

Aus der Klinik für Innere Medizin Schwerpunkt  
Hepatologie und Gastroenterologie an  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Signaltransduktion und Signalverarbeitung des  
probiotischen Bakteriums *E. coli* Nissle 1917 in vitro**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ilka Troschke

aus Wernigerode

Gutachter: 1. Priv.Doz.Dr.med.A.Sturm

2. Priv.Doz.Dr.med.C.Maaser

3. Priv.Doz.Dr.med.B.Siegmund

**Datum der Promotion: 22.02.2008**

*Für meine Großeltern*

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
BL	Bifido longum
BLP	Bakterielle Lipoproteine
Calcein AM	Calcein acetoxymethyl ester
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CPG	bakterielle DNA-Abschnitte
CU	Colitis Ulcerosa
EcN	Escherichia coli Nissle 1917
EcN-CM	konditioniertes Medium von Escherichia coli Nissle 1917
EDA	Extra Domain A
EIM	Extraintestinale Manifestation
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
HEK293	menschliche embryonale Nierenepithelzellen
HSP	Hitze-Schock-Protein
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	Integrin gelinkte Kinase
INF	Interferon
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinasen

## Abkürzungsverzeichnis

---

KO	Knock-Out
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG
LPMC	mononukleäre Zellen der Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
LPT	Lamina propria T-Zellen
LTA	Lipoteichonsäure
MC	Morbus Crohn
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLPMC	murine mononukleäre Zellen der Lamina Propria
MLPT	murine Lamina propria T-Zellen
MPBMC	murine periphere mononukleäre Zellen
MPBT	murine periphere T-Zellen
NOD-2	Nucleotid oligomerisierte Domäne-2
NF $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
PAMPs	pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PG	Peptidoglykane
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
SAB	Saccharomyces boulardi
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TH-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOLLIP	Toll interagierendes Protein

## Abkürzungsverzeichnis

---

TRAF6	TNR-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
UE	Untereinheit
VCAM	vaskuläre Zell-Adhäsions Moleküle

## **Zusammenfassung**

Einleitung: Das Probiotikum E. coli Nissle 1917 (EcN) wird seit einigen Jahren erfolgreich in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen angewendet. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch nur unzureichend geklärt. Ziel: Die genauere Charakterisierung der Rolle von Toll-like Rezeptoren und kostimulatorischen Moleküle bei der Entstehung einer T-Zell vermittelten Immunantwort auf EcN. Methoden: Periphere und Lamina propria T-Zellen von Wildtyp, TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen wurden stimuliert und anschließend mit und ohne EcN Überstand kultiviert. Durchflußzytometrisch wurden der DNA-Gehalt sowie die T-Zell Rezeptor und Toll-like Rezeptor Expressivität bestimmt. Untersuchungen der Zelladhäsion an Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Fibronektin und Kollagen) wurden durch luminometrische Bestimmungen der mit Fluoreszin markierten Zellen durchgeführt. TLR-negative HEK293 Zellen wurden mit hTLR-2 und hTLR-4 transfiziert und stimuliert, um anschließend die NFκB-Aktivität und daraus resultierend die Signaltransduktion via TLR Rezeptor mit einem Chemilumineszenz Assay zu bestimmen. Die Bestimmung erfolgte mit und ohne Zugabe von EcN Überstand. Ergebnisse: Konditioniertes Medium von EcN hemmt signifikant die TLR-2 und TLR-4 Expression in PBT von Wildtyp Mäusen, jedoch nicht in TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Tieren. Sowohl bei TLR-2, als auch bei TLR-4 transfizierten HEK293 Zellen ist nach Inkubation mit EcN eine deutliche konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktivität zu erkennen. Die Adhäsion von Wildtyp und TLR-2 peripheren und Lamina propria T-Zellen an Kollagen und Fibronektin sinkt nach Zugabe von zellfreiem Überstand von EcN. Im Gegensatz dazu wird die Adhäsion von TLR-2 T-Zellen nicht gehemmt. Diskussion: Es konnte gezeigt werden, dass zellfreier Überstand von EcN distinktiv die T-Zell Funktion moduliert. EcN beeinflusst signifikant die TLR-2 und TLR-4 Expression. Da die Hemmung des Zellzyklus von T-Zellen bei TLR-2 und -4 Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, scheint eine Funktion derselben bei der Wirkungsentfaltung von EcN auf T-Zellen wahrscheinlich. Während das gemeinsame Vorhandensein von TLR-2 und -4 zur T-Zell Aktivierung nötig ist, scheint die Hemmung der T-Zell Adhäsion nur TLR-4 abhängig. Dies macht verschiedene Wege der Signaltransduktion zur Wirkungsentfaltung von EcN wahrscheinlich.

### **Stichworte:**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Escherichia coli Nissle 1917, Probiotika, T-Zellen, TLR

## Abstract

**Introduction:** Although probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) has been proven to be efficacious to maintain remission of ulcerative colitis and pouchitis, the underlying mechanisms of action still remain elusive. A major role in the initiation and perpetuation of chronic IBD is attributed to the luminal bacterial flora. Several studies have demonstrated that bacterial products can activate T cells via Toll-like receptors even in the absence of antigen-presenting cells or costimulatory molecules, suggesting a direct link between the luminal bacterial flora and the immune system. **Aims:** To explore the role of TLR's and costimulatory molecules in the response of T cells towards EcN. **Methods:** Peripheral blood (PBMC) and lamina propria (LPMC) mononuclear cells from wildtype, TLR-2 and TLR-4 knockout mice were stimulated and cultured in the presence or absence of sterile filtered EcN supernatants (EcN-SC). Flow cytometry analysis was used to assess DNA content (PI), T-cell receptor and TLR expression. Cell adhesion to the ECM components fibronectin and collagen was measured by using an adhesion assay based on luminometric analysis of fluorescently labelled cells. TLR-negative HEK293 cells were stably transfected with hTLR-2 and hTLR-4 and stimulated in the presence and absence of EcN supernatants followed by measurement of NF- $\kappa$ B activity using a chemiluminescence assay. **Results:** EcN-SN significantly increases TLR-2 and TLR-4 expression in wildtype PBMC. EcN-SN significantly inhibits cell cycle progression of activated wildtype PBMC, but not PBMC from TLR-2 or -4 deficient mice. Further EcN-SN increases NF- $\kappa$ B activity in TLR-2 and TLR-4 transfected HEK293 cells and inhibits adhesion of Wildtype and TLR-2 PBMC and LPMC to collagen and fibronectin. In contrast, the inhibition of T-cell adhesion to fibronectin is reduced in TLR-2 T-cells. **Discussion:** We firstly demonstrated that cell free supernatants of EcN distinctively modulates T cell function. EcN increases TLR-2 and -4 expression and activate NF- $\kappa$ B via these receptors. Consequently, inhibition of T cell cycling by EcN is not observed in TLR-2 or -4 knockout mice, demonstrating that these receptors are crucial in mediating the effects of EcN to T cells. Whereas the effects of EcN on T cell activation are TLR-2 and -4 dependent, the inhibition t cell adhesion to the ECM to be only TLR-4 dependent, indicating that EcN use distinct signaling pathways to exert its broad biological functions.

**Keywords:** Inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, *Escherichia coli* Nissle 1917, probiotics, T cells, TLR,

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung .....	1
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1. Pathogenese der CED.....	1
1.2. Das mukosale Immunsystem .....	4
1.2.1. Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora.....	4
1.2.2. Aufbau des mukosalen Immunsystems .....	4
1.2.3. Immunantworten.....	5
1.3. Probiotika.....	7
1.3.1. Begriffentwicklung und Definition .....	7
1.3.2. Wirkungsmechanismen .....	7
1.3.3. Anwendung von Probiotika.....	9
1.4. Escherichia coli Nissle 1917 .....	10
1.4.1. Herkunft.....	10
1.4.2. Stammcharakterisierung und biologische Eigenschaften .....	11
1.5. Die Zell-Matrix Adhäsion.....	12
1.5.1. Extrazelluläre Matrix .....	12
1.5.2. Zelladhäsionsmoleküle.....	13
1.6. Toll-like-Rezeptoren.....	15
1.6.1. Der Toll-like-Rezeptor-2.....	16
1.6.2. Der Toll-like-Rezeptor-4.....	16
1.6.3. TLR-vermittelte Zellaktivierung .....	17
1.6.4. Pathogen assoziierte molekulare Muster .....	18
1.7. Aufgabenstellung.....	20
2. Material und Methoden .....	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Antikörper und Reagenzien .....	21
2.1.2. Reagenzien für murine Zellisolation .....	22
2.1.3. Reagenzien und Geräte für Durchflusszytometrie.....	23

2.1.4. Reagenzien für Adhäsionsessay und Transfektion .....	23
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Zellisolation.....	23
2.2.2. Präparation von Bakterienkulturen .....	26
2.2.3. Zellkultur .....	27
2.2.4. Durchflusszytometrie .....	28
2.2.5. Adhäsionsassay .....	29
2.2.6. Transfektion.....	29
3. Ergebnisse .....	32
3.1. Einfluß von pathogen assoziierten molekularen Mustern auf die Zellzyklusprogression von PBT .....	32
3.2. Einfluss von EcN auf die TLR-Expression von PBT .....	33
3.3. Transfektion.....	34
3.4. Einfluss von Escherichia coli Nisse auf den Zellzyklus von Wildtyp- und Knock-Out Mäusen .....	36
3.4.1. PBT .....	36
3.4.2. Mononukleäre Zellen der Lamina propria von Wildtyp-, TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen .....	37
3.5. Beeinflussung der Zell-Zell Wechselwirkung von T-Zellen durch Escherichia coli Nisse.....	39
3.5.1. Einfluss von EcN-CM auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und Aktivitätsmarker .....	39
3.5.2. Einfluss von EcN-CM auf die Expression der $\beta$ 1 Integrine .....	41
3.5.3. Adhäsion der murinen peripheren- und T-Zellen der Lamina Propria von Knock- Out- und Wildtyp-Mäusen .....	43
4. Diskussion .....	46
4.1. TLR und ihre Bedeutung in der Pathogenese von Infektionskrankheiten .....	47
4.1.1. Die Bedeutung von PAMPS für die TLR vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B.....	47
4.1.2. TLR-2 und TLR-4 Expression in transfizierten HEK293 Zellen .....	48
4.2. Gemeinsamkeiten und Unterschiede von PBT und LPT.....	48
4.2.1. Humane T-Zellen.....	48
4.2.2. Murine T-Zellen .....	49
4.3. Modulation der Signaltransduktion durch Oberflächenmoleküle .....	51

<b>4.3.1. EcN-CM beeinflusst den Aktivierungsmarker CD 69 und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.2. EcN beeinflusst die Integrine <math>\alpha 3</math> und <math>\alpha 5</math> .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>56</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>72</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>73</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

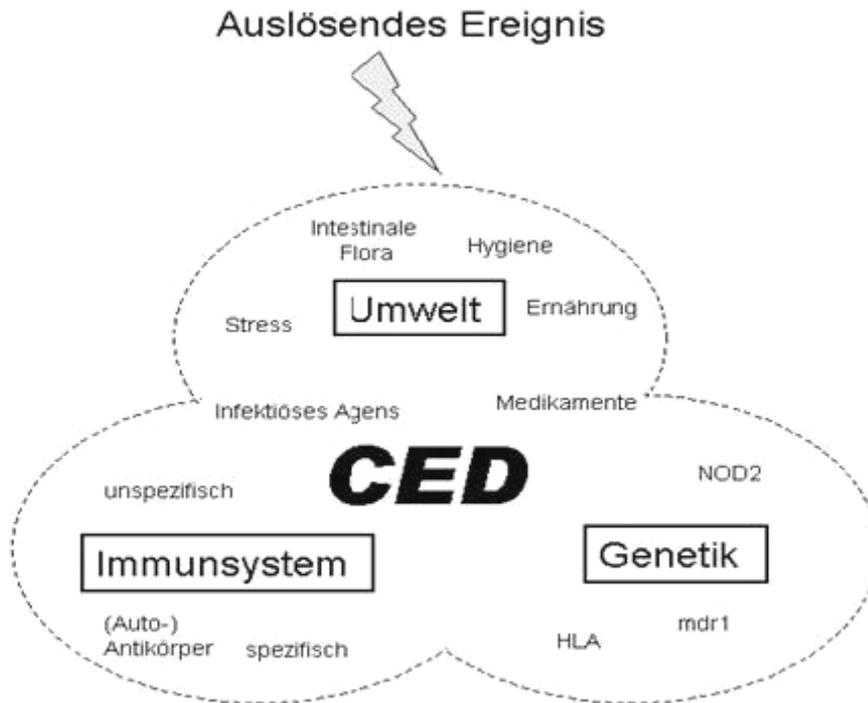
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) als den beiden bedeutendsten Vertretern werden zu den immunvermittelten, chronisch rezidivierenden Erkrankungen des Gastrointestinal-Traktes (GI-Trakt) gezählt<sup>1</sup>.

Die Inzidenz und Prävalenz haben in den letzten zehn Jahren stetig zugenommen<sup>2,3</sup>. Jeder fünfte CED-Patient ist ein Kind oder Jugendlicher<sup>4</sup>. In Westeuropa und in den USA sind 0,1 Prozent bis 0,2 Prozent der Bevölkerung von MC oder CU betroffen<sup>5</sup>. Die Prävalenz bei schwarzen und asiatischen Bevölkerungsgruppen ist geringer als bei der weißen. Es zeigt sich, dass Juden 3 bis 6 mal öfter betroffen sind als Nichtjuden<sup>6,7</sup>. Ferner ist bei 2 Prozent bis 5 Prozent der Erkrankten eine familiäre Häufung zu beobachten<sup>6</sup>. Diese epidemiologischen Daten sprechen ursächlich für genetische und umweltbedingte Faktoren<sup>8</sup>.

#### **1.1.1. Pathogenese der CED**

Obwohl es Hinweise auf eine Beteiligung umweltbedingter, immunologischer und genetischer Faktoren bei der Entstehung von CED gibt, sind Ätiologie und Pathogenese noch weitgehend unbekannt. Als mögliche Umweltfaktoren werden unter anderem Nikotin, Ernährung, Hygienestandard, Klima, Umweltverschmutzung und Stress diskutiert<sup>8</sup>. Die zeitweise als möglich diskutierte Beteiligung von Mykobakterien<sup>8,9</sup> und Paramyxoviren als infektiöse Ursache erscheint derzeit eher unwahrscheinlich<sup>8</sup>. Die intestinale Gewebeschädigung bei CED wird durch das mukosale Immunsystem bewirkt<sup>10,11</sup>. Als Ursache wird eine Autoimmunreaktion, getriggert durch eine Störung der immunologischen Toleranz, vermutet.

Weitere Erklärungsansätze weisen auf eine defekte Regulation des mukosalen Immunsystems hin, dessen überschießende Reaktion auf exogene Antigene eine unspezifische Schädigung hervorruft. Diese These wird durch das vermehrte Auftreten von Autoantikörpern gegen Bestandteile von Granulozyten bei 62 Prozent der Patienten mit CU und 4 Prozent der Patienten mit MC unterstützt<sup>12</sup>.



**Abb.1.: Schematische Darstellung der Ätiopathogenese von CED. Beteiligt an der Pathogenese von CED können Faktoren des Immunsystems, der Umwelt sowie genetische Prädispositionen sein (N. Pawlowski, 2006)**

### Genetische Faktoren

Das Auftreten unterschiedlicher Prävalenzen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen legt eine genetische Disposition der CED nahe<sup>6</sup>. Bei Erkrankung an MC ist das Risiko für Verwandte ersten Grades ebenfalls zu erkranken 15 bis 35-fach erhöht. Im Falle von CU liegt dieses Risiko 7 bis 15 mal höher verglichen mit Nichterkrankten<sup>13</sup>.

Monozygote Zwillinge zeigen durchschnittlich eine 50-prozentige Konkordanz bei der Expression von MC und eine 15-prozentige Konkordanz bei CU, was darauf hindeutet, dass der genetische Einfluß bei MC größer ist als bei CU<sup>14</sup>.

Zu den an CED beteiligten Genen werden gezählt:

- HLA I, HLA II Gene
- Gene für das Peptidtransportermolekül ABCB3 (früher TAP2)
- Gene für den T-Zell Rezeptorkomplex, das Komplementprotein C3, den IL-1 Antagonisten
- Gene für TNF $\alpha$  und das Adhäsionsmolekül ICAM-1<sup>6</sup>

Als weitere Kandidatengene werden das Gen für das Membranprotein SLC11A1<sup>15</sup>, das DNA-Reparaturgen MLH1<sup>16</sup>, das Motilin-Gen<sup>17</sup>, das Metalloproteinase MMP18 Gen<sup>18</sup> und das Guanylatzyklase-Aktivatorgen UCA1B<sup>19</sup> genannt.

Durch genomweite Kopplungsanalysen sind bisher 7 Subzeptibilitätsloci für CED (IBD 1-7) beim Menschen bekannt<sup>20-22</sup>.

2001 konnte ein an der Entstehung von MC beteiligtes Gen auf HSA 16 identifiziert werden<sup>20,22</sup>. Dieses Gen kodiert den intrazellulären Lipopolysaccharid-Rezeptor NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2). Er wird in Monozyten exprimiert und aktiviert nach Bindung bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) den Transkriptionsfaktor NF-κB, wodurch die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine induziert wird<sup>20</sup>. Bei rund 40 Prozent der MC-Patienten ist durch eine Insertionsmutation mit Verschiebung des Leserasters im NOD2-Gen ein verkürztes NOD2-Protein nachzuweisen<sup>6,20,23</sup>.

### Intestinale Manifestationen der CED

Als Leitsymptom der intestinalen Manifestation der CED gilt die Diarrhoe. Diese geht bei CU häufig mit blutig-schleimigen Durchfällen einher. Die CU ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche, von distal beginnende Ausbreitung der Erkrankung. Es sind nur die mukosalen und submukosalen Bereiche betroffen.

Weitere Begleitsymptome können Fieber, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust, allgemeine Schwäche oder Ermüdung sein<sup>24</sup>. Eine maligne Entartung im Dickdarmbereich wird gelegentlich beobachtet<sup>25</sup>.

Bei MC kann der gesamte GI-Trakt betroffen sein und es ist eine segmentale, transmurale Ausbreitung von proximal nach distal zu beobachten. Bei 50 bis 60 Prozent der betroffenen Patienten mit MC zeigen sich Granulome und ein Rektumbefall. Weitere klinische Zeichen sind das häufige Auftreten von Fisteln, Stenosen und Abszessen.

## 1.2. Das mukosale Immunsystem

### 1.2.1. Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora

Im Dickdarm finden sich ca.  $10^{12}$  koloniebildende Einheiten pro ml<sup>26</sup>. Diese physiologischen Mikroorganismen sind überwiegend obligat anaerobe Bakterien wie Bacteroides, Bifidobakterien, Eubakterien, grampositive Kokken. Als aerobe Spezies findet man Enterokokken, Streptokokken, Staphylokokken und Candida<sup>26</sup>. Ihre Aufgabe besteht vor allem in der Verstoffwechslung von Sekretionsprodukten, Mono- und Disacchariden<sup>27</sup>, sowie in der Produktion von Substanzen wie zum Beispiel Vitamin K und B<sup>26</sup>. Weiterhin ist die bakterielle Mikroflora Bestandteil des unspezifischen Immunsystems, da eine intakte intestinale Bakterienflora ein übertriebenes Wachstum und die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert und deren schädliche Stoffwechselprodukte metabolisiert. Es zeigt sich eine Beeinflussung der Genese von autoimmunen, multifaktoriellen und chronisch entzündlichen Erkrankungen durch die bakterielle Mikroflora<sup>28,29</sup>. Die bakterielle Mikroflora des humanen Darm ist der wesentliche Stimulus für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems<sup>30</sup>.

### 1.2.2. Aufbau des mukosalen Immunsystems

Das darmassoziierte Immunsystem (gut associated lymphoid tissue, GALT) zählt mit Milz und Lymphknoten zu den peripheren lymphatischen Organen und ist gemeinsam mit dem lymphatischen Gewebe des Respirationstraktes und anderen Mukosageweben Bestandteil des integrierten Mukosa-Immunsystems<sup>31</sup>. Die Darmmukosa stellt die größte Ansammlung lymphatischen Gewebes im humanen Organismus dar und ist gleichzeitig der Hauptproduzent von Immunglobulinen<sup>27</sup>. Die Peyer'schen Plaques sowie die intraepithelialen und mukosalen Lymphozyten bilden die Hauptbestandteile des GALT. Die Lymphozyten der Lamina propria repräsentieren eine Population gereifter, immunkompetenter T- und B-Zellen, welche nach Aktivierung in den Peyer'schen Plaques in die Mukosa auswandern<sup>32</sup>. Die intestinale Mukosa ist mit 200-400 Quadratmetern die größte Grenzfläche des Organismus zu seiner Umwelt.

Das intestinale Epithel bildet die Grenze zwischen Darmwand und Darmlumen. Zu seinen spezifischen Aufgaben zählt die Funktion als hochselektive Barriere, die einerseits die Passage potentiell toxischer Stoffe verhindert und andererseits den Transport von Nährstoffen in die Zirkulation ermöglicht. Es ist durch einen hohen Zellumsatz mit nahezu kompletten Austausch der intestinalen Epithelzellpopulation innerhalb von 24 bis 96 Stunden gekennzeichnet<sup>33</sup>. Weiterhin enthält es als spezifische zelluläre Komponenten hauptsächlich Granulozyten,

dendritische Zellen, Lymphozyten, Makrophagen und M-Zellen. Diese können chemotaktisch Zellen des spezifischen Immunsystems anlocken und ihnen Antigene repräsentieren, welche durch Opsonierung die Phagozytoseeffizienz von Zellen des unspezifischen Immunsystems verbessern<sup>30</sup>. Hierdurch wird beispielhaft die Zusammenarbeit und das Verschmelzen von spezifischem und unspezifischem Immunsystem verdeutlicht. Die immunologische Barriere wird additiv durch den pH-Wert, die Mucusproduktion, die Peristaltik, durch chemische Faktoren wie Lysozym und Defensinen sowie die Phagozytose beeinflusst. Intraepitheliale Lymphozyten sind fast ausschließlich T-Lymphozyten und zu 80 Prozent CD8 positiv. In der Lamina propria sind ca. 60 Prozent T-Lymphozyten (LPT) – meist CD4 positiv - vorhanden. Den restlichen Anteil der lymphatischen Zellen bilden die B-Zellen, welche meist in Form von Plasmazellen vorliegen<sup>34</sup>.

### **1.2.3. Immunantworten**

Im humanen Darm findet neben spezifischen und unspezifischen Immunantworten vor allem die Ausbildung von oraler Toleranz statt<sup>35</sup>.

