli isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania." BMC Infect Dis **7**: 92.
- Nataro, J. P. (2005). "Enteroggregative Escherichia coli pathogenesis." Curr Opin Gastroenterol **21**(1): 4-8.
- Nataro, J. P., Y. Deng, et al. (1995). "Heterogeneity of enteroggregative Escherichia coli virulence demonstrated in volunteers." J Infect Dis **171**(2): 465-8.
- Nataro, J. P., S. Hicks, et al. (1996). "T84 cells in culture as a model for enteroggregative Escherichia coli pathogenesis." Infect Immun **64**(11): 4761-8.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic Escherichia coli." Clin. Microbiol. Rev. **11**(1): 142-201.
- Nataro, J. P., J. B. Kaper, et al. (1987). "Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEP-2 cells." Pediatr Infect Dis J **6**(9): 829-31.

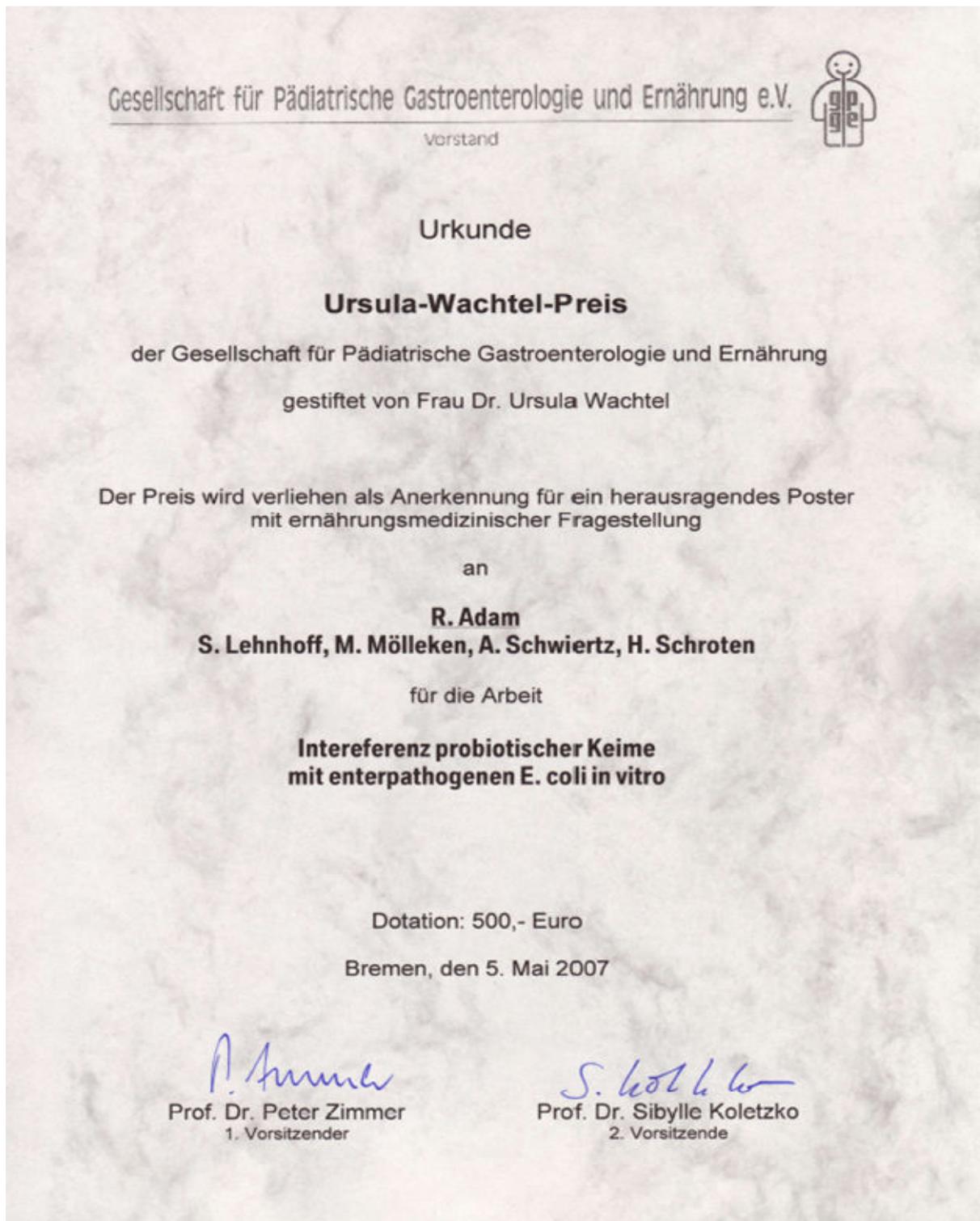
- Nguyen, T. V., P. Le Van, et al. (2005). "Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam." J Clin Microbiol **43**(2): 755-60.
- Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, et al. (2003). "Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells." Cell Microbiol **5**(6): 359-72.
- O'Brien, A. D. and R. K. Holmes (1987). "Shiga and Shiga-like toxins." Microbiol Rev **51**(2): 206-20.
- Ofek, I. and E. H. Beachey (1978). "Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*." Infect Immun **22**(1): 247-54.
- Ouwehand, A. C., E. Isolauri, et al. (1999). "Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups." FEMS Microbiol Lett **172**(1): 61-4.
- Ouwehand, A. C., E. Isolauri, et al. (2000). "The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus GG* and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*." Lett Appl Microbiol **30**(1): 10-3.
- Ouwehand, A. C., P. Niemi, et al. (1999). "The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro." FEMS Microbiol Lett **177**(1): 35-8.
- Pabst, W. L., M. Altwegg, et al. (2003). "Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland." J Clin Microbiol **41**(6): 2289-93.
- Palmer, C., E. M. Bik, et al. (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota." PLoS Biol **5**(7): e177.
- Penders, J., C. Thijs, et al. (2006). "Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy." Pediatrics **118**(2): 511-21.
- Phillips, A. D., J. Giron, et al. (2000). "Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface." Microbiology **146** (Pt 6): 1333-44.
- Pinto (1983). "Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture." Biol. Cell **47**: 323-330.
- Poupard, J. A., I. Husain, et al. (1973). "Biology of the bifidobacteria." Bacteriol Rev **37**(2): 136-65.
- Ramakrishna, B. S. (2007). "The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation." J Clin Gastroenterol **41** Suppl 1: S2-6.
- Rautio, M., H. Jousimies-Somer, et al. (1999). "Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG." Clin Infect Dis **28**(5): 1159-60.
- Reid, G., A. L. Servin, et al. (1993). "Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and intestinal epithelial cells." Microbios **75**(302): 57-65.
- Rembacken, B. J., A. M. Snelling, et al. (1999). "Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial." Lancet **354**(9179): 635-9.