#### Orale Toleranz

Die Herausforderung für das mukosale Immunsystem besteht einerseits darin, die bakterielle Translokation aus dem Lumen zu verhindern und, reaktiv auf pathogene Bakterien, die Zellexpansion und Proliferation spezifischer Zellklone zu induzieren. Andererseits muss eine unkontrollierte Reaktion gegen antigene Reize verhindert werden, da andernfalls durch Eliminierung physiologischer Mikroorganismen eine chronische Entzündung resultieren würde<sup>28</sup>. Das Fehlen einer spezifischen Immunantwort gegenüber Nahrungsmittelallergenen und der kommensalen Darmflora wird als orale Toleranz bezeichnet. Über Einzelheiten dieses ständigen Dialoges zwischen Immunsystem und luminaler Bakterienflora ist bisher wenig bekannt. Studienergebnisse zeigen, dass Lamina propria T-Lymphozyten (LPT) sich in einem dauerhaft aktivierten Zustand befinden, jedoch nach Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors langsamer proliferieren. Als Ursache dieser Zustandsänderung werden regulatorische T-Zellen vermutet, welche die antigeninduzierte Aktivierung von T-Zellen durch Sekretion bestimmter Zytokine antagonisieren<sup>30</sup>.

Der Funktionsverlust der oralen Toleranz führt zu einer überschießenden Immunantwort gegen Bestandteile der kommensalen Darmflora wie z. B. bei CED oder gegen Gluten bei der einheimischen Sprue<sup>36,37</sup>.

### Die unspezifische Immunantwort

Die unspezifische, angeborene („innate immunity“) Immunantwort dient der schnellen, sofortigen Abwehr von Pathogenen und dem Auslösen einer spezifischen Reaktion. Die Induktion erfolgt zellulär durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelicidine, welche mikrobielle Zellmembranen zerstören, sowie durch das Komplementsystem<sup>38</sup>. Für die Produktion von Defensinen sind Epithelzellen und vor allem die Paneth Körnerzellen in den Darmkrypten verantwortlich.

Die intestinalen Epithelzellen stellen eine weitere chemikalisch-physikalische Barriere dar, die das Anheften und Eindringen von pathologischen Mikroorganismen und Toxinen verhindert<sup>38,39</sup>. Parallel dazu erfolgt die Aktivierung der spezifischen Immunantwort durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren und Zytokinen, durch Antigen-präsentation auf MHC-II oder durch die Expression kostimulatorischer Moleküle<sup>40</sup>.

### Die spezifische Immunantwort

Haupteffektoren der spezifischen, erworbenen („adaptive immunity“) Immunisierung sind die B- und T-Lymphozyten. Diese werden durch genetische Veränderungen auf Einzelzellebene und verschiedenen in vivo Selektionsvorgängen, wie zum Beispiel der Neuordnung von Gensequenzen und Hypermutationen, individuell gebildet. In bestimmten Fällen bildet das spezifische, adaptative Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis aus. Dieses ist bedeutend für die Entwicklung protektiver Immunität. Hierbei werden nach erstem Antigenkontakt langlebige B- und T-Zellen gebildet, welche bei erneutem Antigenkontakt schneller und effizienter reagieren<sup>41</sup>.

Jede dieser Zellen trägt ungeprägt Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese wird genetisch während der Zellentwicklung im Knochenmark entwickelt<sup>42</sup>. Während der T-Zellreifung im Thymus werden zunächst unterschiedliche  $\beta$ -Ketten und ein Prä-T-Zell-Rezeptor gebildet. Dieser wird ständig auf Funktionalität getestet. Zu diesen  $\beta$ -Ketten werden dann nacheinander verschiedene  $\alpha$ -Ketten produziert und mit ein und derselben  $\beta$ -Kette als Partner getestet, ob sie den körpereigenen MHC erkennen<sup>43</sup>. Dieser Vorgang wird beendet, wenn der Rezeptor schwache Wechselwirkungen mit einem bestimmten Selbst-MHC Molekül eingehen kann, und hier durch Überlebenssignale erhält, die zu positiver Selektion führen und mit der Emigration aus dem Thymus in die Peripherie oder mit dem Zelltod enden<sup>44,45</sup>. Nach der Selektion im Thymus zirkulieren die T-Zellen zwischen Blut und lymphatisches System als naive T-Zellen bis zu einem eventuellen Antigenkontakt. Erst durch diesen Antigenkontakt werden naive T-Zellen zu Effektor T-Zellen aktiviert und können hochspezifisch auf das jeweilige Antigen durch

klonale Expansion reagieren. Hierdurch wird eine effektive Antwort, sowie die Generierung von Gedächtniszellen ermöglicht<sup>46</sup>.

In der Gruppe der T-Zellen wird zwischen den CD8 T-Zellen und CD4 T-Helferzellen unterschieden. CD8 T-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den Korezeptor CD8. T-Helferzellen exprimieren den Korezeptor CD4. Diese Korezeptoren kooperieren strukturell durch Bindung und funktionell durch Signaltransduktion mit dem T-Zell-Rezeptor. Gemeinsames Merkmal dieser Korezeptoren ist das Vorhandensein eines T-Zell-Rezeptors, der die Erkennung von Erregerstrukturen auf der Oberfläche infizierter Zellen ermöglicht<sup>40</sup>.

### **1.3. Probiotika**

#### **1.3.1. Begriffentwicklung und Definition**

Forschungen des russischen Wissenschaftlers METCHNIKOFF (1907) und des deutschen Bakteriologen NISSLE (1916) zeigten erstmals die positive Wirkung von Mikroorganismen auf die Gesundheit des Menschen.

1965 wurde der Begriff Probiotika als Beschreibung von „Substanzen, die von einem Mikroorganismus sezerniert werden und das Wachstum eines anderen stimulieren“, verwendet<sup>47</sup>. Die Weiterentwicklung dieser Definition schloss auch Mikroorganismen mit positiver Wirkung auf den Wirt ein und bezog sich ausschließlich auf lebende Mikroorganismen<sup>48</sup>, um 2001 zur heute gültigen und von der WHO anerkannten Definition zu gelangen. Derzeit versteht man unter Probiotika „eine Präparation eines Produktes oder ein Produkt, das lebende, definierte Mikroorganismen in ausreichender Zahl enthält, die die Mikroflora (durch Implantation oder Kolonisation) in einem Bereich des Wirtskörpers verändern und dadurch fördernde Gesundheitseffekte auf den Wirt haben“<sup>49</sup>.

#### **1.3.2. Wirkungsmechanismen**

Trotz der vielfältigen Einsatzgebiete und redundant nachgewiesener Wirksamkeit von Probiotika ist deren Wirkungsmechanismus bislang wenig bekannt. Die Thesen der Erklärungsversuche der Wirksamkeit von Probiotika fokussieren zwei Möglichkeiten:

- a) Wechselwirkung und Beeinflussung der inhärenten Darmmikroorganismen durch Probiotika
- b) Einfluß von Probiotika auf die Epithelbarriere und das darmassoziierte Immunsystem des Wirtes.

### Beeinflussung der Darmmikroorganismen durch Probiotika

Physiologische Mikroorganismen stabilisieren das Darmmilieu, welches potentielle Pathogene abwehrt. Das Verhältnis zwischen physiologischen Darmmikroorganismen und Probiotika einerseits und pathogenen, bzw. fakultativ pathogenen Bakterien andererseits ist derzeit am besten bei *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* und *Saccharomyces boulardi (SAB)* erforscht.

Lactobacillen verändern die Aktivität von  $\beta$ -Glucuronidase, Nitroreduktase und Glycocholathydrogenase. Dies führt zu einem stabileren Darmmilieu und erschweren pathogenen Vorgängen<sup>50</sup>. Sie binden in vitro an Mannoserezeptoren, welche auch von pathogenen Bakterienstämmen wie z.B. *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *V. cholerae* genutzt werden<sup>51</sup>. Eine Erhöhung der Konzentration von Lactobacillen im Darm erschwert somit die Bindung der pathogenen Mikroorganismen. Bei einzelnen Stämmen des *Lactobacillus* ließ sich in vivo eine Adhäsion nachweisen<sup>52</sup>.

Bifidobakterien senken bei Säuglingen<sup>53</sup> und Erwachsenen<sup>54</sup> den pH-Wert im Stuhl. Weiterhin können sie in vitro unter Neutralisierung freier Radikale Eisen an ihre Zellmembran binden<sup>55</sup>. Dies verringert den für Pathogene wichtigen Wachstumsfaktor. Orale Gabe von *Bifidum longum (BL)* bessert eine experimentelle Colitis in Mäusen<sup>56</sup>. Weiterhin reduziert ein vom *Bifidobakterium longum* produziertes Protein die Adhäsion des enterotoxischen Bakteriums *E.coli PB176*<sup>57</sup>. *LGG* und Bifidobakterien sezernieren Substanzen, die durch pathogene Mikroorganismen produzierte Toxine binden bzw. inaktivieren<sup>58</sup>.

### Wirkungen auf den Wirt

Die dominierenden Muzine im Darm MUC2 und MUC3<sup>59</sup> werden in vitro von Lactobacillen induziert<sup>57</sup>. Es sind von Epithel- und Becherzellen sezernierte Glykoproteine, die vor pathogener Anheftung schützen und proinflammatorische Moleküle binden. Bei CED ist die Zahl der Becherzellen verringert, es resultiert eine Erniedrigung der sezernierten Muzine<sup>57</sup>, was zu einer reduzierten Schutzfunktion und Aufrechterhalten der Entzündung führt. *LGG* erhöht bei der Ratte die Anzahl der Epithelzellen durch Erhöhung der Mitoserate im Dünndarmepithel<sup>60</sup>. Desweiteren beeinflussen Probiotika die elektro- und transportphysiologischen Eigenschaften<sup>61</sup>. IL-8, ein von Epithelzellen gebildetes Interleukin spielt eine wichtige Rolle beim Auftreten und Aufrechterhalten von intestinalen Entzündungen bei CED<sup>62</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass *VSL#3* DNA durch Induktion mit TNF- $\alpha$  die mRNA-Expression von IL-8 in HT-29 Zellen erhöht, die Sekretion von IL-8 aber verringert<sup>63</sup>. Weiterhin ist bekannt, dass *EcN* die IL-8 mRNA-Expression in intestinalen Epithelzellen induziert<sup>64</sup>, eine Aussage bezüglich der IL-8 Sekretion lässt sich jedoch nicht ableiten.

### Beeinflussung des Immunsystems durch Probiotika

Das Immunsystem besteht aus einer angeborenen und einer adaptiven Komponente. Bei beiden lassen sich mit Probiotika Wirkungen erzielen.

Bezogen auf das angeborene Immunsystem lässt sich vor allem eine Beeinflussung der Phagozytose von Makrophagen und Granulozyten beobachten. Murine Makrophagen erhöhen die Phagozytoseaktivität nach oraler Gabe spezieller Lactobazillen<sup>65</sup>. Therapiert man allergisch erkrankte Patienten mit LGG, so wird die häufig erhöhte Phagozytoseaktivität reduziert<sup>66</sup>.

Die Wirkungen von Probiotika auf die humorale Immunantwort zeigen sich durch eine Erhöhung der sekretorischen IgA-Konzentration. Dies findet Anwendung bei der Therapie der Rotaviren und der Vakzinierung von Kindern<sup>67</sup>. Es zeigt sich, dass Probiotika auch die zelluläre Immunantwort modulieren. Laktobazillen stimulieren in vitro murine dendritische Zellen, PBMC und Monozyten. Diese produzieren vermehrt IFN- $\gamma$  und IL-12, was die Bildung von TH1-Zellen positiv beeinflusst<sup>68</sup>. Im Darm von IL-10 Knock-Out Mäusen normalisiert VSL#3 die pathologisch erhöhte TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Sekretion. Unter inflammatorischer Situation wird bei Knock-Out Tieren und Wildtyp Tieren durch Lipopolysaccharid (LPS) eine überschießende Sekretion verhindert. Die Kolutissymptomatik wurde deutlich gebessert<sup>61</sup>. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Probiotika nach subkutaner Injektion Entzündungssymptome bei IL-10 Knock-Out Mäusen und im Kollagen-induzierten Arthritismodell der Maus verbessern. In der Milz ließ sich die Produktion von TGF- $\beta$  stimulieren<sup>69</sup>.

### **1.3.3. Anwendung von Probiotika**

Probiotika werden als Therapeutikum vielfältig eingesetzt. Mögliche Anwendungsgebiete sind infektiöse, allergische, inflammatorische und neoplastische Erkrankungen<sup>70</sup>.

Obwohl Details der Wirkungsmechanismen zum Teil noch unbekannt sind, zeigen gesicherte prospektive klinische Studien bezüglich der Remissionserhaltung bei CU die gleiche Wirksamkeit von *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) verglichen mit dem standardmäßig verwendeten Mesalazin<sup>71-73</sup>. Die Therapie der CU durch das Bakterium EcN ist mit dem Evidenzgrad Ib anerkannt<sup>10</sup>, da in drei klinischen, doppelblinden, randomisierten Studien gezeigt werden konnte, dass EcN in der Remissionserhaltung der CU dem 5-Aminosalicylat Mesalazin gleichwertig ist<sup>71,72,74</sup>. Die Wirksamkeit von Probiotika bei der Remissionserhaltung und Therapie des MC ist derzeit noch nicht nachgewiesen<sup>75,76</sup>.

VSL#3, ein probiotisches Mischpräparat, wird ebenfalls erfolgreich in der Therapie von CED eingesetzt<sup>77</sup>. Es wurden sowohl in Prophylaxe als auch in der Remissionserhaltung der

chronischen Pouchitis<sup>78</sup> sowie in der Remissionserhaltung der CU bei Patienten mit Unverträglichkeit der Salizylate nachweisbar gute Ergebnisse erzielt<sup>79</sup>.

Weniger gut gesichert ist die Anwendung von EcN bei Divertikulitis<sup>80</sup>. Einzelfallberichte beschreiben die Therapie der pseudomembranösen Kolitis<sup>81</sup> und Halitosis<sup>82</sup> mit EcN.

Die Anwendung von *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) zeigt bei Kindern mit mäßig ausgeprägtem MC Anzeichen von Erfolg<sup>75</sup>. Weitere Hinweise auf die Wirksamkeit von Probiotika im Gastrointestinaltrakt finden sich bei der Behandlung des Reizdarmsyndrom vom Diarrhöe-Typ<sup>83</sup>.

Ein weiterer möglicher Einsatzbereich von Probiotika ist die Prävention bzw. Therapie von Allergien. Der Einsatz von *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) und *Lactobacillus reuteri* verbessert die klinischen Symptome und Laborparameter bei Kindern mit atopischer Dermatitis<sup>84,85</sup>. Wurden Mütter ante partum und die Säuglinge postnatal bzw. stillende Mütter mit LGG behandelt, konnte das Auftreten atopischer Ekzeme bei familiär gefährdeten Kindern halbiert werden<sup>86,87</sup>.

Lodinova-Zadnikova zeigte 2003 identische Effekte bei der Behandlung mit einem apathogenen *Escherichia coli*. Erste Hinweise auf mögliche Anwendungsbereiche von Probiotika finden sich bei der rheumatoiden Arthritis<sup>88</sup> und der bakteriellen Vaginose<sup>88,89</sup>. Für die Tumorprävention bei kolorektalen Karzinomen und für die Cholesterinsenkung finden sich derzeit widersprüchliche Daten<sup>90-92</sup>.

## 1.4. *Escherichia coli* Nissle 1917

### 1.4.1. Herkunft

1917 wurde der *E.coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) durch den Freiburger Hygieniker und Bakteriologen Prof. Dr. med. Alfred Nissle (1874-1965) aus den Faeces eines Pionier-Unteroffiziers während des Balkankrieges isoliert, nachdem ihm aufgefallen war, dass dieser im Gegensatz zu seinen Kameraden von infektiösen Darmerkrankungen verschont blieb. Nissle erkannte schon vorher die Rolle der physiologischen Darmflora in Bezug auf die Pathologie infektiöser Darmerkrankungen und untersuchte den Antagonismus von Kolibakterien gegen pathogene Darmkeime. Die Herstellung und der Vertrieb der *E.coli* Stamm Nissle 1917 haltigen

Kapseln begann 1917 in der Firma G.Pohl in Danzig und wird seit 1970 von der Firma Ardeypharm GmbH in Herdecke unter dem Namen Mutaflor® weitergeführt.

### **1.4.2. Stammcharakterisierung und biologische Eigenschaften**

Das gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterium EcN ist in der Sammlung von Mikroorganismen als E.coli DSM 6601 registriert und als Serovar 06:K5:H1 vom WHO-Referenzzentrum typisiert<sup>93</sup>.

Die Genomstruktur von EcN ist vollständig aufgeklärt<sup>93</sup>. Als strukturelle Besonderheiten besitzt dieses Probiotikum kleine genetisch stabile Plasmide (pMUT1, pMUT2), die keine Pathogenitätsfaktoren oder Antibiotikaresistenzen besitzen und nicht auf andere E.coli Stämme transferierbar sind<sup>94</sup>. Es konnte die Bildung von Mutaflorin, einem spezifisches Mikrozin, welches in Kultur antibakteriell wirksam ist, nachgewiesen werden<sup>95</sup>. In vitro reduziert es die Adhäsion und Invasion von Salmonellen und anderer invasiver Pathogene<sup>95</sup>. Dieser Effekt wird durch bisher unbekannte Faktoren bedingt. In klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass EcN die Stuhlfrequenz und Konsistenz bei Patienten mit Obstipation verbessert<sup>96</sup>. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Neugeborene, welche direkt nach der Geburt mit Mutaflor® behandelt wurden, weniger potentielle Pathogene im Stuhl und erhöhte Serum IgA-Konzentration<sup>97</sup> aufweisen als unbehandelte Kinder<sup>98</sup>. Dies kann bei den Kindern auch noch 5 Monate nach dem Absetzen der Therapie nachgewiesen werden, was auf eine Kolonisationsfähigkeit des Keims im juvenilen Darm hindeutet<sup>98</sup>. Weiterhin konnten positive Effekte bei kollagener Kolitis durch den therapeutischen Einsatz von EcN beobachtet werden<sup>99</sup>.

Bei oraler Gabe vermindert EcN die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in mesenterischen Lymphknoten verschiedener Mausmodelle und verbessert den histologischen Befund im chronischen Colitismodell<sup>100</sup>.

Durch immunologische in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass EcN die Adhäsion und Invasion von pathogenen E.coli-Stämmen an Epithelzellen bei Koinfektion und Präinkubation inhibiert. Als Grundlage hierfür wird die starke Adhäsion des Bakteriums genannt. Diese kann zur Bildung eines Biofilms führen, welcher die für die Invasion notwendigen Rezeptoren maskiert und somit die intestinalen Zellen schützt<sup>101</sup>.

Im Gegensatz zu anderen E.coli Stämmen induziert EcN 1917 die Expression von humanem Beta-Defensin-2 in CaCo-Zellen. Defensine sind eine kleine Gruppe antimikrobieller Peptide. Sie werden durch intestinale Epithelzellen sezerniert und stärken die Barrierefunktion der Mucosa<sup>102</sup>.

Hinsichtlich der Nebenwirkungen bei oraler Gabe von Mutaflor® liegen keine Berichte über Zwischenfälle vor. Beschriebenes Auftreten von Flatulenzen ist Zeichen einer Überdosierung und durch Dosisreduktion sicher zu therapieren<sup>103</sup>. Obwohl sehr viel über die biologischen Eigenschaften von EcN bekannt ist, es lange vielfältige Anwendung als Therapeutikum findet und klinisch gesicherte Studien vorliegen, ist der Mechanismus, über den das Bakterium seine positiven Effekte erzielt, noch weitgehend unbekannt.

## **1.5. Die Zell-Matrix Adhäsion**

### **1.5.1. Extrazelluläre Matrix**

Gewebezellen interagieren mit komplexen Makromolekülen, welche als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet werden, sowie mit speziellen Oberflächenrezeptoren, den Integrinen<sup>104</sup>. Zur EZM werden weiterhin zahlreiche Proteoglykane, Kollagene<sup>105,106</sup>, Laminin-Isoformen<sup>107</sup>, Nidogen, Elastin, Fibronectin und andere Komponenten gezählt. Nachfolgend wird auf die zwei Hauptbestandteile der EZM, Fibronectin und Kollagen, näher eingegangen.

#### Kollagen

Von diesen Hauptproteinen der EZM sind derzeit 16 verschiedene Isoformen nachweisbar. Sie bilden die Familie der Ankerfibrillen. Es sind charakteristische Faserproteine und ubiquitär bei allen vielzelligen Organismen in Knochen, Haut, Sehnen und Knorpeln.

Drei Polypeptidketten winden sich charakteristisch umeinander und bilden eine Tripelhelix<sup>108</sup>.

#### Fibronectin

Das große Glykoprotein besteht aus zwei fast identischen Untereinheiten, welche durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Durch alternatives Splicing werden verschiedene Isoformen gebildet. Diese enthalten verschiedene Aminosäure-Motive z.B. RGD, RGDS und LDV, welche für die Zelladhäsion wichtig sind und von ausgewählten Integrinen erkannt werden<sup>109</sup>. Weiterhin wird bei Fibronectin eine Beteiligung an der Migration und Differenzierung beobachtet<sup>110</sup>.

### 1.5.2. Zelladhäsionsmoleküle

Durch Zelladhäsion binden Zellen an angrenzenden Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) und an die umgebende EZM (Zell-Matrix-Adhäsion). Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Ausbildung und Entwicklung multizellulärer Organismen und entscheidend für die Zellmorphogenese und Gewebeentstehung, sowie die Zellproliferation, -migration und -differenzierung<sup>111</sup>.

Durch spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren wird die Umstrukturierung des Zytoskeletts und die Induktion von Signalkaskaden vermittelt<sup>112</sup>. Sie dienen der intrazellulären Signalübertragung und treten mit anderen zellulären Komponenten, wie z.B. dem Zytoskelett oder Signal- und Botenstoffen in Wechselwirkung.

Aufgrund struktureller Merkmale lassen sich Zelladhäsionsmoleküle folgendermaßen einteilen:

1. Integrine
2. Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie
3. Selektine
4. Cadherine

### Integrine

Integrine gehören zur Familie der Zelloberflächen-Glykoproteine<sup>113</sup>. Diese nicht-kovalent gebundenen Heterodimere bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (UE)<sup>114</sup>.

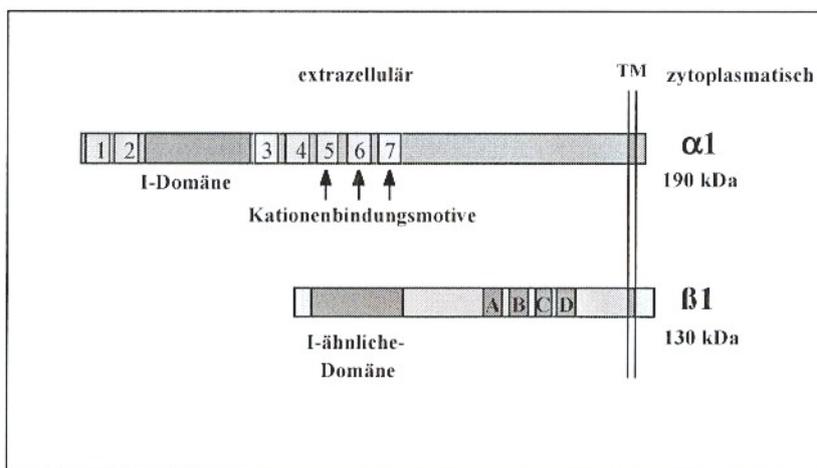
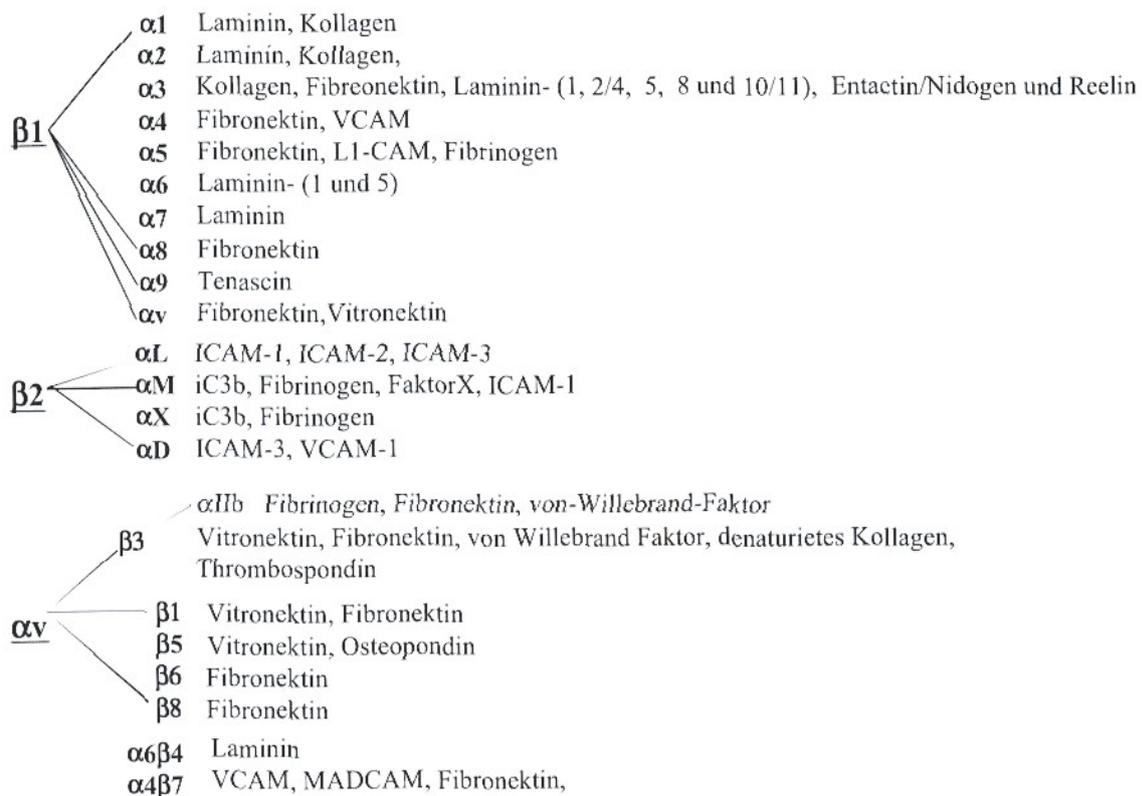


Abb.1: Strukturelle Darstellung der Integrine ( P.V. Lorini, 2004)

Durch die Sequenzierung des humanen Genoms sind  $18\alpha$ - und  $8\beta$ -Integrin-Untereinheiten identifiziert worden, welche in Kombination 24 funktionelle Integrine ergeben<sup>115</sup>, teilweise beruhend auf der Abwesenheit von  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - oder  $\alpha v$ -Integrin-Untereinheiten<sup>116</sup>.

Die Mitglieder der  $\beta 1$ -Subfamilie binden ausschließlich Proteine der EZM und interagieren intrazellulär mit Proteinen des Zytoskeletts<sup>117</sup>.

Die  $\beta 2$ -Subfamilie wird nur auf Leukozyten exprimiert. Es werden vier Isoformen unterschieden<sup>116</sup>.



**Abb. 2: Darstellung der Integrin-Subfamilien und entsprechender Liganden (Jin&Varner, 2004)**

### Funktionen und Aufgaben der Integrine

Integrine können sich bei der Ausbildung der Adhäsionen mit anderen transmembranären Proteinen verbinden. Dadurch lassen sich unterschiedliche Zellreaktionen auslösen.

Zu den fokalen Proteinen werden Protein-Kinasen z.B. Integrin-linked-Kinase (ILK) und Signalmoleküle wie p130cas gezählt<sup>118</sup>. Fokale Adhäsionen konzentrieren die Boten der Signaltransduktion und leiten diese in den Zellkern weiter<sup>115</sup>.

Eine weitere Funktion der Integrine ist die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionkaskaden. Integrin-abhängig wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht, der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst, die Aktivität der Familie der Rho-GTPasen moduliert sowie Thyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierung induziert<sup>119-122</sup>. Die Modulation der Aktivität der Familie der Rho-GTPasen führt zur Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Als multifunktionale Adhäsionsrezeptoren sind Integrine an der Regulation weiterer Vorgänge, wie zum Beispiel Spreiten, Migration, Differenzierung, Apoptose und Zellzyklus-Progression beteiligt<sup>120,123</sup>.

Weiterhin dienen Integrine der Organisation der extrazellulären Matrix und der Kontrolle der Fibrillogenese einiger extrazellulärer Matrixproteine wie zum Beispiel Fibronectin<sup>124</sup>. Eine Förderung der Genexpression durch Integrine wurde beobachtet<sup>125</sup>, wobei der Mechanismus der Wirkungsentfaltung derzeit auf Grund zweier unterschiedlicher Hypothesen nicht eindeutig ist<sup>120,126</sup>.

### 1.6. Toll-like-Rezeptoren

Erstmals wurde Toll, als ein für die dorsoventrale Polarisation entscheidendes Gen, bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert<sup>127,128</sup>. Diese Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären leukin-reichen Region, einer transmembranalen Region sowie einem intrazellulären Bereich, der dem IL-1 Rezeptor (IL-1R) ähnelt. Dieser intrazelluläre Bereich wird als Toll-Interleukin-Rezeptor Domäne (TIR)<sup>129</sup> bezeichnet. Beide Rezeptoren, der humane IL-1 Rezeptor und der Toll-Rezeptor induzieren Signaltransduktionswege, welche zur Aktivierung von NFκB (Nukleärer Faktor κB)<sup>130</sup> nötig sind. Weiterhin wurde eine Schlüsselrolle der Toll-Rezeptoren bei der Induktion von Immunantworten bei Säugetieren nachgewiesen<sup>131</sup>. Von den Toll-Rezeptoren der Fruchtfliege leiten sich die bei Mensch und Maus bekannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) ab.

1997 wurde das erste humane Toll-Homologon, der Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4), identifiziert<sup>132</sup>. Es zeigte sich, dass aktive TLR-4 Mutanten NF-κB abhängige Gene für Zytokine, z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und kostimulierende Moleküle, z.B. das für naive T-Zellen bedeutende CD 80, aktivieren<sup>132</sup>. Es folgte die Identifizierung weiterer Toll-like-Rezeptoren mit ähnlicher Homologie zu Toll-Rezeptoren und Interleukin-1 Rezeptoren<sup>133</sup>.

Die TLR bestehen, ähnlich den Toll-Rezeptoren, aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne, welche transmembranär lokalisiert ist. Der intrazelluläre Anteil ähnelt sowohl dem IL-1 Rezeptor als auch dem Toll-Rezeptor und wird als Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) bezeichnet<sup>129</sup>.

Der spezifische Ligand "Spätzle" der Toll-Rezeptoren ist ein durch die Verarbeitung mikrobieller Bestandteile entstandenes Molekül<sup>134</sup>. Es fand sich kein Hinweis auf das Vorhandensein eines ähnlichen humanen Liganden bei den TLR.

Unter der Bezeichnung Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS) werden Liganden zusammengefasst, deren immunmodulatorischen Effekte seit langem bekannt sind. Vertreter dieser PAMPS sind Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle Lipoproteine (BLP), bakterielle DNA-Abschnitte (CPG), Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane<sup>135</sup>.

### 1.6.1. Der Toll-like-Rezeptor-2

TLR-2 wird unter anderem auf der Fraktion der  $\delta\gamma$ -T-Zellen exprimiert<sup>136</sup>. Die Bindung von TLR-2 erfolgt hauptsächlich an Bestandteile von grampositiven Bakterien<sup>134</sup>. Als gesichert gilt die Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen (BLP), Peptidoglykane (PG), ganzen Gram-positiven Bakterien, Mykobakterien und Hefen. Die Möglichkeit von Lipoteichonsäure als möglicher Ligand wird derzeit kontrovers diskutiert<sup>137-139</sup>.

Mit Hilfe von Überexpressions-Experimenten wurde TLR-2 als Rezeptor für *Bacteroides subtilis*-, *Staphylococcus pyogenes*- und *Staphylococcus sanguis*-LTA identifiziert<sup>140</sup>. 1999 wurde durch Takeuchi die LTA-Erkennung via TLR-4 durch induzierte inflammatorische Mediatoren in TLR-2-Knock-Out- und Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in TLR-4-Knock-Out (KO) Mäusen durch *Staphylococcus aureus*- und *Staph. sanguis*-LTA nachgewiesen. Neueste Forschungen beschreiben LTA verschiedener Gram-positiver Bakterien als Liganden von TLR-2<sup>141</sup>. Die möglicherweise CD14 abhängige Erkennung von Lipopolysacchariden erfolgt spezifisch bei *Porphyromonas gingivalis* und *Leptospira interrogans*, nicht aber bei *Escherichia coli* LPS<sup>142</sup>.

### 1.6.2. Der Toll-like-Rezeptor-4

Nach neuesten Forschungen fungiert TLR-4 als entscheidender physiologischer LPS-Rezeptor<sup>143,144</sup>. Neben TLR-4 dienen CD14 und MD-2, ein sezerniertes Molekül ohne transmembranäre Domäne, als wichtige Faktoren für die LPS-Erkennung<sup>145</sup>. Es scheint eine Bindung von MD-2 an die extrazelluläre Domäne von TLR-4, aber auch von TLR-2 möglich<sup>146</sup>.

Eine weitere Aufgabe der TLR-4 ist die Immunzellaktivierung durch bakterielle und virale Proteine<sup>147</sup>. Über die Art der Bindung von LPS an den Rezeptor läßt sich derzeit keine klare Aussage treffen. Aktuelle Erkenntnisse favorisieren eine direkte Bindung<sup>148</sup>.

Fibronectin Extra Domain A (EDA), Taxol und Hitze-Schock-Protein 60 (HSP60) sind körpereigene Substanzen, welche ebenfalls durch TLR-4 erkannt werden. Fibronectin (EDA) entsteht bei Gewebeverletzungen durch alternatives Splicing und induziert über TLR-4 eine inflammatorische Reaktion in Monozyten. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus in vivo die inflammatorische Reaktion bei Gewebsschädigung induziert<sup>149</sup>.

### **1.6.3. TLR-vermittelte Zellaktivierung**

Nach Bindung der spezifischen Liganden durch TLR-2, CD14 und eventuell MD-2 bzw. durch TLR-4, CD14 und MD-2 gelten zwei Wege der intrazellulären Signalkaskade als möglich.

Einerseits erfolgt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oder andererseits eine Stimulation der zur AP-1 Familie der Transkriptionsfaktoren gehörenden Proteine JUN und FOS.

NF- $\kappa$ B ist ein entscheidender Faktor der Aktivierung immunrelevanter Gene z.B. für die induzierte Synthese entzündungsvermittelnder Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1)<sup>150</sup> und bakterizider Radikale (NO)<sup>151</sup>. Er wurde 1986 erstmalig in B-Zellen beschrieben<sup>152</sup>. Nach der Konformationsänderung des Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) werden die MyD88 und das Toll-interacting Protein (TOLLIP) rekrutiert, gefolgt von der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen. Diese gehören der Familie der IL-1-receptor-associated kinasen (IRAK) an. Anschließend erfolgt die Verbindung von IRAK-1 und -2 mit dem TIR-receptor-associated factor 6 (TRAF6), einem weiteren Adaptorprotein innerhalb der intrazellulären Signalkaskade. Dieser aktiviert die TGF- $\beta$ -activated kinase (TAD1) und die mitogen-activated protein kinase kinase (MKK6).

Nun ist einerseits eine Aktivierung der c-JUN N-terminal kinase (JNK), der p38MAPKinase oder andererseits eine Beeinflussung der NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) und Bildung von I $\kappa$ -B und anschließender Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern möglich<sup>153</sup>. I $\kappa$ -B sind im Zytoplasma, an NF- $\kappa$ B gebundene Proteine und werden nach extrazellulärer Stimulation mit Hilfe proinflammatorischer Zytokine, Bakterien und ihrer Toxine, Viren, Oxidantien oder LPS durch den I $\kappa$ -B-Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert. Anschließend wird I $\kappa$ -B von NF- $\kappa$ B abgespalten und im Gefolge degradiert.



### Lipopolysaccharid (LPS)

Das Endotoxin Gram-negativer Bakterien besteht aus einem extrazellulären Anteil, dem Kernpolysaccharid und dem Lipid A. Der extrazelluläre Anteil (O-Antigen) besteht aus 3-20 Hexosemolekülen, die für die Spezifität des LPS und die Hydrophilie der Oberfläche verantwortlich sind. Das Kernpolysaccharid setzt sich aus einem Inneren und Äußeren Anteil zusammen. Der äußere Anteil, Ketodesoxy-oktonat, ist für die Funktion der Zellmembran unentbehrlich. Das amphiphile Lipid A ist der entscheidende Bestandteil für die Virulenz des LPS und Verankerung in der Zellwand. LPS bindet über CD14, LBP und MD-2 an den TLR-4, stimuliert eine IL1R ähnliche Reaktionskaskade, die letztendlich in B-Zellproliferation, vermehrter Produktion von Akute-Phase Proteinen, sowie der Sekretion der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-12 in Makrophagen und Monozyten endet<sup>158</sup>.

### Bakterielle Lipoproteine (BLP)

Das erste bakterielle Lipoprotein (Braun's Lipoprotein) wurde von Volkmar Braun (Universität Tübingen) vor mehr als 30 Jahren aus *Escherichia coli* isoliert und charakterisiert<sup>159</sup>. Bereits 1975 wurde von V. Braun et al. die Stimulation des murinen B-Zellwachstum durch isoliertes Lipoprotein gezeigt<sup>160</sup>. Weiterführende Forschungen von Norgard bzw. Kreuz et al. belegten die Fähigkeit der Lipoproteine unterschiedliche Bakterien, NF- $\kappa$ B<sup>161</sup> und die Cytokin-Produktion<sup>162</sup> zu aktivieren.

Durch weiterführende Forschungen folgte die Synthese eines Analogons des *E. coli* Lipoproteines, welches eine dem natürlich vorkommenden Lipoprotein gleichwertige Aktivierung von B-Zellen, Monozyten und Neutrophilen<sup>163</sup> aufweist. Die synthetischen Analoga des Braunschen Lipoproteins fungieren zudem in vitro und in vivo als potente Immunadjuvantien<sup>164</sup>. Trotz intensiver Untersuchungen blieb lange Zeit unklar, über welchen Mechanismus die Lipopeptide die vermittelte Immunantwort auslösen. Erst die Entdeckung der TLR und die Zuordnung der Lipopeptide und Lipoproteine zu den Liganden des TLR-2 ermöglichte ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise der Lipoproteine<sup>165</sup>.

## 1.7. Aufgabenstellung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind weltweit verbreitet und werden multifaktoriell verursacht, wobei die genaue Pathogenese noch nicht bekannt ist. Die Krankheitsmanifestation erfolgt durch die Aufhebung der Toleranz gegen die eigene Darmflora bei prädisponierten Wirten. Der probiotische Stamm *Escherichia coli* Nissle 1917 moduliert das mukosale Immunsystem und wird in der Therapie entzündlicher Darmerkrankungen erfolgreich eingesetzt. Die Wirksamkeit der oralen Gabe des Probiotikums *Escherichia coli* Nissle 1917 zur Remissionserhaltung der Colitis Ulcerosa wurde in doppelt-randomisierten Studien nachgewiesen. Es ist somit eine Therapiealternative zur klassischen Anwendung von 5-Aminosalicylaten. Trotz seines weit verbreiteten klinischen Einsatzes sind jedoch die Wirkmechanismen dieses Probiotikums relativ unbekannt.

Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass EcN 1917 die Aktivierung und Expansion von peripheren (PBT), aber nicht die der ortsständigen mukosalen T-Zellen (LPT) inhibiert<sup>166</sup>. Da angenommen werden kann, dass ein Teil der biologischen Wirkung von EcN über die Interaktion von PAMPs mit TLR erfolgt, war das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit die genauere Charakterisierung der Signaltransduktion und Signalverarbeitung des probiotischen Bakteriums *Escherichia coli* Nissle 1917 *in vitro*, um somit einen Erklärungsansatz für seine klinische Wirksamkeit zu finden. Hierfür wurde der Einfluss von EcN auf die Expression von Toll-Like Rezeptoren in humanen peripheren T-Zellen sowie die Wirkung auf HEK293 Zellen, welche mit TLR-2/TLR-4 infiziert wurden, untersucht.

Anschließend wurde auf die Frage der Beeinflussung des Zellzyklus der murinen peripheren (MPBT) und mukosalen T-Zellen (MLPT) bei Knock-Out Mäusen des TLR-2-, TLR-4- und des Wildtyp eingegangen. Zur genaueren Erforschung der Zell-Zell-Wechselwirkung von T-Zellen durch EcN wurden Untersuchungen zur Expression des Aktivierungsmarker CD69 und der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD154, durchgeführt. Weiterführend wurde der Frage einer möglichen Beeinflussung der Expression der Integrine der  $\beta 1$  Familie und Adhäsion von murinen T-Zellen durch Zusatz von EcN-CM nachgegangen.

Basierend auf Ergebnissen aus Vorarbeiten wurde die Hypothese der Signaltransduktion via Toll-like Rezeptoren, im speziellen TLR-4 und/oder TLR-2, sowie die Signalverarbeitung durch entsprechende Modulatoren, vorangestellt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Antikörper und Reagenzien

##### Chemikalien

##### Herkunft

E.coli	Ardeypharm, Herdecke
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
Fibronektin	Human plasma chemicon
Ficoll – Lösung	Amersham Biosciences, Upsala, SE
Luria Broth	Invitrogen, Karlsruhe
Maus-anti-human-CD3 AK	Janssen-Cilag, Neuss Orthoklone OKT3
Propidium – Jodid	Calbiochem, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

##### Medien

Complete Medium	10% FCS, 1,5% HEPES ( Merck, Darmstadt ) in RPMI 1640
Enzymatische Lösung	0,01% Kollagenase Typ III, (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), 0,01% DNase Typ I (Roche Diagnostics, Mannheim), 2,5% Penicillin-Streptomycin-Fungizone (Invitrogen, Karlsruhe) 1% Gentamicin (GibcoGBL, Paisley, Scotland), 2,5% 1M HEPES (Merck, Darmstadt) in HBSS
Hank`s buffered salt solution/DTT (HBSS)	75mg DTT (Sigma Aldrich, Taufkirchen) in 50 ml HBSS
PBS/BSA	20mg/ml BSA (Sigma Aldrich, Taufkirchen) in PBS, ph 7,4

### Puffer

Lyse – Puffer	0,5% 0,1% 1% 0,5% 5mM in PBS	Na-Deoxycholat, SDS, Triton-X100, NP-40, EDTA (alle Sigma Aldrich, Taufkirchen)
MACS – Puffer	0,5% 2mM in PBS, ph 7,2	BSA, EDTA (alle Sigma Aldrich, Taufkirchen)
Borat Puffer	0,1M 0,15M ph 8,5	Boric acid, Natriumborat, NaCl in ddH <sub>2</sub> O,

### 2.1.2. Reagenzien für murine Zellisolation

Puffer – Lösung A	10% 0,625mM 2,5% in RPMI 1640	FCS HEPES (Merck, Darmstadt) Penicillin–Streptomycin-Fungizone (Invitrogen, Karlsruhe)
Puffer – Lösung B	10% FCS 0,625mM 0,05mM 2,5% 0,14mg/ml in HBSS ohne Ca/Mg	HEPES (Merck, Darmstadt) EDTA (Sigma, Aldrich) Penicillin – Streptomycin – Fungizone (Invitrogen, Karlsruhe) DTT (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
Percoll – Lösung ( 30% ) (1000 ml)	300 ml 100 ml 25 ml in 575 ml dd H <sub>2</sub> O, ph 7,4, sterilfiltriert durch 0,22 µm Filter	Percoll 10x HBSS 1M HEPES (Merck, Darmstadt)
Collagenase D		Boehringer, Mannheim



Diese wurden mit Hilfe einer Pipette aufgenommen, zweimal erneut zentrifugiert (5 min, 450 g, 21 °C) und in PBS resuspendiert.

### **Isolation von mononukleären Zellen der Lamina propria**

Mononukleäre Zellen der Lamina Propria wurden aus Resektionsmaterial (Colon, Sigmoid) von Patienten mit nichtmalignen Darmerkrankungen, die aus üblichen medizinischen Indikationen wie zum Beispiel Sigmadivertikulitis im DRK-Klinikum Westend, Berlin operiert wurden, gewonnen. Ein entsprechendes Ethikvotum lag hierfür vor. Die Proben wurden gekühlt, in HBSS gelagert und innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet. Das OP–Resektat wurde mehrfach in HBSS gespült und abgetupft. Anschließend wurden ca. 1 mm breite Mucosastreifen, längs zum Organverlauf, geschnitten und in eine Petrischale mit HBSS gelegt. Nach dem erneuten Spülen wurden die Streifen langsam auf einem Magnetrührer in 50 ml HBSS mit 75 mg DTT gerührt, um die luminale Mucusschicht und enthaltene Bakterienkolonien zu entfernen. Daraufhin wurden die epithelialen Bindungen gelöst. Dies erfolgte durch dreimaliges Rühren für je 1 h in HBSS mit Penicillin-Streptomycin-Fungizone und EDTA. Dann wurden die Proben 2 mal in HBSS gewaschen, bevor sie 12 h in HBSS bei 4 °C gerührt wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben unter sterilen Arbeitsbedingungen in kleinstmögliche Stücke geschnitten, um dann 5 h, bei 37 °C in 100 ml Enzymatischer Lösung (siehe Materialien) langsam zu quirlen. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein autoklaviertes Netz abgegossen, zentrifugiert (5 min, 453 g, 21 °C), mit HBSS aufgenommen und abschließend mit Ficoll–Lösung unterschichtet. Durch Dichtegradientenzentrifugation (5 min, 2060 g, 21 °C) wurde eine Interphase gewonnen, welche abpipettiert, mit HBSS aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 450 g, 21 °C) wurde. Nach zweimaligem Waschen wurden die isolierten mononukleären Zellen der Lamina-Propria gezählt.