- Resta-Lenert, S. and K. E. Barrett (2003). "Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)." Gut **52**(7): 988-97.
- Riley, L. W., R. S. Remis, et al. (1983). "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype." N Engl J Med **308**(12): 681-5.
- Robins-Browne, R. M. and E. L. Hartland (2002). "*Escherichia coli* as a cause of diarrhea." J Gastroenterol Hepatol **17**(4): 467-75.
- Ruiz-Perez, F., J. Sheikh, et al. (2004). "Use of a continuous-flow anaerobic culture to characterize enteric virulence gene expression." Infect Immun **72**(7): 3793-802.
- Ruszczynski, M., A. Radzikowski, et al. (2008). "Clinical trial: effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* (strains E/N, Oxy and Pen) in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children." Aliment Pharmacol Ther **28**(1): 154-61.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, et al. (1994). "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus." Lancet **344**(8929): 1046-9.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, et al. (2004). "*Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG." Clin Infect Dis **38**(1): 62-9.
- Salvana, E. M. and M. Frank (2006). "*Lactobacillus* endocarditis: case report and review of cases reported since 1992." J Infect **53**(1): e5-e10.
- Samie, A., C. L. Obi, et al. (2007). "Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children." Am J Trop Med Hyg **77**(1): 142-50.
- Sanders, M. E. and T. R. Klaenhammer (2001). "Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic." J Dairy Sci **84**(2): 319-31.
- Sanger, J. M., R. Chang, et al. (1996). "Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells." Cell Motil Cytoskeleton **34**(4): 279-87.
- Sarantuya, J., J. Nishi, et al. (2004). "Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children." J Clin Microbiol **42**(1): 133-9.
- Sarker, S. A., S. Sultana, et al. (2005). "*Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh." Pediatrics **116**(2): e221-8.
- Saxelin, M., N. H. Chuang, et al. (1996). "*Lactobacilli* and bacteremia in southern Finland, 1989-1992." Clin Infect Dis **22**(3): 564-6.
- Scaletsky, I. C., S. H. Fabbricotti, et al. (2002). "HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil." Emerg Infect Dis **8**(8): 855-8.
- Scaletsky, I. C., M. Z. Pedrosa, et al. (1999). "A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea." Infect Immun **67**(7): 3410-5.