Alle Tierversuche wurden vom zuständigen Landesamt für Arbeitsschutz und zuständige Sicherheit genehmigt.

### **Isolation muriner PBMC**

MPBMC (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von Mäusen) wurden aus Blut von Wildtyp- und Knock–Out Tieren gewonnen. Der Transport ins Labor erfolgte auf Eis gekühlt innerhalb einer Stunde.

Die weiteren Zellisolationsschritte erfolgten analog zur Präparation aus humanem Blut.

### **Isolation muriner LPMC**

Die Präparation von MLPMC (mononukleäre Zellen der Lamina Propria von Mäusen) erfolgte von Darmresektaten der Wildtyp- und Knock-Out Tieren. Diese wurden dankenswerter Weise vom Institut für Infektionsbiologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. Zychlinski) des Max-Planck-Institutes, Berlin zur Verfügung gestellt. Der Transport erfolgte unter Wahrung kurzer Ischämiezeiten innerhalb einer Stunde, gekühlt in 0,9% iger Kochsalzlösung.

Zu Beginn wurden die Proben um Fett, Blut und Stuhlreste zu entfernen, sorgfältig in HBSS gespült. Anschließend wurde der Darm längs aufgeschnitten, erneut gespült und mit Zellstoff abgetupft um Reste von HBSS zu entfernen. Das Gewebe wurde innerhalb von 15 min so klein wie möglich geschnitten, durch Zugabe von 25 ml vorgewärmter Puffer-Lösung B resuspendiert und 15 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe durch einen 100 µm Filter gegeben. Anschließend wurde der Vorgang noch einmal wiederholt.

Im nächsten Schritt, welcher EDTA inaktivierte, wurden die Zellen mit 25 ml vorgewärmter Puffer-Lösung A versetzt, für 15 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und gefiltert. Während der Inkubationszeiten wurde die Zellsuspension alle 5 Minuten pipettiert. Anschließend wurde das Gewebe durch Zugabe von vorgewärmter, mit 400 U/ml Collagenase D und 0,01 mg/ml DNase Typ I verdünnter Puffer-Lösung A für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension, welche LPMC, Epithelzellen und Zelltrümmer enthält, wurde zuerst durch einen 100 µm, anschließend durch einen 40 µm Filter gegeben, mit HBSS aufgefüllt und bei Raumtemperatur (5 min, 450 g) zentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen in HBSS und mehrmaligem Auf- und Ab-Pipettieren entstand eine Einzelzellsuspension. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Durch Dichtegradienten-zentrifugation (20 min, 450 g, 4 °C) mit einer 30 %igen Percoll-Lösung wurden LPMC gewonnen. Die isolierten mononukleären Zellen der Lamina Propria befanden sich am Boden. Das Pellet wurde mit HBSS aufgenommen und zweimal gewaschen. Abschließend wurde die Zahl der vitalen Zellen durch Trypan Blau bestimmt.

### **Zellzählung**

Trypanblau dringt in sterbende oder abgestorbene Zellen ein, während Zellen mit intakter Zytoplasmamembran nicht angefärbt werden. Die nicht vitalen Zellen wurden mit einer 1:5 verdünnten Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) angefärbt und nicht mitgezählt. Die Zellzählung der vitalen Zellen erfolgte lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer.

### **Magnetische Trennung von T-Lymphozyten**

Einzelne Versuche wurden mit phänotypisch einheitlichen Zellpopulationen durchgeführt. Hierfür war es erforderlich, isolierte T-Zellen mittels magnetischer Beads zu sortieren. Dies sind magnetische Partikel, welche mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind, z.B. CD3 für die Selektion von T-Zellen. Isolierte PBMC wurden mit MACS Puffer gewaschen und anschließend in 40 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Nun erfolgte die Markierung der Zellen mit CD3 oder CD4 Mikrobeads. Nach Zugabe von 10 µl Antikörperbeads pro  $10^7$  Zellen, wurde 15 min bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurde die verwendete Separations Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) einmal mit 5 ml magnetischen Zellsortierungs-Puffer (MACS-Puffer) gespült, um den Pre-separations Filter mit Puffer anzufeuchten, gewaschen und in einem MidiMACS-Magneten platziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit MACS – Puffer gewaschen und in 1 ml resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 2,5 ml MACS-Puffer zweimal gespült. Die negativen Zellen passierten die Säule und wurden anschließend verworfen, während die positiven Zellen durch die magnetischen Beads in der Säule verblieben. Diese positiven Zellen wurden mit 2,5 ml MACS-Puffer isoliert. Anschließend wurde zweimal mit 2,5 ml MACS-Puffer gespült.

### **2.2.2. Präparation von Bakterienkulturen**

#### **Primärkultur**

Eine mit E.coli beschichtete Glasperle (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland) wurde in eine Kulturflasche mit 10 ml Luria Broth gegeben und anschließend für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **E. coli Conditioned Media (EcN-CM)**

Die Primärkultur wurde nach 16 h Inkubationszeit zentrifugiert (15 min, 1360 g 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in CM ohne Penicillin–Streptomycin–Fungizone aufgenommen. Die Lösung wurde erneut in einer Kulturflasche resuspendiert und für 1,5 h–2 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 1360 g, 4 °C) wurde der Überstand aufgenommen, durch einen 0.20 µm Filter steril filtriert und bei –80 °C eingefroren.

### **2.2.3. Zellkultur**

Die Kultur der humanen Zellen erfolgte über 48 h in 24-Loch Platten, konzentriert  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium. Die Zellkultur der murinen Zellen erfolgte ebenfalls über 48 h, jedoch in 48-Loch Platten, mit identischer Konzentration.

#### **Vorbereitung der Zellkulturplatten, Stimulation und Kultur humaner T-Zellen**

Die Zellkulturplatten wurden mit 1 ml Borat Puffer in Kombination mit dem 1:100 verdünnten Antikörper beschichtet und zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Lösung aus den Vertiefungen abgesaugt und zweimal mit PBS gespült.

Anschließend erfolgte die Zugabe isolierter Zellen in der Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 1 ml Complete Medium ohne Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden versuchsabhängig mit 0 vol %, 25 vol % oder 50 vol % EcN-CM bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Vertiefungen wurden zweimal mit PBS gespült und anschließend mikroskopisch auf Zellfreiheit überprüft. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (5 min, 450 g, 4 °C), wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Ein Teil wurde fixiert oder durchflusszytometrisch gemessen.

#### **Vorbereitung der Zellkulturplatten, Stimulation und Kultur muriner T-Zellen**

Die Vorbereitung der verwendeten Zellkulturplatten erfolgte mit Anti-Maus-CD3 (e Bioscience, San Diego, Kalifornien). Hierfür wurden 7,5 µg/ml OKT3, einem monoklonalen, gentechnisch hergestellter Maus-Antikörper, in sterilem PBS gelöst und je 100 µl der Lösung in jede Vertiefung der Platte gegeben. Diese wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar vor Zugabe der Zellsuspension wurde die Platte vorsichtig mit sterilem PBS zweimal gewaschen. Das weitere Verfahren erfolgte analog, wie oben beschrieben, zu den humanen Zellen.

#### **Zellfixierung**

Um intrazelluläre Antigene und den DNA-Gehalt von isolierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmen zu können, wurden diese in 90 % Methanol fixiert. Von den kultivierten Zellen wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt, welche mit 500 µl kaltem PBS gefüllt und anschließend bei 450 g für 5 min, 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl kaltem PBS aufgenommen. Zur Fixierung und Stabilisierung wurde 900 µl -20 °C kaltes Methanol hinzugegeben. Die fixierten Zellen konnten nun über Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.

### **2.2.4. Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem FACSCalibur™, BD Pharmingen, Heidelberg, durchgeführt. Hierbei werden in einem Flüssigkeitsstrom bewegte Zellen beim einzelnen Passieren durch einen Laserstrahl analysiert. Es können Subpopulationen einer Probe identifiziert und aufgrund ihrer Größe, Lichtbrechungseigenschaften und Fluoreszenz isoliert werden. Man verwendet Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Reagenzien, um Proteine, DNA-Gehalt, Oberflächenmerkmale und andere Merkmale zu messen.

#### **Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes**

Um den DNA-Gehalt zu bestimmen wurden die isolierten Zellen in 90% Methanol fixiert und anschließend gefärbt. Dies erfolgte durch Zentrifugieren bei 450 g für 5 min und anschließendem zweimaligen Waschen mit PBS. Nach Zugabe eines nichtkonjugierten Primärantikörpers wurde bei 4 °C dunkel für 45 min inkubiert. Um den DNA-Gehalt zu bestimmen wurde durch Zugabe von 5 µl RNase A und 425 µl PBS die RNA der Zellen zerstört. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 15 min. Abschließend wurden die mit 75 µl Propidium Jodid versetzten Zellen auf Eis für 15 min inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen. Isotypkontrollen wurden stets mitgeführt.

#### **Expression von pathogen assoziierten molekularen Mustern**

Um den Einfluß von pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) auf die Wirkung von EcN zu untersuchen, wurden CD3 stimulierte und unstimulierte PBT für 3 Tage mit aufgereinigtem LPS-EcN (2 µg/ml) oder bakteriellen Lipoproteinen (BLP) (100 ng/ml) sowie vergleichend ohne diese Zusätze kultiviert. Nach der Inkubation wurde die DNA wie unter 3.4.1. beschrieben gefärbt und die Intensität der Fluoreszenz im FACS gemessen.

#### **Färbung mit Sekundärantikörper**

Isolierte, kultivierte Zellen wurden in PBS bei 4 °C und 450 g 5 min zentrifugiert und zweimal in Flowpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper gefärbt. Dies erfolgte mit 1 µl des jeweiligen Antikörpers und 25 µl Flowpuffer. Vor der Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurde die Lösung durch Schütteln gut gemischt. Nach der Inkubation wurde die Zelllösung in Flowpuffer aufgenommen, erneut zentrifugiert und zweimal in Flowpuffer gewaschen. Die Zugabe des jeweiligen Zweitantikörpers erfolgte im abgedunkelten Raum, die Dunkelinkubation auf Eis dauerte 30 min. Nach dem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

### 2.2.5. Adhäsionsassay

Unter Verwendung des Vybrant Cell Adhäsions Sets (Molecular Probes, Oregon, USA) welches Calceinacetoxymethylester (Calcein AM) als Komponente A enthält, wurde die Messung adhärenter Zellen auf einer Platte mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Calcein hat ein Absorptionsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 717 nm. Vor der Nutzung wurde Calcein AM aufgetaut und kurz zentrifugiert. Isolierte Zellen wurde zweimal mit PBS gewaschen, in RPMI 1640 mit einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  /ml resuspendiert und mit 5  $\mu$ l Calcein AM/ml Zellsuspension versetzt. Es wurde gut gemischt und anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die mit Calcein gefärbten Zellen wurden nun zweimal mit 450  $\mu$ l, 37 °C, 5 min gewaschen, erneut in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI aufgenommen und je 100  $\mu$ l Suspension auf vorbereitete Platten pipettiert.

Die Vorbereitung der Platten erfolgte einen Tag vor Versuchsdurchführung. Zwei Platten mit jeweils 96 Vertiefungen wurden pro Vertiefung mit 50  $\mu$ l Kollagen oder 50  $\mu$ l Fibronectin (Verdünnung 1:5 mit PBS) oder ohne Zusatz über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am Versuchstag wurden beide Platten unmittelbar vor dem Bestücken mit der Zellsuspension zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach dem Aufpipettieren der Calcein gelabelten Zellen wurden die Platten 2 h bei 37 °C inkubiert. Um nicht adhärenente Zellen zu entfernen, wurde Platte A viermal mit vorgewärmten RPMI gefüllt und anschließend durch Drehen auf einem saugfähigen Papiertuch entleert. Platte B wurde als Kontrolle verwendet und nicht gewaschen.

Abschließend wurde jedes Loch mit 200  $\mu$ l PBS gefüllt und im Mikroplate Reader gemessen.

Platte B wurde zuerst mit optimaler Verstärkung gemessen. Der ermittelte Wert wurde dann manuell bei Platte A abgeglichen.

### 2.2.6. Transfektion

#### Transfektion

Die Transfektion wurde mit FuGENE 6 Transfektions Reagenz (Roche, Mannheim) durchgeführt. Diese besteht aus einer Mischung aus Lipiden und Lipoproteinen. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen (HEK293) mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml je 1ml/Well in 12-Well-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion waren die Zellen zu 50-80 Prozent konfluent. Die Plasmid-DNA wurden für mehrere Anwendungen in den entsprechenden Verhältnissen zusammenpipettiert und mit sterilem Wasser verdünnt. Der Mix wurde bei -20 °C gelagert. Beim Pipettieren des Transfektionsansatzes sollte die Reihenfolge Medium–FuGENE

6-DNA eingehalten werden. Es wurde darauf geachtet, dass FuGENE 6 nicht an der Gefäßwand haften bleibt, da dessen Lipidkomponente dort dauerhaft adhären und so die Transfektionseffizienz beeinträchtigen könnte. Zur Transfektion wurden 52,5 µl Volumen pro Well auf die Platte gegeben und weiter bei 37 °C inkubiert.

### **Stimulation**

Nach 24 h wurden die Zellen mit 500 µl TLR-2 oder TLR-4 stimuliert. Als Positivkontrollen für TLR-4 wurden verschiedene Mengen LPS E. coli (U. Zähringer, Forschungszentrum Borstel, Germany) und für TLR-2 Pam3Cys-Ser-Lys4 (A. Zychlinsky, Max-Planck Institut Berlin, Germany), das synthetische Analogon eines bakteriellen Lipoproteins verwendet. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die nicht transfiziert und nicht stimuliert, sowie Zellen, welche transfiziert aber nicht stimuliert worden waren. Die Zellen wurden weiterhin für 20 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

### **β-Gal Reporter Gen Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz**

β-Galactosidase dient im Zellstimulationstest als Rezeptorprotein. Das Gen für β-Galactosidase wurde zusammen mit den TLR in die Zellen transfiziert. Die mit diesem Test bestimmte Aktivität der β-Galactosidase dient als Maß für die Transfektionseffizienz, da sie direkt von der Menge der zur Verfügung stehenden Genkopien abhängt. Zu den lysierten Zellen wurde Galacton Plus gegeben, dieses wird durch β-Galactosidase gespalten. Ein pH von 7,8 garantiert optimale Reaktionsbedingungen. Die Zugabe einer Initiationslösung führte über eine pH Erhöhung auf 12 zu Lichtblitzen. Diese können in einem Luminometer detektiert werden. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 100 µl Lysis Puffer versetzt und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Zell-Lysat wurde auf eine 96-Well Platte überführt und bei 4000 RPM für 7 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurde mit 50 µl Substratlösung versetzt und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 25 µl Initiationslösung wurde sofort die Lichtproduktion über einen Zeitraum von 1000 ms gemessen. Lagen die Messwerte außerhalb des Messbereichs, wurde die Zeit auf bis zu 200 µs reduziert.

### **Luciferase-Assay zur Bestimmung der Rezeptoraktivität**

Mit dem Luciferase-Test wurde ermittelt, ob die Stimulanzien mit dem TLR reagieren.

Die Luciferase ist das Rezeptorprotein, das Gen dafür wurde zusammen mit den Toll-like Rezeptoren in die Zellen transfiziert. Luciferase wird nur exprimiert, wenn NFκB in aktiver Form vorliegt, dies erfolgt, wenn ein Ligand mit einem Toll-like Rezeptor interagiert. Ist das Enzym vorhanden, katalysiert es die ATP-abhängige Carboxylierung des Substrat Luciferin. Dabei wird ein Lichtsignal freigesetzt, welches im Luminometer detektierbar ist. Je 20 µl des abzentrifugierten Zellüberstandes aus der Lyse wurden auf eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 50 µl Luciferasereagenz versetzt. Die Lichtfreisetzung wurde sofort gemessen. Die beschriebene Transfektion erfolgte mit Unterstützung der AG Prof. Dr. R.R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charite Universitätsmedizin Berlin.

### 3. Ergebnisse

Das Probiotikum E.coli Nissle wird in der Behandlung von CED eingesetzt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass EcN die Funktion von humanen peripheren T-Zellen modifiziert. Wir untersuchten daher nachfolgend mögliche hierfür zugrunde liegende Signaltransduktionsmechanismen.

#### 3.1. Einfluß von pathogen assoziierten molekularen Mustern auf die Zellzyklusprogression von PBT

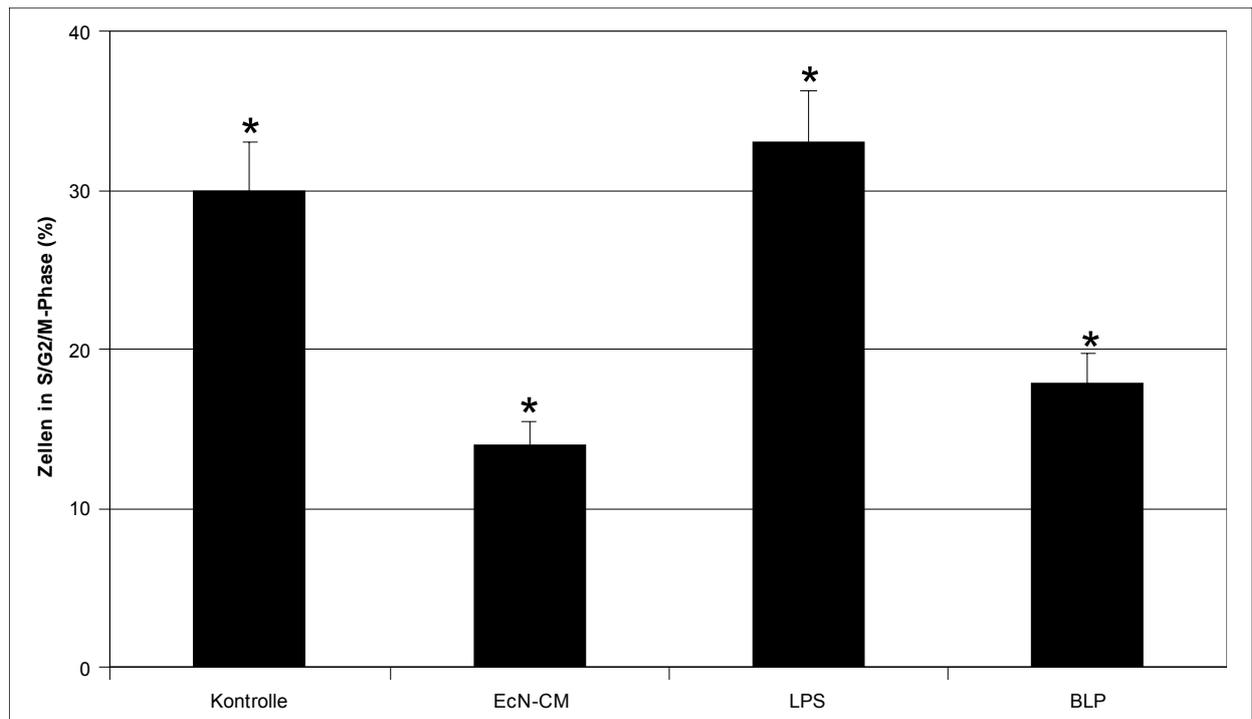
Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs) sind konservierte bakterielle Produkte, deren immunmodulatorischen Effekte seit langem bekannt sind. Zu diesen zählen u.a. bakterielle Lipoproteine (BLP) und Lipopolysachcharide (LPS). LPS bildet die äußere Hülle von Gram-negativen Bakterien, wie zum Beispiel EcN.

Diese molekularen Muster werden von den Rezeptoren der Toll-like Familie (TLR) erkannt. So vermittelt der TLR-4 die LPS-induzierte Signalübertragung und der TLR-2 die Lipoprotein-induzierte Signalübertragung.

Um den Einfluss von PAMPs auf die Signaltransduktion von EcN zu untersuchen, wurden anti-CD3 stimulierte und unstimulierte PBT für 3 Tage mit aufgereinigtem LPS oder BLP sowie vergleichend ohne diese Zusätze kultiviert. Anschließend wurde die DNA mit Propidium Jodid (PI) gefärbt und die Zellzyklusprogression durchflußzytometrisch gemessen.

Nach der Stimulation befanden sich  $30 \pm 1,8\%$  der Zellen der Kontrollgruppe in der S/G2/M-Phase. Im Gegensatz hierzu kam es durch Zugabe von EcN-CM zu einer Reduktion der proliferierenden Zellen auf  $14,5 \pm 2,7\%$  ( $p < 0,05$ ).

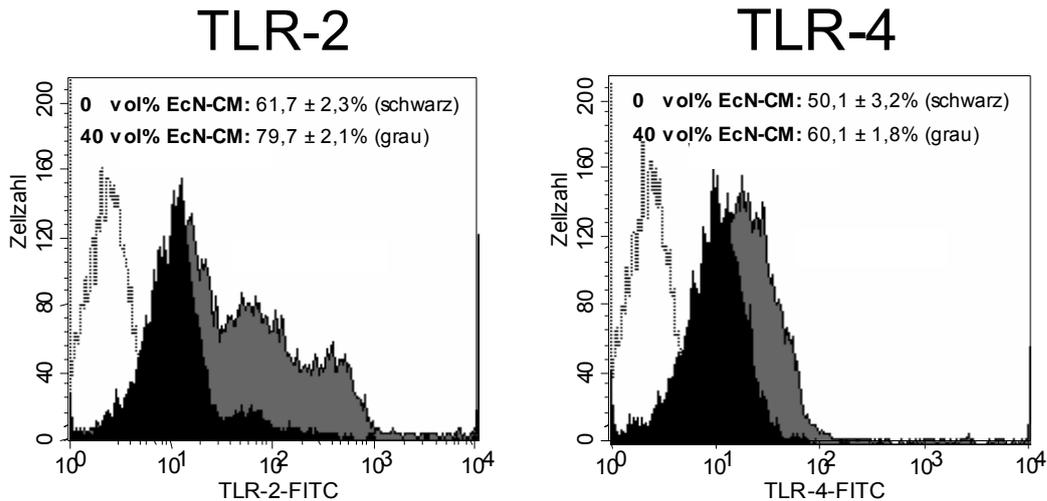
Nach Zugabe von LPS entsprach der Anteil der Zellen in der S/G2/M-Phase  $31,9 \pm 1,1\%$  und somit dem Anteil der Kontrollgruppe. Hingegen führte die Zugabe von BLP zu einer mit EcN-CM vergleichbaren Inhibierung der Zellzyklusprogression und Reduktion der proliferierenden Zellen auf  $17,9 \pm 1,7\%$  ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.1.1. Einfluß von bakteriellen Lipoproteinen (BLP) und Lipopolysacchariden (LPS) auf die Zellzyklusprogression von peripheren T-Zellen.** Die Bewegung der Zelle aus der Ruhephase in die S/G2/M-Phase führt zur Zellteilung und Proliferation des Zellklons. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen in der S/G2/M-Phase nach Zusatz von EcN-CM, LPS und BLP dargestellt (\*=  $p < 0,05$  vergleichend zur Kontrollgruppe,  $n = 7$ ).

### 3.2. Einfluss von EcN auf die TLR-Expression von PBT

Es konnte unter 3.1. gezeigt werden, dass der Effekt von EcN durch BLP, nicht aber durch LPS, imitiert wird. Um die Bedeutung der TLR-Expression und die Funktion der TLR als Rezeptoren der PAMPs im Hinblick auf die Wirkungsweise von EcN genauer zu charakterisieren, wurden PBT 3 Tage mit anti CD3 stimuliert und in Anwesenheit sowie in Abwesenheit von EcN-CM kultiviert. Die Kontrollen bestanden aus unstimulierten Ansätzen zu den gleichen Zeitpunkten. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend die Expression von TLR-2 und TLR-4 auf den PBT gemessen.



**Abb. 3.2.1. Erhöhte Expression von TLR-2 und TLR-4 auf PBT nach Zugabe von 40 vol% zellfreiem Escherichia coli Nissle 1917 Überstand.**

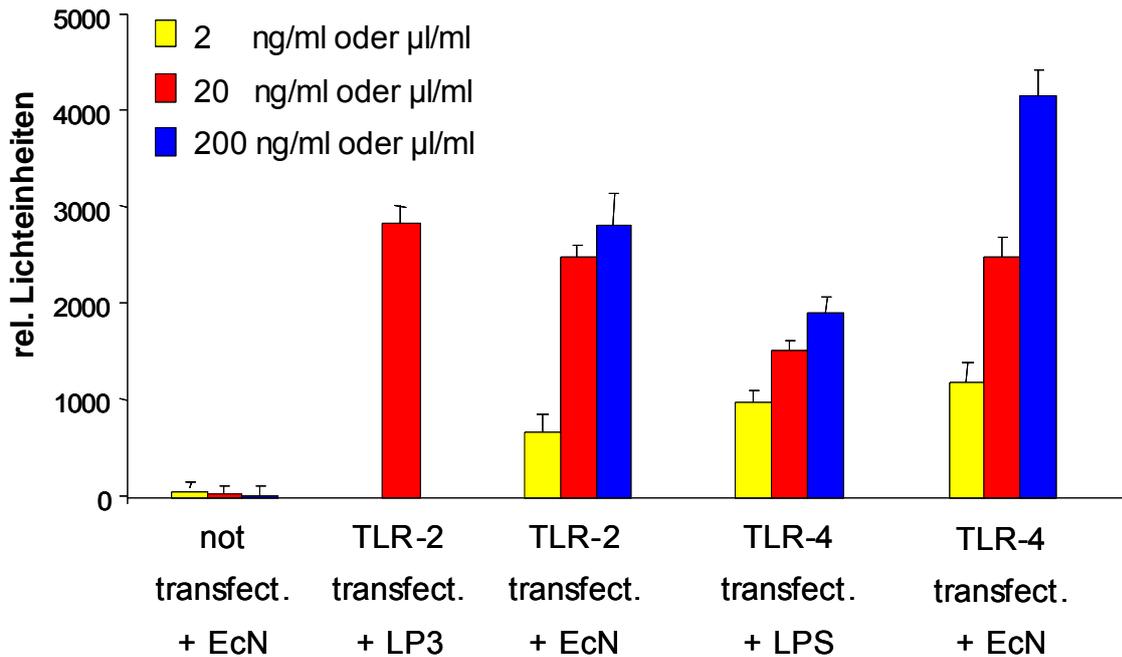
Nach Zugabe von EcN-CM zeigte sich eine Zunahme der TLR-2 Expression um 18%, während die TLR-4 Expression um 10% anstieg (Isotyp-Kontrolle weiß dargestellt,  $n = 7$ ).

Bei den kultivierten Zellen ohne EcN-CM Zusatz zeigte sich eine Expression des TLR-2 von  $61,7 \pm 2,3\%$ , während nach Zugabe von 40 vol% EcN-CM eine signifikante Erhöhung auf  $79,7 \pm 2,1\%$  nachweisbar war.

Die Expression des TLR-4 zeigte nach Zugabe des konditionierten Mediums von EcN ebenfalls eine Steigerung, jedoch in geringerem Maße als bei den durchgeführten Versuchen der TLR-2 Expression. Hier entsprach die Expression des TLR-4 nach Zugabe von 40 vol% EcN-CM  $60,1 \pm 1,8\%$ , sowie  $50,1 \pm 3,2\%$  ohne Zugabe des bakteriellen Überstandes.

### 3.3. Transfektion

Aufbauend auf diese Ergebnisse und zur weiteren Identifizierung der Signalwege von EcN wurden HEK293 Zellen mit TLR-2 und TLR-4 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit und ohne EcN-Überstand kultiviert, um die NF $\kappa$ B Aktivität im Luminometer zu bestimmen. Als Kontrollen wurden Lipoprotein (LP3) und LPS als PAMPs von TLR-2 und TLR-4 mitgeführt.



**Abb. 3.3.1. Signifikante Erhöhung der NF- $\kappa$ B Intensität von TLR-2/TLR-4 transfizierten HEK293 Zellen.**

Freigesetzte Lichtsignale wurden im Luminometer detektiert und über einen Zeitraum von 1000 ms gemessen. Es sind relative Lichtsignale vergleichend nach Zugabe von EcN (Konzentration in  $\mu$ l/ml) und LPS oder LP3 (Konzentration ng/ml) gemessen und graphisch dargestellt (n=3). LP3 wurde nach Zugabe von 20 ng/ml gemessen.

Wie in Abbildung 3.3.1. dargestellt, lässt sich eine signifikante konzentrationsabhängige Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität sowohl bei TLR-2 als auch bei TLR-4 transfizierten HEK293 Zellen zeigen. Vergleichend zur Kontrollgruppe (nicht transfizierte Zellen und Zugabe von EcN-CM) wurde die NF- $\kappa$ B Aktivität in TLR-2 transfizierten Zellen und Zugabe des EcN-Überstandes (200  $\mu$ l/ml) 60-fach stimuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der EcN-CM Konzentration von 2  $\mu$ l/ml auf 20  $\mu$ l/ml bei den TLR-2 HEK293 Zellen eine signifikante, sehr deutliche Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität von 630 relativen Lichteinheiten auf 2575 relative Lichteinheiten verursacht.

Eine erneute Konzentrationserhöhung und Zugabe von 200  $\mu$ l/ml EcN-CM führte ebenfalls zu einer signifikanten vergleichend jedoch geringeren Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität.

Vergleichbar ließ sich dies auch bei den TLR-4 transfizierten und mit EcN-CM versetzten Zellen zeigen. Hier ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Zugabe von 2  $\mu$ l/ml EcN-CM ein deutlicher Anstieg der NF- $\kappa$ B Aktivität um den Faktor 450 zeigen.

Konzentrationsabhängig ließ sich identisch zu den TLR-2 transfizierten Zellen auch bei den TLR-4 transfizierten Zellen eine Steigerung der NF- $\kappa$ B Aktivität beobachten. Die Zugabe von 20  $\mu$ l/ml EcN-CM führte zu einer Verdopplung der gemessenen Lichtsignale und somit ebenfalls zu einer Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität.

Die Zugabe von 20 ng/ml LP3 führte bei TLR-2 transfizierten Zellen zu einer vergleichbaren Erhöhung der relativen Lichtstärke auf 3000 relative Lichtstärken (verglichen mit der Erhöhung nach EcN-CM Zugabe). Bei den TLR-4 transfizierten Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität auf das zwanzigfache bei Zugabe von 2 ng/ml LPS verglichen mit der Kontrollgruppe.

### **3.4. Einfluss von Escherichia coli Nissle auf den Zellzyklus von Wildtyp- und Knock-Out Mäusen**

#### **3.4.1. PBT**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EcN die Expression von TLR-2 und TLR-4 auf PBT signifikant steigert und die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowohl bei TLR-2 als auch bei TLR-4 transfizierten HEK293 Zellen konzentrationsabhängig erhöht, wurde der Einfluss von EcN-CM bei Zellen von TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen und Mäusen vom Wildtyp untersucht.

Aus Tabelle 3.4.1. ist ein dosisabhängiger hemmender Effekt von EcN Überständen auf die Zellzyklusprogression von PBT vom Wildtyp zu erkennen. Dieser Effekt entspricht dem Einfluß von EcN-CM auf periphere humane Zellen. Bei den stimulierten murinen peripheren T-Zellen vom Wildtyp ohne Bakterienzusatz waren  $15,8 \pm 1,3\%$  der Zellen in der S/G2/M-Phase. 84,2% der Zellen befinden sich in der Ruhephase des Zellteilungszyklus. Der Anteil ruhender Zellen erhöht sich nach Zugabe von 25 vol % EcN-CM auf 91,8% (zyklischer Anteil  $8,2 \pm 1,0\%$ ), um sich nach Zugabe von 50 vol % verdünntem Bakterienüberstand weiter auf 95,6% (zyklischer Anteil  $4,4 \pm 0,6\%$ ) zu erhöhen.

Die Zahl der aktiven Zellen im Zellteilungszyklus, welche sich in der S/G2/M-Phase befinden, nimmt mit zunehmender EcN-CM Konzentration ab (Tab. 3.4.1.)

Dieser inhibitorische Effekt lässt sich bei isolierten PBT von TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Tiere nicht nachweisen. Bei den peripheren T-Zellen der TLR-4 Knock-Out Mäuse zeigte sich keine signifikante Änderung des Verhältnisses ruhender und aktiver Zellen im Zellzyklus nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Bakterienüberstandes. Es befanden sich  $17,0 \pm 0,9\%$  der Zellen ohne Zugabe von EcN-CM in der aktiven S/G2/M-Phase. Der Anteil änderte sich nach Zugabe von 25 vol% konditioniertem bakteriellem Medium auf  $16,8 \pm 1,6\%$  und  $16,1 \pm 1,7\%$  nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM (Tab. 3.4.1.).

Ein vergleichbarer Effekt ließ sich auch bei den isolierten PBT von TLR-2 Knock-Out Mäusen zeigen. Der Anteil ruhender Zellen von 80,7 % ( $19,3 \pm 1,6\%$  zyklierend) bei 0 vol% EcN-CM stieg nach Zugabe von 25 vol% EcN-CM auf  $81,6\%$  ( $18,4 \pm 1,9\%$  zyklierend) an und sank nach Zugabe von 50 vol % EcN-CM auf  $78,1\%$  ab. Dies entspricht  $21,9 \pm 2,1\%$  aktivierter Zellen (Tab. 3.4.1.).

	<b>0 vol % EcN</b>	<b>25 vol% EcN</b>	<b>50 vol% EcN</b>
<b>Wildtype</b>	$15,8 \pm 1,3\%$	$8,2 \pm 1,0\%$	$4,4 \pm 0,6\%$
<b>TLR-2<sup>-/-</sup></b>	$19,3 \pm 1,6\%$	$18,4 \pm 1,9\%$	$21,9 \pm 2,1\%$
<b>TLR-4<sup>-/-</sup></b>	$17,0 \pm 0,9\%$	$16,8 \pm 1,6\%$	$16,1 \pm 1,7\%$

**Tab. 3.4.1. Konzentrationsabhängige Hemmung des aktivierten zellulären Anteils (S/G2/M-Phase) muriner peripherer T-Zellen von Wildtyp Mäusen durch konditioniertes Medium von Escherichia coli Nissle 1917.**

Vergleichend wurde der konzentrationsabhängige Einfluß von EcN-CM auf periphere T-Zellen von Wildtyp Mäuse, sowie von TLR-2 und TLR-4 Tieren durch Zugabe von 0 vol %, 25 vol % und 50 vol % dargestellt (n=7).

### **3.4.2. Mononukleäre Zellen der Lamina propria von Wildtyp-, TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen**

In Vorversuchen ließ sich der inhibitorische Einfluß von bakteriellen Kulturüberständen auf die Zellzyklusprogression von humanen peripheren T-Zellen an humanen Lamina propria T-Zellen (LPT) nicht nachweisen und somit erscheint eine von PBT distinkte Regulation von Zellzyklus und Apoptose mukosaler T-Zellen durch EcN möglich<sup>166</sup>.

Um diese Effekte weiter zu charakterisieren untersuchten wir murine mononukleäre Zellen der Lamina propria (LPMC) von Wildtyp-, sowie TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Tieren.

Isolierte, mit CD3-Mausantikörpern aktivierte LPMC vom Wildtyp, TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen wurden 3 Tage mit und ohne EcN-CM kultiviert. Anschließend wurde die DNA mit Propidium Jodid gefärbt und die Zellzyklusprogression durchflußzytometrisch gemessen (Tab. 3.4.2.).

	<b>0 vol % EcN</b>	<b>25 vol % EcN</b>	<b>50 vol % EcN</b>
<b>Wildtype</b>	17,1 ± 1,3 %	18,2 ± 0,9 %	17,5 ± 1,4 %
<b>TLR-2<sup>-/-</sup></b>	19,4 ± 1,2 %	20,1 ± 1,9 %	19,9 ± 1,7 %
<b>TLR-4<sup>-/-</sup></b>	16,4 ± 1,2 %	16,0 ± 1,3%	15,9 ± 1,5%

**Tab. 3.4.2. Konzentrationsabhängige Beeinflussung des aktivierten zellulären Anteils (S/G2/M-Phase) muriner mononukleäre Zellen der Lamina propria durch konditioniertes Medium von EcN 1917.**

Darstellung der konzentrationsabhängigen Beeinflussung muriner LPMC von Wildtyp-, TLR-2- und TLR-4 Mäusen nach Zugabe von 0 vol%, 25 vol% und 50 vol% EcN-CM. Es zeigte sich keine signifikante Änderung des Aktivierungszustandes der untersuchten Zellen. Dies entspricht der Wirkung von EcN-CM auf humane LPT (n=3).

Bei den Tieren vom Wildtyp befanden sich 82,9% der mukosalen LPMC in der Ruhephase. Dieser Anteil änderte sich nach Zugabe von EcN-CM auf 81,8% (25 vol%) und 82,5% (50 vol%). Dies entspricht 17,1 ± 1,3% zyklrierender Zellen bei 0 vol% EcN-CM, 18,2 ± 0,9% nach Zugabe von 25 vol% und 17,5 ± 1,4% nach Zugabe von 50 vol% konditioniertem Medium.

Auch bei den isolierten Zellen der Knock-Out Tieren zeigten sich ähnliche Ergebnisse der prozentualen Anteile von ruhenden und zyklrierenden Zellen. Bei den mukosalen Zellen der TLR-2 Mäuse ließen sich 19,4 ± 1,2% bei 0 vol% EcN-CM, 20,1 ± 1,9% bei 25 vol% EcN-CM und 19,9 ± 1,7% aktiver Zellen nach Zugabe von 50 vol% konditioniertem Medium nachweisen (Tab. 3.4.2.).

Ein vergleichbarer Effekt ließ sich auch bei den Zellen der TLR-4 Mäuse zeigen. Der Anteil aktivierter Zellen entsprach ohne Zugabe von EcN-CM 16,4 ± 1,2%, nach Zugabe von 25 vol% EcN-CM 16,0 ± 1,3% und 15,9 ± 1,5% nach Zugabe von 50 vol% konditioniertem Medium (Tab. 3.4.2.). Dies zeigt eine fehlende Inhibition oder Aktivierung der Zellzyklusprogression von

LPT durch EcN. Vorliegende Ergebnisse untermauern die These der unterschiedlichen Wirksamkeit von EcN auf periphere, sowie ortsständige humane und murine T-Zellen.

### **3.5. Beeinflussung der Zell-Zell Wechselwirkung von T-Zellen durch Escherichia coli Nissle**

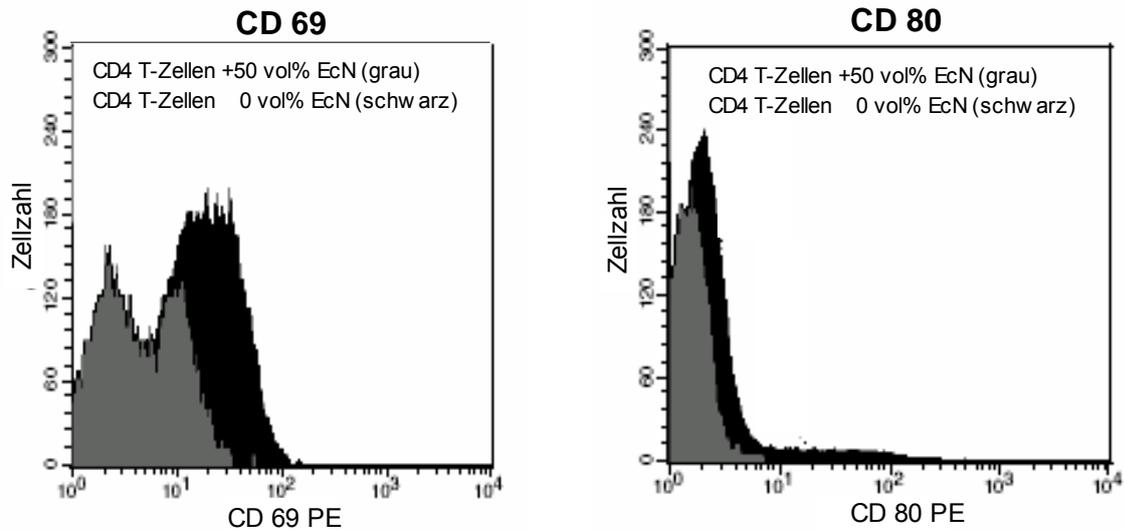
#### **3.5.1. Einfluss von EcN-CM auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und Aktivitätsmarker**

Nachdem in bisherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass EcN über TLR-2 und TLR-4 abhängige Mechanismen signifikant die Zellzyklusprogression und Expansion von PBT beeinflusst, untersuchten wir im 2. Teil der vorliegenden Promotionsarbeit die zugrunde liegenden Signalmechanismen der T-Zellaktivierung. Zur Zellzyklusaktivierung einer T-Zelle ist die Aktivierung der Zelle über ihren T-Zell Rezeptor essentiell. Erfolgt jedoch keine gleichzeitige Aktivierung über kostimulatorische Moleküle kommt es zu einer Anergie der Zelle. Um diesen wichtigen Schritt näher zu charakterisieren, wurde der Einfluß von EcN auf die Expression des Aktivitätsmarkers CD69 und der kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD80, CD86 und CD154 untersucht.

Hierfür wurden anti-CD3 aktivierte PBT mit 0 vol%, 25 vol% und 50 vol% EcN-CM 3 Tage kultiviert. Anschließend wurde durchflußzytometrisch der Anteil exprimierender Zellen quantifiziert.

CD 69 wird von verschiedenen Zellen, z.B. auch T-Zellen aktivierungsabhängig exprimiert und daher als Nachweis einer Zellaktivierung eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass CD69 nach Zugabe von EcN-CM vermindert exprimiert wird (Abb. 3.5.1.). Bei 0 vol% EcN-CM waren  $47 \pm 2,4\%$  der durchflußzytometrisch gemessenen Zellen CD69 positiv. Dieser Anteil sank nach Zugabe von 50 vol% konditionierten bakteriellen Medium auf  $5 \pm 2,1\%$ .



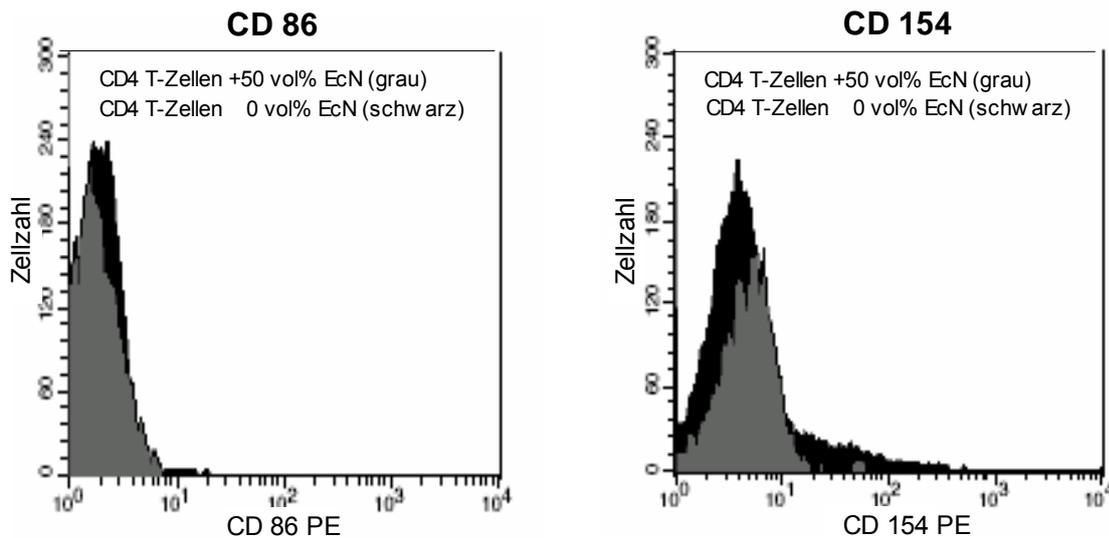
**Abb. 3.5.1. Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von CD69 und CD80 auf peripheren CD4 T-Zellen nach Zugabe von 0 vol% und 50 vol% EcN-CM (n=3).**

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Expression des Aktivierungsmarkers CD 69 nach Zugabe des konditionierten Mediums von EcN. Vergleichend dazu zeigte sich eine geringere Abnahme der Expression von CD 80 nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM.

Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 werden auf T-Zellen exprimiert und dienen über die Bindung an CD28 der Stimulation von T-Zellen.

Die Verringerung der Expression von CD 69 durch EcN-CM ließ sich vergleichbar auch bei der Bestimmung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD 80 nachweisen.

Hier waren 3,4% der Zellen nach Kultivierung ohne bakterielle Zusätze CD80 positiv (Abb. 3.5.2.). Nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM verringerte sich dieser Anteil um 54%.



**Abb. 3.5.2. Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von CD86 und CD154 auf peripheren CD4 T-Zellen nach Zugabe von 0 vol% und 50 vol% EcN-CM (n=3).**

Es zeigte sich keine Änderung der Expression sowohl bei CD 86, als auch bei CD154 nach Zugabe des konditionierten Mediums von EcN.