- Scavia, G., M. Staffolani, et al. (2008). "Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis." J Med Microbiol **57**(Pt 9): 1141-6.
- Schiffrin, E. J. and S. Blum (2002). "Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa." Eur J Clin Nutr **56 Suppl 3**: S60-4.
- Sears, C. L. and J. B. Kaper (1996). "Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion." Microbiol Rev **60**(1): 167-215.
- Senerwa, D., O. Olsvik, et al. (1989). "Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation to the clinical histories of the children." J Clin Microbiol **27**(11): 2539-43.
- Sghir, A., G. Gramet, et al. (2000). "Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization." Appl Environ Microbiol **66**(5): 2263-6.
- Siegler, R. and R. Oakes (2005). "Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome." Curr Opin Pediatr **17**(2): 200-4.
- Smith, H. R., S. M. Scotland, et al. (1994). "Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteropathogenic." J Infect Dis **170**(6): 1610-3.
- Steiner, T. S., A. A. Lima, et al. (1998). "Enteropathogenic *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells." J Infect Dis **177**(1): 88-96.
- Steiner, T. S., J. P. Nataro, et al. (2000). "Enteropathogenic *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells." J Clin Invest **105**(12): 1769-77.
- Szajewska, H., M. Kotowska, et al. (2001). "Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants." J Pediatr **138**(3): 361-5.
- Szajewska, H., M. Ruszczynski, et al. (2006). "Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials." J Pediatr **149**(3): 367-372.
- Szajewska, H., M. Setty, et al. (2006). "Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy." J Pediatr Gastroenterol Nutr **42**(5): 454-75.
- Szajewska, H., A. Skorka, et al. (2007). "Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhoea in children." Aliment Pharmacol Ther **25**(8): 871-81.
- Tannock, G. W. (2002). "The bifidobacterial and *Lactobacillus* microflora of humans." Clin Rev Allergy Immunol **22**(3): 231-53.
- Tannock, G. W. (2004). "A special fondness for lactobacilli." Appl Environ Microbiol **70**(6): 3189-94.
- Tarr, P. I. (1995). "*Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection." Clin Infect Dis **20**(1): 1-8; quiz 9-10.
- Tarr, P. I., C. A. Gordon, et al. (2005). "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome." Lancet **365**(9464): 1073-86.
- Taylor, A. L., J. A. Dunstan, et al. (2007). "Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen

- sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 184-91.
- Thompson, C., Y. S. McCarter, et al. (2001). "Lactobacillus acidophilus sepsis in a neonate." J Perinatol **21**(4): 258-60.
- Todoriki, K., T. Mukai, et al. (2001). "Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains." J Appl Microbiol **91**(1): 154-9.
- Torres, A. G., X. Zhou, et al. (2005). "Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells." Infect Immun **73**(1): 18-29.
- Tuomola, E. M. and S. J. Salminen (1998). "Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures." Int J Food Microbiol **41**(1): 45-51.
- Vaarala, O. (2003). "Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli." Clin Exp Allergy **33**(12): 1634-40.
- van de Guchte, M., P. Serror, et al. (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **82**(1-4): 187-216.
- Vandenplas, Y., S. Salvatore, et al. (2007). "Probiotics in infectious diarrhoea in children: are they indicated?" Eur J Pediatr.
- Vanderpool, C., F. Yan, et al. (2008). "Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **14**(11): 1585-96.
- Vrese, M. d. (2008). "Mikrobiologie, Wirkung und Sicherheit von Probiotika." Monatsschr Kinderheilkd **156**: 1063-1069.
- Walker, W. A. (2008). "Mechanisms of action of probiotics." Clin Infect Dis **46 Suppl 2**: S87-91; discussion S144-51.
- Weintraub, A. (2007). "Enteroggregative Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection." J Med Microbiol **56**(Pt 1): 4-8.
- Wenus, C., R. Goll, et al. (2007). "Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink." Eur J Clin Nutr.
- Zamboni, A., S. H. Fabbrocetti, et al. (2004). "Enteroggregative Escherichia coli virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil." J Clin Microbiol **42**(3): 1058-63.

Teile der Arbeit wurden auf der 22. Jahrestagung der GPGE präsentiert. Das Referat wurde mit dem Ursula-Wachtel-Preis prämiert.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sarah Lehnhoff
Anschrift	Pottacker 18 45525 Hattingen
Geburtsdatum	21.05.1980
Geburtsort	Dortmund
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Ausbildung

1986-1990	Grundschule Wuppertal-Langerfeld
1990-1999	Gymnasium Schwelm
2000-2006	Medizinstudium Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
November 2006	Approbation

Beruflicher Werdegang

2007-2009	Assistenzärztin im Institut für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Ev. Krankenhaus Mülheim
Seit Mai 2009	Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Kath. Klinikum Bochum