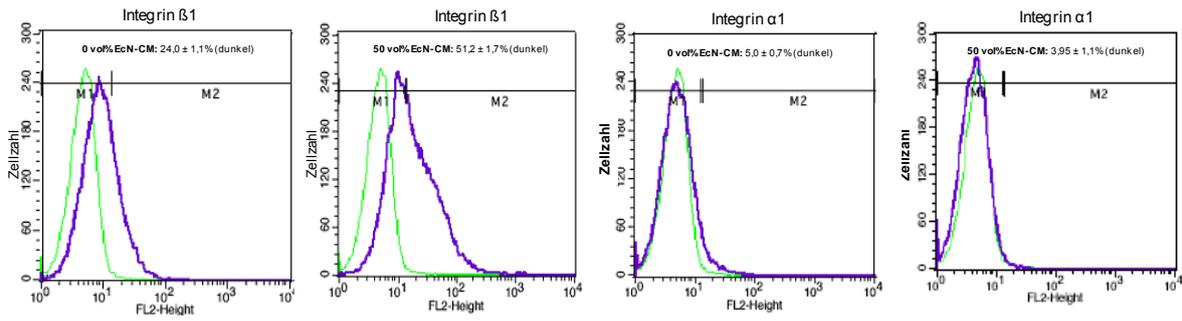
Nach Zugabe von konditioniertem bakteriellem Medium zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression von CD86 und CD154 auf PBT.

Bei der quantitativen Bestimmung der Expression des kostimulatorischen Molekül CD80 läßt sich eine Verringerung der Expression zeigen. Im Gegensatz hierzu kommt es durch EcN-CM nicht zu einer Veränderung der CD154 Expression.

### 3.5.2. Einfluss von EcN-CM auf die Expression der $\beta$ 1 Integrine

LPS, eine der stärksten bioaktiven Substanzen ruft im Organismus schon bei niedrigsten, pikomolaren Konzentrationen Immunreaktionen wie z.B. Zytokinfreisetzung, Aktivierung von Makrophagen oder Adhäsionsmolekülsynthese hervor. Es ist bekannt, dass PBT nach Aktivierung verstärkt  $\beta$ 1 Integrine exprimieren<sup>167</sup>.

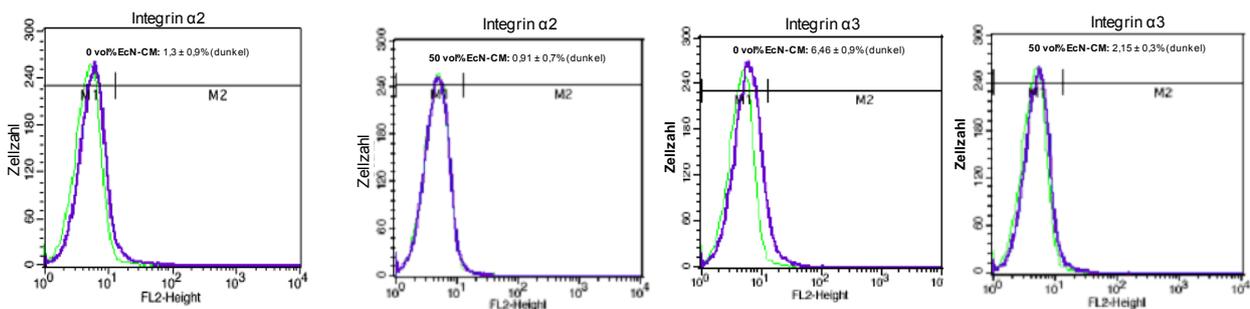
Um der Frage nachzugehen, ob EcN ihre immunmodulatorische Wirkung über die Expression dieser Adhäsionsmoleküle erzielen, wurden isolierte, mit CD3 aktivierte PBT mit 0 vol% und 50 vol% EcN-CM kultiviert und anschließend die Expression der Integrine durchflußzytometrisch bestimmt.



**Abb. 3.5.5. Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression des Integrins  $\beta 1$ , sowie der Expression des Integrins  $\alpha 1$  auf humanen peripheren T-Zellen nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM. Vergleichend dazu wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt (Isotyp hell, n=3).**

Bei dem Integrin  $\beta 1$  läßt sich eine deutliche Erhöhung der Expression nach Zugabe des konditionierten bakteriellen Mediums nachweisen. Vergleichend dazu blieb die Expression des Integrin  $\alpha 1$  konstant.

Für das Integrin  $\beta 1$  läßt sich eine Zunahme der Expression nach Zugabe von 50 vol% konditioniertem bakteriellem Medium von  $24 \pm 1,1\%$  auf  $51,3 \pm 1,7\%$  zeigen. Vergleichend dazu stellt die Abbildung 3.5.5. für das Integrin  $\alpha 1$  eine nahezu unveränderte Expression der positiven Zellen dar. Ohne Zugabe von EcN-CM waren  $5 \pm 0,7\%$  der Zellen positiv und exprimierten das untersuchte Integrin  $\alpha 1$ . Nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM sank der Anteil positiver Zellen auf  $3,9 \pm 1,1\%$ .



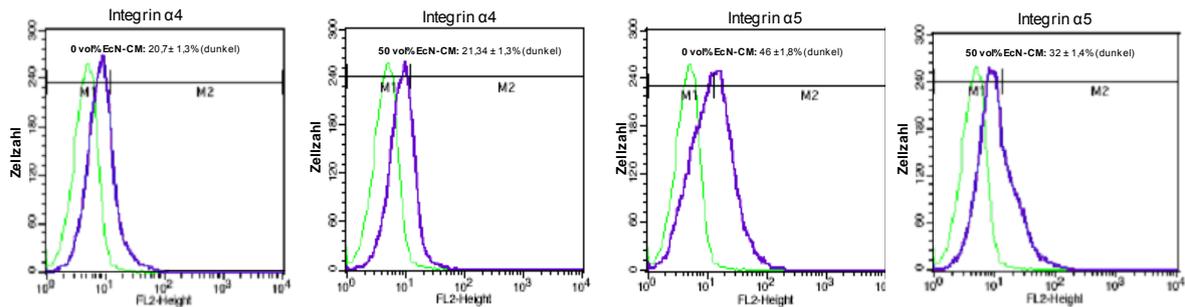
**Abb. 3.5.6. Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression des Integrins  $\alpha 2$ , sowie der Expression des Integrins  $\alpha 3$  auf humanen peripheren T-Zellen nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM. Vergleichend dazu wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt (Isotyp hell, n=3).**

Sowohl bei dem Integrin  $\alpha 2$  als auch bei dem Integrin  $\alpha 3$  läßt sich keine Erhöhung der Expression nach Zugabe des konditionierten bakteriellen Mediums nachweisen.

Es konnte keine gesteigerte Expression des Integrins  $\alpha 2$  im Vergleich zur Isotypkontrolle nachgewiesen werden.

Ohne Zugabe des konditionierten bakteriellen Überstandes waren  $0,9 \pm 0,7\%$  der durchflußzytometrisch gemessenen Zellen positiv.

Dieser Anteil änderte sich durch Zugabe von 50 vol % EcN-CM auf  $1,3 \pm 0,9\%$ . Die Expression des Integrins  $\alpha 3$  ohne Zugabe von EcN-CM betrug  $6,46 \pm 0,9\%$ . Nach Zugabe von 50 vol % EcN-CM verringerte sich dieser Anteil auf  $2,15 \pm 0,3\%$ .



**Abb. 3.5.7. Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression des Integrins  $\alpha 4$ , sowie der Expression des Integrins  $\alpha 5$  auf humanen peripheren T-Zellen nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM. Vergleichend dazu wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt (Isotyp hell, n=3).**

Es zeigt sich eine verringerte Expression des Integrins  $\alpha 5$  und unveränderte Expression des Integrins  $\alpha 4$  auf peripheren T-Zellen nach Zugabe des konditionierten bakteriellen Mediums von EcN.

Für das Integrin  $\alpha 5$  läßt sich eine signifikante Hemmung der Expression auf peripheren T-Zellen nach Zugabe von 50 vol% EcN-CM nachweisen.

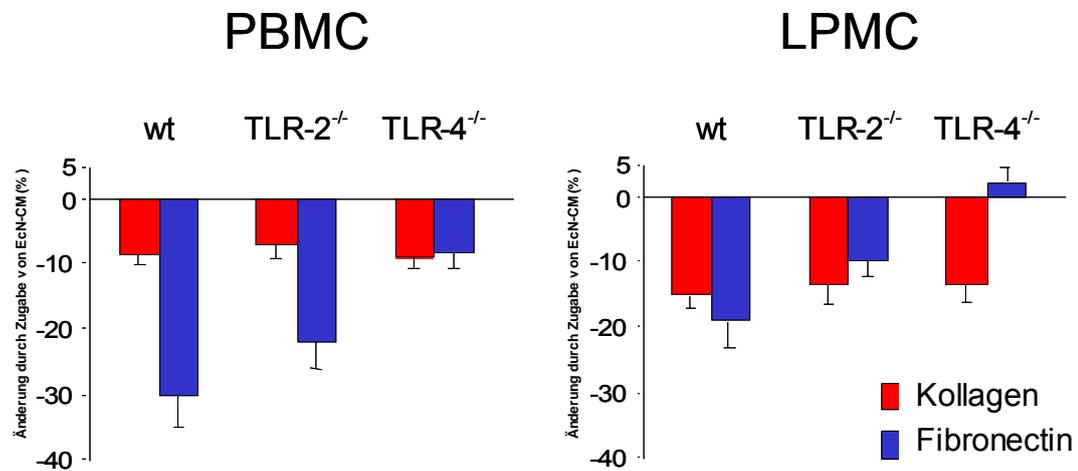
Durchflußzytometrisch wurden  $46 \pm 1,8\%$  positiver Zellen ohne Zugabe von EcN-CM gemessen. Nach Zugabe von 50 vol% konditioniertem bakteriellem Medium sank dieser Anteil auf  $32 \pm 1,4\%$ .

Vergleichend dazu wurde für das Integrin  $\alpha 4$  eine geringe Änderung der Expression nach Zugabe des probiotischen Bakteriums *Escherichia coli* Nissle von  $20,7 \pm 1,3\%$  auf  $21,34 \pm 1,5\%$  gemessen.

### 3.5.3. Adhäsion der murinen peripheren- und T-Zellen der Lamina Propria von Knock-Out- und Wildtyp-Mäusen

Nachdem wir zeigen konnten, dass EcN die Expression der Integrine  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  signifikant beeinflusst und sowohl das Integrin  $\alpha 3$ , als auch das Integrin  $\alpha 5$  an Fibronectin binden, stellte sich die Frage, ob EcN auch die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix beeinflusst. Es wurde daher die Änderung der Adhäsion von peripheren und ortsständigen murinen T-Zellen an

Kollagen und Fibronectin durch Zugabe von konditioniertem EcN-CM bestimmt. Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine Beeinflussung der Adhäsion muriner T-Zellen durch das probiotische Bakterium EcN.



**Abb. 3.5.3. Änderung der Adhäsion muriner peripherer und ortsständiger T-Zellen von TLR-2/TLR-4 Knock-Out und Wildtyp Mäusen an Kollagen und Fibronectin durch die Zugabe von EcN-CM.**

Zugabe von EcN-CM hemmt nahezu identisch die Adhäsion an Kollagen bei PBMC und LPMC sowohl bei TLR-2 und TLR-4 Knock-Out, als auch bei Wildtyp Mäusen (n=5).

Die Adhäsion an Fibronectin wird bei den murinen PBMC durch Zugabe von EcN-CM am intensivsten bei den Mäusen vom Wildtyp gehemmt. Diese Hemmung entspricht einer Verringerung der Adhäsion um 30 Prozent. Vergleichend dazu verringert sich die Adhäsion bei den PBMC der TLR-2 Knock-Out Mäuse durch Zugabe von EcN-CM um 22,3 Prozent, während sich bei den Zellen der TLR-4 Mäuse die geringste Verringerung der Adhäsion um 9,8 Prozent zeigen ließ.

Bei den murinen LPMC ließ sich durch Zusatz von EcN-CM ebenfalls bei den Zellen von Wildtyp-Mäusen die stärkste Hemmung und Änderung der Adhäsion an Fibronectin zeigen. Hier ließ sich eine Verringerung der adhärenen Zellen um 19,8 Prozent nachweisen. Bei den Knock-Out Tieren ließ sich eine geringere Hemmung oder sogar eine erhöhte Adhäsion und somit ein stimulierender Aspekt der Zugabe von EcN-CM zeigen. Bei den Zellen der TLR-2 Knock-Out Mäuse zeigte sich eine Verringerung der Adhärenz von 10,1 Prozent. Vergleichend dazu erhöhte sich die Adhäsion an Fibronectin bei den murinen LPMC von TLR-4 Mäusen um 2,5 Prozent.

Im Falle der Adhäsion an Kollagen, einem Liganden von  $\alpha 3$ , sind vergleichbar weniger Effekte zu beobachten. Bei den peripheren murinen T-Zellen zeigte sich sowohl bei den Zellen der TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäuse, als auch bei den Zellen vom Wildtyp eine nahezu identische Hemmung der Adhäsion um 10 Prozent durch Zugabe von EcN-CM. Vergleichend dazu ließ sich der hemmende Effekt bei den murinen LPMC noch weiter intensivieren. Hier wurde die Adhäsion nach bakteriellem Zusatz bei allen murinen ortsständigen Zellen um 12,5 Prozent gehemmt.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte erstmals eine signifikante Hemmung der Adhäsion von murinen PBMC und LPMC bei Tieren vom Wildtyp und TLR-2 Knock-Out Mäusen an Kollagen und Fibronectin durch konditioniertes Medium des Probiotikum EcN gezeigt werden. Im Gegensatz dazu ist die Adhäsion an murinen T-Zellen der Lamina propria von TLR-4 Tieren an Fibronectin erhöht.

## 4. Diskussion

Der Darm und seine Funktion als intestinales Immunsystem rücken immer mehr in den Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Die Inzidenz verschiedener Darmerkrankungen wie z.B. CED und Nahrungsmittelallergien ist in den vergangenen Jahren stetig angestiegen. Ihre Pathogenese wird in hohem Maße von Darmbakterien beeinflusst, wobei der Interaktion der Bakterien mit dem intestinalen Immunsystem eine wichtige Rolle zukommt<sup>168</sup>. Das intestinale Immunsystem stellt das größte immunologische Organ des humanen Organismus dar. Dies erklärt die Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse für das Verständnis immunologischer Vorgänge an mukosalen Oberflächen. Darmmikroorganismen beeinflussen die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Darmimmunsystems vielfältig, woraus die zahlreichen Einsatzmöglichkeiten von Probiotika resultieren<sup>169</sup>.

Obwohl die klinische Wirksamkeit des Probiotikums EcN nachgewiesen werden konnte<sup>170</sup>, ist der genaue Wirkmechanismus bisher noch weitgehend unklar. Erweiterte Kenntnisse darüber würden jedoch den Vorstellungen der gezielten Modulation der angeborenen Immunität durch Entwicklung und Anwendung von Prä- und Probiotika sehr viel näher kommen. Dies würde durch eine Veränderung der Darmflora auch ohne Antibiotika eine therapeutische Beeinflussung der CED ermöglichen. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente soll durch die Identifizierung von zellulären und molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen EcN und dem intestinalen Immunsystem dazu beitragen werden, selektive anti-entzündliche Substanzen zu entwickeln, welche ein gezieltes Eingreifen in mukosale Entzündungsvorgänge ermöglichen könnten. Es wurde erstmalig die Beeinflussung von TLR-2 und TLR-4 durch EcN-CM sowohl bei humanen als auch bei murinen peripheren und ortsständigen T-Zellen untersucht.

Weiterhin sollte die Arbeitshypothese geklärt werden, ob das alleinige Vorliegen eines TLR, das gemeinsame Vorhandensein der TLR-2 und TLR-4, sowie die Notwendigkeit von weiteren Rezeptoren wie zum Beispiel kostimulatorischer Moleküle eine Voraussetzung zur Wirksamkeit von EcN ist.

#### **4.1. TLR und ihre Bedeutung in der Pathogenese von Infektionskrankheiten**

TLR sind die wichtigsten bisher bekannten Rezeptoren für die Erkennung von Pathogenen und werden deshalb vielfältig untersucht. Sie werden auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert und mit der Entstehung zahlreicher Autoimmun-, chronischer- und entzündlicher Erkrankungen in Verbindung gebracht. In klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TLR-4 Gen und verschiedenen Infektionskrankheiten wie zum Beispiel Meningokokkeninfektionen<sup>171</sup>, gram-negativen Infektionen<sup>172</sup>, akutem Myokardinfarkt<sup>173</sup> und entzündlichen Darmerkrankungen<sup>174</sup> hergestellt werden. Alle TLR-assoziierten Erkrankungen resultieren aus einer Dysregulation der TLR oder endogenen negativen Regulatormodelle. Demnach ist eine Kontrolle der Signaltransduktion über TLR notwendig, um die Immunhomöostase zu bewahren.

Die Beteiligung von TLR an CED konnte ebenso wie die Wirksamkeit von EcN bei CED, vor allem CU nachgewiesen werden<sup>175</sup>. Es stellte sich nun die Frage der möglichen Signalwege und Formen der Signaltransduktion von EcN via TLR, um bei positiven Erkenntnissen mögliche Rückschlüsse auf Anwendung und Therapieoptionen ziehen zu können.

##### **4.1.1. Die Bedeutung von PAMPS für die TLR vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Beeinflussung der Zellzyklusprogression peripherer T-Zellen durch PAMPs untersucht. Hierfür wurden BLP und LPS ausgewählt, da diese von den Rezeptoren der Toll-like Familie erkannt werden. Vergleichend dazu war es nötig, kontrollierend die Wirkung von EcN-CM auf periphere T-Zellen zu dokumentieren. Hierbei zeigte sich, dass BLP, ein Ligand des TLR-2, einen ähnlichen Effekt wie EcN erzielt. Vergleichend hierzu ließ sich bei LPS kein vergleichbarer Effekt erkennen. Bisherige Forschungen zeigten lediglich eine zellvermittelte Stimulation des Immunsystems durch BLP<sup>176</sup>.

Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass T-Zellen die TLR -2, -3, -4, -5, -7 und -8 exprimieren<sup>177</sup> und durch Stimulation mit LPS deren Expression gesteigert werden kann. Diese Effekte legen die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der T-Zellfunktion ohne die Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle oder antigen-präsentierender Zellen nahe. Unklar ist jedoch, ob für diesen Effekt LPS exklusiv verantwortlich gemacht werden kann.

Wie oben dargelegt, ließ sich als Ergebnis der durchgeführten Versuche keine Beeinflussung der Zellzyklusaktivierung von PBT durch LPS zeigen.

Um die gewonnenen Ergebnisse noch weiter zu differenzieren, wurden daher periphere T-Zellen nach Zugabe von EcN-CM auf die Expression von TLR-2 und TLR-4 untersucht. Sowohl bei TLR-2 als auch bei TLR-4 ist eine deutliche Erhöhung der Expression durch EcN nachweisbar. Diese Effekte verstärken die oben diskutierten Erkenntnisse einer direkten Beeinflussung der T-Zellfunktion ohne die Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle oder antigen-präsentierender Zellen.

### **4.1.2. TLR-2 und TLR-4 Expression in transfizierten HEK293 Zellen**

Aufbauend auf die gewonnenen Ergebnisse wurden HEK293 Zellen hinsichtlich ihrer TLR-Aktivität untersucht. Es zeigte sich bei den TLR-negativen HEK293 Zellen keine Erhöhung von NF- $\kappa$ B durch EcN. Dieser Transkriptionsfaktor, dessen Vorkommen in Kolonepithelzellen bei CED<sup>178,179</sup> mehrfach nachgewiesen wurde, dient als Parameter der TLR-Aktivität. Sowohl bei TLR-2, als auch bei TLR-4 transfizierten Zellen ist nach Inkubation mit EcN eine deutliche konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktivität zu erkennen. Dies verstärkte die Vermutung, dass EcN seine Wirkung über den Signalweg der TLR vermittelt.

## **4.2. Gemeinsamkeiten und Unterschiede von PBT und LPT**

### **4.2.1. Humane T-Zellen**

Bisherige Untersuchungen wurden an peripheren T-Zellen durchgeführt, die Hauptsymptome bei CED manifestieren sich jedoch intestinal. Nachfolgend sollen daher die Unterschiede und Gemeinsamkeiten von humanen PBT und LPT näher betrachtet werden. Humane LPT tragen mit ihrer fein regulierten Balance von Expansion und Apoptose entscheidend zur Homöostase des intestinalen Immunsystems bei. Hierbei handelt es sich um eine Population von gereiften, immunkompetenten T- und B-Zellen, welche nach ihrer Aktivierung in den Peyer'schen Plaques in die Mukosa auswandern<sup>257</sup>. Ihre Besonderheit liegt in der Wahrung der Toleranz gegenüber der physiologischen Darmflora. Fehlregulation der Immunantwort dieser Zellen gilt als ursächlich für die Initiierung und Fortführung der chronischen Entzündung bei CED<sup>36</sup>. Zahlreiche Forschungen zeigten die distinkten Eigenschaften dieser Zellen. Diese zumeist als Gedächtnis T-Zellen vorliegende Zellpopulation hatte bereits in den Peyerschen Plaques Antigenkontakt und wandert anschließend über die systemische Zirkulation in die Mukosa<sup>180</sup>.

Vergleichend zu PBT unterscheiden sich LPT in der Expression von Oberflächenantigenen und scheinen verstärkt regulatorische Funktionen zu besitzen<sup>196</sup>.

Weiterhin konnte sich eine Expression des Fas-Liganden sowie eine erhöhte Bereitschaft zur Apoptose nachweisen lassen. Verglichen mit humanen PBT gelten humane LPT nach Stimulation ihres TCR/CD3 Komplexes als „hypo-“, nach Triggerung über den CD2 Signalweg jedoch als „hyperproliferativ“<sup>173,180</sup>.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe<sup>166</sup> konnte eine signifikante Erhöhung der Dauer der individuellen Zellzyklusphasen bei LPT im Gegensatz zu PBT gezeigt werden. Ursächlich hierfür scheint eine signifikant vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p53 in LPT zu sein.

Die p53 Expression ist jedoch in LPT von Patienten mit Morbus Crohn (MC) vermindert, welches in einem schnelleren Zellzyklus resultiert. Weiterhin haben Patienten mit MC eine geringere Caspasenaktivität und Apoptoserate, wodurch es zu einer vermehrten Akkumulation von T-Zellen in der Lamina propria kommt und in einer Schädigung der intestinalen Mukosa durch eine unkontrollierte Entzündung resultiert<sup>166</sup>. Dieses führt, verglichen mit LPT von Kontrollpatienten und Patienten mit Colitis ulcerosa, zu einer höheren Teilungsrate pro Zeiteinheit und Expansion von LPT bei Morbus Crohn. Im Gegensatz hierzu brauchen LPT von Patienten mit Colitis ulcerosa für ihren Zellzyklus länger, haben eine höhere Caspasenaktivität und nur eine begrenzte Fähigkeit zur Zellteilung<sup>181</sup>. Somit wird gezeigt, dass die zur Bewahrung der intestinalen Immunhomöostase benötigte balancierte Regulation von Zellzyklus und Apoptose bei CED unterschiedlich gestört ist. Während bei PBT durch EcN-CM-Zugabe die Zellzyklusprogression und Expansion inhibiert wurden, ließ sich ein vergleichbarer Effekt bei LPT nicht feststellen<sup>166</sup>. Es zeigte sich, dass EcN-CM Gedächtnis T-Zellen und naive peripherer T-Zellen nahezu gleich inhibiert. Dies widerlegte die These, der fehlende Effekt bei LPT beruhe auf dem Status der Gedächtniszelle. Eine genaue Erklärung liegt derzeit noch nicht vor, bietet jedoch Ansätze für weitere Forschungen.

### **4.2.2. Murine T-Zellen**

Nachdem wir die These der Signaltransduktion via TLR als möglichen Weg der Wirkungsentfaltung von EcN bei humanen PBT weiter erhärten und grundlegende Unterschiede zwischen PBT und LPT darstellen konnten, wurden murine PBT von Wildtyp-, TLR-2 und TLR-4 Tieren untersucht.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Zychlinsky am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Abteilung Zelluläre Mikrobiologie in Berlin, wurden bei Wildtyp-Tieren und TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen PBT isoliert und parallel den obigen Versuchprotokollen mit E.coli-Überständen behandelt, um die Signaltransduktion via TLR-2 und TLR-4 genauer zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass EcN-Überstände die Zellzyklusprogression von PBT der Wildtyp Tiere hemmen. Dies wurde in einer Verringerung der aktiven Zellen, welche sich in der S/G2/M-Phase befinden, deutlich. Im Gegensatz hierzu ließ sich jedoch bei den TLR-2 und TLR-4 defizienten Tieren diese Beeinflussung des Aktivierungszustandes durch EcN-CM nicht erkennen.

Diese Ergebnisse lassen einerseits vermuten, dass EcN seine therapeutisch nachweisbaren Effekte sowohl über den Signalweg des TLR-2 als auch den des TLR-4 erzielt. Jedoch scheint die Kompensation des einzelnen Rezeptorverlustes durch das alleinige Vorhandensein des anderen nicht möglich. Daraufhin stellt sich die Frage, wie Zellen von Doppel Knock-Out-Mäusen, das heißt von Tieren denen sowohl der TLR-2, als auch der TLR-4 fehlt, auf die Zugabe von EcN-CM reagieren. Leider war die Beantwortung dieser interessanten Überlegung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da entsprechende Doppel Knock-Out-Tiere nicht zur Verfügung standen.

Vorliegende Ergebnisse verdeutlichen die Wirksamkeit von EcN an Mäusen. Daher erscheint die Humanspezifität basierend auf den gewonnen Ergebnissen und Überlegungen eher unwahrscheinlich. Im humanen Darm scheint eine von PBT distinkte Regelung von Zellzyklus und Apoptose mukosaler T-Zellen möglich<sup>166</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung von Zellzyklusprogression durch EcN bei PBT, nicht jedoch bei LPT möglich ist. Aufbauend auf die gewonnenen Erkenntnisse wurden die oben beschriebenen Experimente mit murinen LPT, ebenfalls von Wildtyp- sowie TLR-2 und TLR-4 Knock-Out Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich, identisch zu humanen Zellen, keine Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch EcN.

Schlussfolgernd lässt sich vermuten, dass auch im murinen Modell erhebliche Unterschiede zwischen peripheren und intestinalen T-Zellen bestehen. Vorarbeiten zu diesem Thema liegen nicht vor und eröffnen die Möglichkeit für weitere experimentelle Untersuchungen.

### **4.3. Modulation der Signaltransduktion durch Oberflächenmoleküle**

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit und zur Identifizierung möglicher Mechanismen, über die EcN seine therapeutischen Wirkungen entfaltet, wurden auch die Auswirkungen der Stimulation mit EcN auf verschiedene Oberflächenproteine untersucht.

#### **4.3.1. EcN-CM beeinflusst den Aktivierungsmarker CD 69 und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86**

##### CD80 und CD86

CD28 wird konstitutiv auf naiven und differenzierten T-Zellen exprimiert. Es ist sowohl als kostimulatorisches Molekül als auch als Adhäsionsrezeptor wesentlich an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. In Kombination mit Signalen des T-Zell-Rezeptors führt die Bindung von CD28 an seine Liganden, CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2), zu einer optimalen T-Zell-Aktivierung.

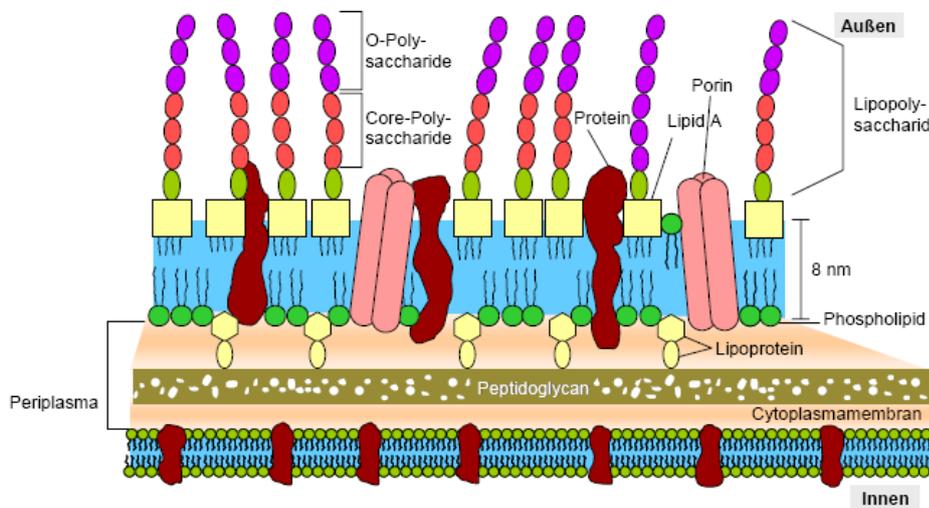
Eine Fehlregulation der T-Zell-Aktivierung kann mitverantwortlich für das Auftreten von CED sein. Ursächlich hierfür können Störungen im Zusammenspiel von T-Zell-Proliferation, Zytokinsekretion, Apoptose und Adhäsion sein<sup>182</sup>.

Sowohl CD80 als auch CD86 werden über TLR-4 reguliert<sup>183,184</sup>, wobei noch weitere Rezeptoren auf diese beiden kostimulatorischen Moleküle Einfluss zu haben scheinen<sup>184</sup>.

Massari et al 2002. zeigten, dass die Porine von gramnegativen Bakterien der Gattung Neisseria TLR-2-abhängig zur verstärkten Expression von CD86 auf murinen B-Zellen führten<sup>185</sup>. Es wurde auch nachgewiesen, dass das Porin von Shigella dysenteriae eine gesteigerte Expression von CD80 und CD86 auf murinen B-Zellen bewirkte. Diese Regulation war abhängig von TLR-2 und TLR-6<sup>186</sup>. Da EcN ebenfalls gramnegativ ist, könnte die Regulation von CD80 und CD86 auch über TLR-2 und/oder TLR-6 erfolgen.

Wie durch die vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden konnte, hemmt EcN-CM intensiv die Expression von CD80. Diese Beeinflussung liess sich auch für das kostimulatorische Molekül CD86 beweisen.

## Aufbau der Zellwand gram-negativer Bakterien



**Abb. 4.3.1.: Schematischer Aufbau der Zellwand gramnegativer Bakterien (Thomas D. Brock: Biology of Microorganisms; 7. Edition)**

Die Moleküle CD80 und CD86 dienen der Stimulation von T-Zellen durch Antigen präsentierende Zellen (APCs). Eine Steigerung der Expression dieser kostimulatorischen Moleküle führt somit zur Verbesserung der Interaktion zwischen T-Zell aktivierenden Zellen und T-Zellen. Die verringerte Expression von CD80 und CD86 reduziert hingegen die Induktion der T-Zellantwort und demzufolge die Fähigkeit des Immunsystems angemessen auf eine Infektion zu reagieren. Dies entspricht jedoch im Falle der CED einem positiven Effekt, da nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung bei CED eine pathologisch gesteigerte Immunreaktion gegen Bakterien der physiologischen Darmflora bei einem genetisch prädisponierten Wirt zu Grunde liegt. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass EcN durch die differenzielle Beeinflussung des Immunsystems im Besonderen der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 die Aktivierung peripherer T-Zellen inhibiert. Es scheint daher möglich, dass *E. coli* Nissle 1917 durch diese Mechanismen dazu beiträgt, die mukosale Entzündungsreaktion zu limitieren.

### CD69

CD69 wird von T-, B-, NK-Zellen, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten aktivierungsabhängig exprimiert und daher vielfach als Aktivierungsmarker verwendet. Über seine Funktion ist aber bisher wenig bekannt. Versuche mit CD69-defizienten Mäusen zeigten

keinen ausgeprägten Phänotyp, sowie keine wesentliche Veränderungen in der T-Zellenwicklung. Die Proliferation stimulierter T-Zellen aus CD69 defizienten Mäusen *in vitro* zeigte keine Auffälligkeiten<sup>187</sup>. CD69 defiziente Mäuse entwickeln normale Antikörpertiter nach Immunisierung und unterscheiden sich geringfügig in der B-Zellentwicklung verglichen mit Mäusen vom Wildtyp. In zwei vorhandenen Arbeiten wurde in CD69 defizienten Mäusen nach Induktion einer Immunreaktion ein Phänotyp gefunden<sup>188,189</sup>.

Murata et al. konnten zeigen, dass CD69 defiziente Mäuse vor einer Antikörper induzierten Arthritis geschützt sind. Dieser Schutz ging mit der Abwesenheit von Neutrophilen im Gelenk einher, während ein verändertes Verhalten der T-Zellen aber nicht gezeigt werden konnte. Esplugues et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen CD69 und der T-Zellverteilung, indem sie eine Anreicherung von NK- und T-Zellen am Ort der Tumorinokulation und in der Milz von CD69 Mäusen nachweisen konnten. Diese Anreicherung machten sie für die ebenfalls in den CD69 Mäusen beobachtete gesteigerte Tumorregression verantwortlich. Als Ursache für diese Anreicherung sahen sie jedoch nicht ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen, sondern eine verringerte Apoptoserate und eine durch fehlendes CD69 Signaling reduzierte TGF  $\beta$  Produktion<sup>188</sup>.

Weiterhin konnte die konstitutive Expression von CD69 in Thymozyten und reifen T-Zellen, sowie die zentrale Rolle des Oberflächenmarkers bei der Emigration von reifen Thymozyten aus dem Thymus gezeigt werden. CD69 scheint an der Emigration aus dem Lymphknoten direkt beteiligt zu sein, indem es aktivierte Th-Zellen in lymphoiden Organen zurückhält. Die vollständige Differenzierung der Th-Zellen könnte durch diese Funktion sichergestellt werden<sup>190</sup>. Mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass EcN die Aktivierung von anti-CD-3 aktivierten PBT inhibiert, was sich durch eine geringere Expression des Oberflächenmarkers CD69 zeigt. Eine Hemmung der Expression dieses frühen Aktivierungsmarkers entspricht somit der erschwerten Differenzierung von T-Zellen und verlängerten Immunantwort, was wiederum einem positiven Effekt und einem möglichen Therapieansatzpunkt bei CED entspricht. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, diese Hypothesen zu validieren.

### CD154

Das Molekül CD40 dient über seinen Liganden CD40L (CD154) zur Interaktion mit T-Zellen<sup>191,192</sup>. CD 154 wird auf einer Vielzahl von Zellen, wie z.B. Thrombozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, glatten Muskelzellen und anderen exprimiert. Es konnte gezeigt

werden, dass sich 95 Prozent der im Blut zirkulierenden CD40-Liganden auf Thrombozyten befinden<sup>193,194</sup>. Die Expression von CD154 (CD40L) auf aktivierten CD4 T-Zellen ist transient und eng reguliert<sup>195</sup>. Die CD4 T-Zellen inaktivieren oberflächlich gebundenen CD154 nach Ligation der B-Zelle entweder durch Internalisierung und lysosomalen Abbau oder durch Abspaltung einer inaktiven löslichen Form, welche als löslicher CD40L (sCD40L) bezeichnet wird<sup>196</sup>.

Es konnte die Bedeutung des CD40-40L-Systems als Modulator verschiedener Entzündungsreaktionen wie zum Beispiel durch Induktion von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) oder von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6) gezeigt werden. Eine wichtige pathophysiologische Rolle kommt diesem System als Mediator bei einer Reihe chronisch-entzündlicher Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen zu<sup>197</sup>. Hierzu gehören neben MC als einen der bedeutendsten Vertreter der CED auch Atherosklerose, insulinabhängiger Diabetes, Multiple Sklerose und systemischer Lupus erythematoses<sup>198</sup>. Als Gemeinsamkeit dieser Krankheiten liegt die gestörte Autoregulation des CD40-CD40L-Systems zugrunde. Die CD40L-Signalübertragung ist durch Infiltration von T-Zellen und Monozyten verstärkt und/oder es fehlt die Deaktivierung von CD40L<sup>198</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte keine Änderung des Expressionsverhaltens von CD 154 durch Zugabe von EcN-CM gezeigt werden. Eine Signalweiterleitung oder Signalmodulation sowie allgemein eine Beteiligung zum Erreichen der Wirksamkeit von EcN erscheint vorerst unwahrscheinlich.

### **4.3.2. EcN beeinflusst die Integrine $\alpha 3$ und $\alpha 5$**

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, welche auf Leukozyten und vielen anderen Zellarten exprimiert werden. Sie bestehen aus Dimeren, die eine  $\alpha$ -(CD11)- und eine  $\beta$ -(CD18)-Untereinheit enthalten. Nach Stimulation wechseln die Integrine schnell von einem niedrig affinen zu einem hoch affinen Status mit anschließender Ligandenbindung und Zellaktivierung<sup>199</sup>. Sie vermitteln die Adhäsion von Zellen an Matrixproteinen, an zellulären Zielrezeptoren sowie an vielen anderen Substraten und dienen somit zur Verstärkung der Zell-Zell-Interaktion<sup>200</sup>. Es konnte speziell für das Integrin  $\alpha 5$  eine maßgebliche Beeinflussung bei der Metastasenentwicklung von Nieren und Ovarientumoren gezeigt werden<sup>201</sup>. Weiterhin scheint es an der Entstehung von diversen pathologischen Entzündungsprozessen beteiligt zu sein.

Vorangegangene Forschungen zeigen, dass  $\beta 1$  Integrine den T-Zellzyklus regulieren und somit entscheidenden Einfluß auf die Modulation der Zellzyklusprogression bei PBT haben und dass

die  $\beta 1$  Integrine die interstitielle Zell-EZM Bindung regulieren<sup>180</sup>. Deshalb untersuchten wir den Effekt von EcN auf die Adhäsion der Zellen an Kollagen und Fibronectin.

Für das untersuchte Integrin  $\beta 1$  ließ sich eine deutliche konzentrationsabhängige Beeinflussung der Expression durch Zugabe des konditionierten Mediums von EcN zeigen.

Im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse konnte erstmals gezeigt werden, dass EcN die Expression von  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  deutlich inhibiert. Sowohl  $\alpha 3$  als auch  $\alpha 5$  binden an Fibronectin. Kollagen bildet für  $\alpha 3$  einen zusätzlichen Liganden.

Hintergrund der durchgeführten Adhäsionsversuche war die Frage, ob EcN diesen Weg der möglichen Signaltransduktion nutzt. Es zeigte sich, dass EcN die Adhäsion an Fibronectin sowohl bei murinen PBMC, als auch bei murinen LPT bei den Tieren vom Widtyp am ausgeprägtesten hemmt. Die Hemmung an Kollagen durch EcN ist ebenfalls nachweisbar, jedoch geringer als bei Fibronectin. Fibronectin ist neben den Hitzeschockproteine - Hsp60 und Hsp70 als endogener Ligand von TLR-4 bekannt.

Eine Hemmung der Adhäsion von T-Zellen entspricht einer Hemmung der immunologischen Antwort und somit einer Hemmung der bei CED vorliegenden überschießenden Immunantwort. Bei Zellen, denen der TLR-2 beziehungsweise der TLR-4 fehlt, ist die Hemmung der Adhäsion deutlich geringer.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl das Probiotikum EcN klinische Anwendung findet sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen bislang noch unzureichend geklärt. Detailliertere Erkenntnisse über zugrunde liegende Signalwege und Möglichkeiten der Signalverarbeitung waren daher das Ziel der hier vorliegenden Promotionsarbeit. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass das Probiotikum EcN über TLR-2 und TLR-4 abhängige Signalwege den Zellzyklus von T-Zellen inhibiert. Es scheint das gemeinsame Vorhandensein der Rezeptoren nötig, da gezeigt werden konnte dass EcN die Zellzyklusprogression von peripheren T-Zellen bei Mäusen vom Wildtyp, nicht jedoch bei TLR-2 und TLR-4 defizienten Tieren hemmt.

Als weitere Möglichkeit der Signaltransduktion und Wirksamkeit von EcN konnte erstmals die Beeinflussung der Expression des Aktivitätsmarkers CD69, sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf humanen peripheren T-Zellen nachgewiesen werden. Sowohl CD80, als auch CD86 werden über TLR-4 und eventuell über TLR-2 reguliert. Die beobachtete Verringerung der Expression reduziert die Induktion der T-Zellantwort und führt im Falle der CED zur Limitierung der mukosalen Entzündungsreaktion. Weiterhin konnte die Hemmung der Expression der Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  durch EcN gezeigt werden. Diese beiden Integrine binden an Fibronectin, einem Liganden von TLR-4. In den durchgeführten Adhäsionsversuchen konnte die stärkste Hemmung bei Fibronectin sowohl an murinen PBT, als auch an murinen LPT beobachtet werden.

Während in mehreren randomisierten doppel-blinden Studien der therapeutische Nutzen von EcN in der Behandlung gezeigt werden konnte, tragen die hier durchgeführten Untersuchungen dazu bei, die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu charakterisieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Promotion liefern weitere Hinweise dafür, dass das Probiotikum E.coli Nissle 1917 einen breiten Einfluss auf das humane Immunsystem hat und decken Mechanismen seiner Wirkung auf.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Podolsky,D.K. The future of IBD treatment. *J. Gastroenterol.* 38 Suppl 15, 63-66 (2003).
2. Timmer,A. & Goebell,H. Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z. Gastroenterol.* 37, 1079-1084 (1999).
3. Timmer,A. & Goebell,H. Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestations. Lessons from epidemiology. *Dig. Dis.* 21, 91-104 (2003).
4. Griffiths,A.M. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 509-523 (2004).
5. Calkins,B.M. & Mendeloff,A.I. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Epidemiol. Rev.* 8, 60-91 (1986).
6. Duerr,R.H. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 63-76 (2002).
7. Karlinger,K., Gyorke,T., Mako,E., Mester,A. & Tarjan,Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Radiol.* 35, 154-167 (2000).
8. Fiocchi,C. Inflammatory bowel disease: dogmas and heresies. *Dig. Liver Dis.* 34, 306-311 (2002).
9. Chiodini,R.J., Van Kruiningen,H.J., Thayer,W.R. & Coutu,J.A. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 24, 357-363 (1986).
10. Shanahan,F. Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288, G417-G421 (2005).
11. Targan,S.R., Landers,C.J., Cobb,L., MacDermott,R.P. & Vidrich,A. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients. *J. Immunol.* 155, 3262-3267 (1995).
12. Seibold,F. [Laboratory diagnosis in inflammatory bowel disease]. *Ther. Umsch.* 60, 133-136 (2003).
13. Loftus,E.V., Jr. & Sandborn,W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 1-20 (2002).
14. Tysk,C. Genetic susceptibility in Crohn's disease--review of clinical studies. *Eur. J. Surg.* 164, 893-896 (1998).
15. Hofmeister,A., Neibergs,H.L., Pokorny,R.M. & Galandiuk,S. The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery* 122, 173-178 (1997).

16. Pokorny,R.M. ; Galandiuk,S.; Dietz,A.B. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene MLH1. *Ann. Surg.* 225, 718-723 (1997).
17. Annese,V. Piepoli,A.; Andriulli,A. Polymorphism of motilin gene in patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 43, 715-719 (1998).
18. Satsangi,J. Chapman,R.W.; Haldar,N.; Donaldson,P.; Mitchell,S.; Simmons,J. A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 121, 124-130 (2001).
19. Lawrance,I.C., Fiocchi,C. & Chakravarti,S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum. Mol. Genet.* 10, 445-456 (2001).
20. Hampe,J., Frenzel,H.; Mirza,M.M.; Croucher,P.J.; Cuthbert,A. . Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 321-326 (2002).
21. Duerr,R.H. Update on the genetics of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 358-367 (2003).
22. Rioux,J.D. Progress towards identifying inflammatory bowel disease susceptibility genes. *Novartis. Found. Symp.* 263, 3-11 (2004).
23. Ogura,Y., Bonen,D.K.; Inohara,N.; Nicolae,D.L.; Chen,F.F.; Ramos,R.; Britton,H.A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606 (2001).
24. Goossens,D., Jonkers,D.; Stobberingh,E.; van den,Bogaard A. Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 15-23 (2003).
25. Salminen,S., Bouley,C.; Boutron-Ruault,M.C.; Cummings,J.H.; Franck,A.Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80 Suppl 1, S147-S171 (1998).
26. Hart,A.L., Stagg,A.J.; Frame,M.; Graffner,H. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1383-1393 (2002).
27. Tlaskalova-Hogenova,H., Stepankova,R.; Hudcovic,T.; Tuckova,L. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93, 97-108 (2004).
28. Elson,C.O., Cong,Y., Iqbal,N. & Weaver,C.T. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin. Immunol.* 13, 187-194 (2001).
29. Quiding,M., Nordstrom,I.; Kilander,A. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J. Clin. Invest* 88, 143-148 (1991).

30. Wittig,B.M. & Zeitz,M. The gut as an organ of immunology. *Int. J. Colorectal Dis.* 18, 181-187 (2003).
31. Dignass,A.U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm. Bowel Dis.* 7, 68-77 (2001).
32. Marinaro,M., Boyaka,P.N., Kiyono,H. & McGhee,J.R. Novel approaches for the induction of T helper 1 (Th1)- or Th2-type mucosal and parenteral immune responses. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 7, 1657-1666 (1998).
33. Mayer,L. Review article: Local and systemic regulation of mucosal immunity. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 Suppl 3, 81-85 (1997).
34. Duchmann,R., Kaiser,I.; Hermann,E.; Mayet,W.. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102, 448-455 (1995).
35. Duchmann,R., Neurath,M., Marker-Hermann,E. & Meyer zum Buschenfelde,K.H. Immune responses towards intestinal bacteria--current concepts and future perspectives. *Z. Gastroenterol.* 35, 337-346 (1997).
36. Underhill,D.M., Bassetti,M., Rudensky,A. & Aderem,A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J. Exp. Med.* 190, 1909-1914 (1999).
37. Wehkamp,J., Schaubert,J. & Stange,E.F. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 32-38 (2007).
38. Carroll,M.C. & Janeway,C.A. Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 11-12 (1999).
39. Ahmed,R. & Gray,D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60 (1996).
40. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* 10, 349-350 (1998).
41. Fugmann,S.D., Lee,A.I., Shockett,P.E., Villey,I.J. & Schatz,D.G. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495-527 (2000).
42. Hogquist,K.A., Jameson,S.C. & Bevan,M.J. Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 3, 79-86 (1995).
43. Zinkernagel,R.M. & Doherty,P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702 (1974).
44. Kishimoto,H. & Sprent,J. The thymus and negative selection. *Immunol. Res.* 21, 315-323 (2000).
45. Lilly,D.M. & Stillwell,R.H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganism. *Science* 147, 747-748 (1965).

46. Parker,D.S. Manipulation of the functional activity of the gut by dietary and other means (antibiotics/probiotics) in ruminants. *J. Nutr.* 120, 639-648 (1990).
47. Schrezenmeir,J. & de Vrese,M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361S-364S (2001).
48. Ling,W.H., Korpela,R., Mykkanen,H., Salminen,S. & Hanninen,O. Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.* 124, 18-23 (1994).
49. Adlerberth,I., Ahrne,S.; Johansson,M.L.. A mannose-specific adherence mechanism in Lactobacillus plantarum conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2244-2251 (1996).
50. Tannock,G.W. The bifidobacterial and Lactobacillus microflora of humans. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22, 231-253 (2002).
51. Langhendries,J.P., Detry,J.; Van Hees,J. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21, 177-181 (1995).
52. Benno,Y. & Mitsuoka,T. Impact of Bifidobacterium longum on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.* 36, 683-694 (1992).
53. Kot,E. & Bezkorovainy,A. Binding of ferric iron to the cell walls and membranes of Bifidobacterium thermophilum: effect of free radicals. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4606-4610 (1999).
54. Fujiwara,M., Kaneko,T.; Iwana,H. Inhibitory effects of Bifidobacterium longum on experimental ulcerative colitis induced in mice by synthetic dextran sulfate sodium. *Digestion* 67, 90-95 (2003).
55. Mack,D.R., Michail,S., Wei,S., McDougall,L. & Hollingsworth,M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol* 276, G941-G950 (1999).
56. Peltonen,K., el Nezami,H., Haskard,C., Ahokas,J. & Salminen,S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 84, 2152-2156 (2001).
57. Chang,R.L., Wong,C.Q.; Kline,S.A.; Conney,A.H. Mutagenicity of trans,trans-muconaldehyde and its metabolites in V79 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 24, 112-115 (1994).
58. Banasaz,M., Norin,E., Holma,R. & Midtvedt,T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with Lactobacillus rhamnosus GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3031-3034 (2002).
59. Madsen,K.L. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin. Invest Med.* 24, 250-257 (2001).

60. Banks,C., Bateman,A., Payne,R., Johnson,P. & Sheron,N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pathol.* 199, 28-35 (2003).
61. Jijon,H., Backer,J.; Diaz,H.; Yeung,H. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126, 1358-1373 (2004).
62. Lammers,K.M., Swennen,E.; Rizzello,F.. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 1182-1186 (2002).
63. Perdigon,G., de Macias,M.E., Alvarez,S., Oliver,G. & Ruiz Holgado,A.A. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53, 404-410 (1986).
64. Pelto,L., Isolauri,E., Lilius,E.M., Nuutila,J. & Salminen,S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* 28, 1474-1479 (1998).
65. Fang,H., Elina,T., Heikki,A. & Seppo,S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 47-52 (2000).
66. Christensen,H.R., Frokiaer,H. & Pestka,J.J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* 168, 171-178 (2002).
67. Sheil,B., McCarthy,J.; O'Mahony,L. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53, 694-700 (2004).
68. Marteau,P.R. Probiotics in clinical conditions. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22, 255-273 (2002).
69. Kruis,W., Schutz,E.; Fric,P. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11, 853-858 (1997).
70. Kruis,W., Fric,P.; Pokrotnieks,J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623 (2004).
71. Rembacken,B.J., Snelling,A.M., Hawkey,P.M., Chalmers,D.M. & Axon,A.T. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639 (1999).
72. Kruis,W. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 4, 75-78 (2004).
73. Gupta,P., Andrew,H., Kirschner,B.S. & Guandalini,S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31, 453-457 (2000).

74. Prantera,C., Scribano,M.L., Falasco,G., Andreoli,A. & Luzi,C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* 51, 405-409 (2002).
75. Gionchetti,P., Lammers,K.M., Rizzello,F. & Campieri,M. VSL#3: an analysis of basic and clinical contributions in probiotic therapeutics. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34, 499-49x (2005).
76. Gionchetti,P., Lammers,K.M.; Rizzello,F.; Campieri,M.. Management of pouch dysfunction or pouchitis with an ileoanal pouch. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 993-1006 (2004).
77. Venturi,A., Gionchetti,P.; Rizzello,F.; Johansson,R. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13, 1103-1108 (1999).
78. Fric,P. & Zavoral,M. The effect of non-pathogenic Escherichia coli in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 313-315 (2003).
79. Goerg,K.J. & Schlorer,E. [Probiotic therapy of pseudomembranous colitis. Combination of intestinal lavage and oral administration of Escherichia coli]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 123, 1274-1278 (1998).
80. Henker,J., Schuster,F. & Nissler,K. Successful treatment of gut-caused halitosis with a suspension of living non-pathogenic Escherichia coli bacteria--a case report. *Eur. J. Pediatr.* 160, 592-594 (2001).
81. Kim,H.J., Camilleri,M.; McKinzie,S.. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 895-904 (2003).
82. Majamaa,H. & Isolauri,E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 179-185 (1997).
83. Rosenfeldt,V., Benfeldt,E.; Nielsen,S.D. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 389-395 (2003).
84. Kalliomaki,M., Salminen,S.; Poussa,T. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079 (2001).
85. Kalliomaki,M., Salminen,S., Poussa,T., Arvilommi,H. & Isolauri,E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871 (2003).
86. Hatakka,K., . Martio,J.; Korpela,M. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study. *Scand. J. Rheumatol.* 32, 211-215 (2003).
87. Reid,G., Burton,J. & Devillard,E. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. *MedGenMed.* 6, 49 (2004).

88. Hirayama,K. & Itoh,K. Human flora-associated (HFA) animals as a model for studying the role of intestinal flora in human health and disease. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 6, 69-75 (2005).
89. Lim,C.C., Ferguson,L.R. & Tannock,G.W. Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 609-619 (2005).
90. Rowland,I. Probiotics and colorectal cancer risk. *Br. J. Nutr.* 91, 805-807 (2004).
91. Grozdanov,L., Zahringer,U.; Blum-Oehler,G. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of Escherichia coli strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 184, 5912-5925 (2002).
92. Blum-Oehler,G., Oswald,S.; Eiteljorge,K. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res. Microbiol.* 154, 59-66 (2003).
93. Altenhoefer,A., Oswald,S.; Sonnenborn,U. The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 223-229 (2004).
94. Mollenbrink,M. & Bruckschen,E. Treatment of chronic constipation with physiologic Escherichia coli bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the E. coli Nissle 1917 strain (Mutaflor)]. *Med. Klin. (Munich)* 89, 587-593 (1994).
95. Cukrowska,B., Lodinova-Zadnikova,R.; Enders,C.; Sonnenborn,U. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* 55, 204-209 (2002).
96. Lodinova-Zadnikova,R., Cukrowska,B. & Stranak,Z. [Effect of care in a protected environment on the occurrence of nosocomial infections, mucosal colonization of pathogenic microflora and development of indicators of immunity in premature infants]. *Ceska. Gynecol.* 67 Suppl 1, 23-28 (2002).
97. Tromm,A., Niewerth,U.; Khoury,M.; Baestlein,E. The probiotic E. coli strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-label trial. *Z. Gastroenterol.* 42, 365-369 (2004).
98. Schultz,M., Niewerth,U.; Khoury,M.; Baestlein,E. Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11, 372-378 (2004).
99. Boudeau,J., Glasser,A.L., Julien,S., Colombel,J.F. & Darfeuille-Michaud,A. Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 45-56 (2003).
100. Wehkamp,J., Harder,J.; Wehkamp,K.; Wehkamp-von Meissner,B. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by

- Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* 72, 5750-5758 (2004).
101. Hoffmann,R.M. & Kruis,W. [Probiotics and prebiotics--a renaissance?]. *Internist (Berl)* 43, 1400-1406 (2002).
102. Watt,F.M., Kubler,M.D., Hotchin,N.A., Nicholson,L.J. & Adams,J.C. Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *J. Cell Sci.* 106 ( Pt 1), 175-182 (1993).
103. Timpl,R. & Brown,J.C. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18, 123-132 (1996).
104. van der,R.M. & Garrone,R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823 (1991).
105. Timpl,R. & Brown,J.C. The laminins. *Matrix Biol.* 14, 275-281 (1994).
106. Bosman,F.T. & Stamenkovic,I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200, 423-428 (2003).
107. Roy,S., Zhang K., Roth T. Reduction of fibronectin expression by intravitreal administration of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 17, 476-479 (1999).
108. Rosso,F., Giordano,A., Barbarisi,M. & Barbarisi,A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell Physiol* 199, 174-180 (2004).
109. Hynes,R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9, M33-M37 (1999).
110. Howe,A., Aplin,A.E., Alahari,S.K. & Juliano,R.L. Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 220-231 (1998).
111. Clark,E.A. & Hynes,R.O. 1997 keystone symposium on signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1333, R9-16 (1997).
112. Albelda,S.M. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4, 195-203 (1991).
113. van der,F.A. & Sonnenberg,A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305, 285-298 (2001).
114. Jin,H. & Varner,J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer* 90, 561-565 (2004).
115. Buck,C.A. & Horwitz,A.F. Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J. Cell Sci. Suppl* 8, 231-250 (1987).
116. Fishman,D.A. *et al.* Metastatic dissemination of human ovarian epithelial carcinoma is promoted by alpha2beta1-integrin-mediated interaction with type I collagen. *Invasion Metastasis* 18, 15-26 (1998).
117. Arthur,W.T., Noren,N.K. & Burridge,K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol. Res.* 35, 239-246 (2002).

118. Danen,E.H., van Rheenen J, Franken W. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J. Cell Biol.* 169, 515-526 (2005).
119. Giancotti,F.G. A structural view of integrin activation and signaling. *Dev. Cell* 4, 149-151 (2003).
120. Schwartz,M.A. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 11, 466-470 (2001).
121. Hynes,R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687 (2002).
122. Geiger,B. Cell biology. Encounters in space. *Science* 294, 1661-1663 (2001).
123. Zhu,X., Ohtsubo,M., Bohmer,R.M., Roberts,J.M. & Assoian,R.K. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* 133, 391-403 (1996).
124. Boudreau,N.J. & Jones,P.L. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* 339 ( Pt 3), 481-488 (1999).
125. Anderson,K.V., Bokla,L. & Nusslein-Volhard,C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798 (1985).
126. Hashimoto,C., Hudson,K.L. & Anderson,K.V. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279 (1988).
127. Gay,N.J. & Keith,F.J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356 (1991).
128. Belvin,M.P. & Anderson,K.V. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 393-416 (1996).
129. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt P, Kopp E. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258 (1998).
130. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P. & Janeway,C.A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397 (1997).
131. Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A. & Bazan,J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 588-593 (1998).
132. Muzio,M. & Mantovani,A. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J. Endotoxin. Res.* 7, 297-300 (2001).
133. Girardin,S.E., Philpott,D.J. & Lemaitre,B. Sensing microbes by diverse hosts. Workshop on pattern recognition proteins and receptors. *EMBO Rep.* 4, 932-936 (2003).

134. Hirschfeld,M., Kirschning CJ, Schwandner R. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163, 2382-2386 (1999).
135. Ozinsky,A.The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13766-13771 (2000).
136. Yoshimura,A., Lien E., Ingalls RR. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163, 1-5 (1999).
137. Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M. & Kirschning,C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406-17409 (1999).
138. Henneke,P., Morath S., Uematsu S. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J. Immunol.* 174, 6449-6455 (2005).
139. Hirschfeld,M., Weiss JJ, Toshchakov V. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69, 1477-1482 (2001).
140. Tapping,R.I., Akashi,S., Miyake,K., Godowski,P.J. & Tobias,P.S. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 165, 5780-5787 (2000).
141. Yang,H., Young,D.W., Gusovsky,F. & Chow,J.C. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J. Biol. Chem.* 275, 20861-20866 (2000).
142. Shimazu,R., Akashi S., Ogata H. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189, 1777-1782 (1999).
143. Dziarski,R., Wang,Q., Miyake,K., Kirschning,C.J. & Gupta,D. MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components. *J. Immunol.* 166, 1938-1944 (2001).
144. Kurt-Jones,E.A., Popova L., Kwinn L. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1, 398-401 (2000).
145. Poltorak,A., Ricciardi-Castagnoli,P., Citterio,S. & Beutler,B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2163-2167 (2000).
146. Okamura,Y., Watari M, Jerud ES. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229-10233 (2001).
147. Hatada,E.N., Krappmann,D. & Scheidereit,C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 52-58 (2000).

148. Shoda,L.K., Kegerreis K.A., Suarez C.E. Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-alpha, and NO production by bovine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 70, 103-112 (2001).
149. Singh,H., Sen,R., Baltimore,D. & Sharp,P.A. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319, 154-158 (1986).
150. Baldwin,A.S., Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest* 107, 3-6 (2001).
151. Arbibe,L., Mira JP., Teusch N. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1, 533-540 (2000).
152. Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A. & Ezekowitz,R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318 (1999).
153. Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin. Immunol.* 12, 185-188 (2000).
154. Takeuchi,O., Hoshino K., Kawai T. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11, 443-451 (1999).
155. Braun,V. & Wolff,H. Attachment of lipoprotein to murein (peptidoglycan) of Escherichia coli in the presence and absence of penicillin FL 1060. *J. Bacteriol.* 123, 888-897 (1975).
156. Melchers,F., Braun,V. & Galanos,C. The lipoprotein of the outer membrane of Escherichia coli: a B-lymphocyte mitogen. *J. Exp. Med.* 142, 473-482 (1975).
157. Norgard,M.V. Activation of human monocytic cells by Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides proceeds via a pathway distinct from that of lipopolysaccharide but involves the transcriptional activator NF-kappa B. *Infect. Immun.* 64, 3845-3852 (1996).
158. Kreutz,M., Ackermann U., Hauschildt S. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and Staphylococcus aureus in human monocytes. *Immunology* 92, 396-401 (1997).
159. Seifert,R., Schultz G., Richter-Freund M. Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam3Cys-Ser-(Lys)4. Involvement of guanine-nucleotide-binding proteins and synergism with chemotactic peptides. *Biochem. J.* 267, 795-802 (1990).
160. Wiesmuller,K.H., Bessler,W.G. & Jung,G. Solid phase peptide synthesis of lipopeptide vaccines eliciting epitope-specific B-, T-helper and T-killer cell response. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 255-260 (1992).
161. Means,T.K., Golenbock,D.T. & Fenton,M.J. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 219-232 (2000).

162. Sturm,A., Rilling K., Baumgart DC. Escherichia coli Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect. Immun.* 73, 1452-1465 (2005).
163. Guarner,F. & Malagelada,J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519 (2003).
164. Isolauri,E., Rautava,S., Kalliomaki,M., Kirjavainen,P. & Salminen,S. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2, 263-271 (2002).
165. Krammer,H.J. Probiotic drug therapy with E. coli strain Nissle 1917 (EcN): results of a prospective study of the records of 3,807 patients. *Z. Gastroenterol.* 44, 651-656 (2006).
166. Pridmore,A.C., Wyllie DH., Abdillahi F. A lipopolysaccharide-deficient mutant of Neisseria meningitidis elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J. Infect. Dis.* 183, 89-96 (2001).
167. Agnese,D.M. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J. Infect. Dis.* 186, 1522-1525 (2002).
168. Edfeldt,K., Bennet AM., Eriksson P. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 25, 1447-1453 (2004).
169. Torok,H.P., Glas,J., Tonenchi,L., Mussack,T. & Folwaczny,C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin. Immunol.* 112, 85-91 (2004).
170. Oostenbrug,L.E., Drenth JP., de Jong DJ. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11, 567-575 (2005).
171. Sieling,P.A., Chung,W., Duong,B.T., Godowski,P.J. & Modlin,R.L. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J. Immunol.* 170, 194-200 (2003).
172. Kabelitz,D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 39-45 (2007).
173. Neurath,M.F., Pettersson,S., Meyer zum Buschenfelde,K.H. & Strober,W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat. Med.* 2, 998-1004 (1996).
174. Rogler,G., Brand K., Vogl D. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357-369 (1998).
175. Sturm,A., Krivacic,K.A., Fiocchi,C. & Levine,A.D. Dual function of the extracellular matrix: stimulatory for cell cycle progression of naive T cells and antiapoptotic for tissue-derived memory T cells. *J. Immunol.* 173, 3889-3900 (2004).

176. Sturm,A., Mohr,S. & Fiocchi,C. Critical role of caspases in the regulation of apoptosis and proliferation of mucosal T cells. *Gastroenterology* 122, 1334-1345 (2002).
177. Frleta,D., Noelle,R.J. & Wade,W.F. CD40-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4-MD2 complex on the surface of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1064-1073 (2003).
178. Proietto,A.I., Gartlan K., Wright MD. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology* 209, 163-172 (2004).
179. Massari,P., Henneke P., Ho Y. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 168, 1533-1537 (2002).
180. Ray,A., Karmakar,P. & Biswas,T. Up-regulation of CD80-CD86 and IgA on mouse peritoneal B-1 cells by porin of *Shigella dysenteriae* is Toll-like receptors 2 and 6 dependent. *Mol. Immunol.* 41, 1167-1175 (2004).
181. Lauzurica,P., Sancho D., Torres M. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 95, 2312-2320 (2000).
182. Esplugues,E., Sancho D., Vega-Ramos J. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J. Exp. Med.* 197, 1093-1106 (2003).
183. Murata,K., Inami M. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15, 987-992 (2003).
184. Feng,C., Woodside KJ., Vance BA. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* 14, 535-544 (2002).
185. Luft,T., Jefford M., Luetjens P. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J. Immunol.* 168, 713-722 (2002).
186. Mukundan,L., Milhorn,D.M., Matta,B. & Suttles,J. CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway. *Cell Signal.* 16, 375-384 (2004).
187. Amrani,A., Serra P., Yamanouchi J. CD154-dependent priming of diabetogenic CD4(+) T cells dissociated from activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 16, 719-732 (2002).
188. Williams,J.A., Sharrow,S.O., Adams,A.J. & Hodes,R.J. CD40 ligand functions non-cell autonomously to promote deletion of self-reactive thymocytes. *J. Immunol.* 168, 2759-2765 (2002).
189. Stumpf,C., Lehner C., Eskafi S. Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 5, 629-637 (2003).
190. Ludewig,B., Graf D., Gelderblom HR. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 25, 1943-1950 (1995).

191. Vogel, J.D., West G.A., Danese S. CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration. *Gastroenterology* 126, 63-80 (2004).
192. Cron, R.Q. CD154 transcriptional regulation in primary human CD4 T cells. *Immunol. Res.* 27, 185-202 (2003).
193. Takagi, J. & Springer, T.A. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* 186, 141-163 (2002).
194. Hood, J.D. & Cheresch, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2, 91-100 (2002).
195. Casey, R.C., Burleson K.M., Skubitz K.M. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am. J. Pathol.* 159, 2071-2080 (2001).
196. Ludewig, B., Graf D., Gelderblom H.R. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 25, 1943-1950 (1995).
197. Vogel, J.D., West G.A., Danese S. CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration. *Gastroenterology* 126, 63-80 (2004).
198. Cron, R.Q. CD154 transcriptional regulation in primary human CD4 T cells. *Immunol. Res.* 27, 185-202 (2003).
199. Takagi, J. & Springer, T.A. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* 186, 141-163 (2002).
200. Hood, J.D. & Cheresch, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2, 91-100 (2002).
201. Casey, R.C., Burleson K.M., Skubitz K.M. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am. J. Pathol.* 159, 2071-2080 (2001).
202. Zeitz, M.; Ullrich, R.; Schneider, T. Schieferdecker, H.L. und Riecken, E. O. Cell differentiation and proliferation in the gastrointestinal tract with respect to the local immune system, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (Band 733), 75-86. URL:PM: 7978905 (1994)

## 7. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg beruflich und privat unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Andreas Sturm, Oberarzt an der Med. Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie, Ernährung und Stoffwechsel an der Charité, CVK, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand. Er führte mich während meines Studiums an das wissenschaftliche Arbeiten heran und ermöglichte mir erst durch seine stetige und uneigennützte Förderung, sowie unermüdlige einzigartige Motivation die Durchführung und Beendigung der vorliegenden Promotionsarbeit.

Weiterhin danke ich der großzügigen Unterstützung der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. A. Zychlinsky (Max-Planck-Institut, Berlin) vor allem Frau Dr. B.Raupach, welche mir zur Durchführung der Versuche die notwendigen Tiere und Materialien zur Verfügung stellte. Den chirurgischen Kollegen des DRK Klinikum Westend in Berlin danke ich für die stets problemlose Zusammenarbeit und für die zur Verfügung gestellten kolorektalen Resektate. Ferner danke ich den Mitarbeitern der AG Prof. Dr. R.R.Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charite Universitätsmedizin Berlin, speziell Jana Eckert, in deren Räumen die Versuche der Transfektion durchgeführt wurden.

Liebe Kollegen im gastroenterologischen Labor im Forschungsgebäude des CVK, Euch danke ich für die liebevolle Aufnahme in euren Kreis, für die stete, interessierte und kompetente Beantwortung all meiner Fragen, sowie der wichtigen moralischen Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Für die finanzielle und moralische Unterstützung meiner Familie möchte ich mich sehr bedanken. Weiterhin danke ich meinem Sohn Aurel, der mir die nötige Kraft gab mein Studium und diese Promotion zu vollenden.

Last but not least danke ich meinem Vater Herrn Dr. J. Troschke und Herrn Dr. rer.nat.C. Böhme für all die kleinen Feinheiten, die sie zum Gelingen und Vervollständigen der nun vorliegenden Promotionsarbeit beigetragen haben. Ihre Ratschläge und kritischen Anmerkungen waren eine überaus wertvolle Hilfe. Die Zeit und immense Geduld, die beide dafür aufbringen mussten, weiß ich sehr zu schätzen.

## Lebenslauf

---

"Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

---

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Ilka Troschke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Signaltransduktion und Signalverarbeitung des probiotischen Bakteriums E. coli Nissle 1917 in vitro selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“