

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung  
Institut für Infektiologie  
- Direktorin: Prof. Dr. Petra Dersch -

Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die  
Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 und  
die Adhärenz am gastrointestinalen Epithel

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Wrage, Hannah Antonia

aus Hamburg

2020

Gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Alexander Schmidt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Kuczius

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Infektiologie  
- Direktorin: Prof. Dr. Petra Dersch -

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Alexander Schmidt

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Kuczius

### ZUSAMMENFASSUNG

Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 und die Adhärenz am gastrointestinalen Epithel

Wrage, Hannah Antonia

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 und die Adhärenz am gastrointestinalen Epithel untersucht. Dazu wurden in einem Zellkulturmodell verschiedene Inkubations- und Infektionsszenarien und deren Auswirkung auf die Expression von Virulenzeigenschaften sowie die Modulation der Adhärenz der Bakterien an unterschiedliche humane Epithelzelllinien untersucht und analysiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen reduktiven Effekt des *L. rhamnosus* W65 auf die Virulenzgenexpression (untersucht wurden *bfpA*, *espD*, *eae*) des EPEC E2348/69 im Ko-Inkubationsmodell. Die Auswertung der Adhärenzstudien konnte keinen Effekt des probiotischen Stammes auf die Adhärenz des EPEC E2348/69 an der T84-Zelllinie zeigen. Im Infektionsmodell der HT29-Zellen wurde eine Begünstigung der EPEC-Adhärenz durch die Präsenz des *L. rhamnosus* W65 beobachtet. Die Einbindung eines weiteren *L. rhamnosus* Stammes in das HT29-Infektionsmodell zeigte diesen adhärenzfördernden Effekt nicht.

Darüber hinaus wurde das Wachstumsverhalten des EPEC E2348/69 in unterschiedlichen Zusammensetzungen des Nährmediums studiert. Gezeigt werden konnte, dass das MRS-Medium (*Lactobacillus*-Bouillon) kein kompetentes Nährmedium für den EPEC E2348/69 darstellt. Das Wachstum des Pathogens in einer Mischung aus dem klassischen LB-Medium und dem MRS-Medium führte zu einem veränderten Niveau der Transkriptionsraten, Proteinexpressionsmuster und elektronenmikroskopisch dokumentierten Erscheinungsbild des *Escherichia coli*. Die Identifikation der beeinflussenden Faktoren steht noch aus.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2020

## Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz  
des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 und die Adhärenz  
am gastrointestinalen Epithel

im:

Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung - Institut für Infektiologie

unter Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Alexander Schmidt

- 
1. selbstständig angefertigt,
  2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
  3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
  4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 23.10.2020

Hannah Antonia Wrage

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das humane Mikrobiom .....	1
1.1.1. Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms .....	2
1.1.2. Aufgaben des Mikrobioms .....	3
1.1.3. Eubiose und Dysbiose.....	4
1.2. Antibiotika .....	4
1.2.1. Antibiotikaresistenzen.....	5
1.2.2. Einfluss auf die residente Darmflora .....	5
1.3. Probiotika .....	6
1.3.1. <i>Laktobazillen</i> .....	7
1.3.1.1. Probiotische Eigenschaften der <i>Laktobazillen</i> .....	8
1.3.1.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	8
1.4. Humanpathogene <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.4.1. Enteropathogene <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.4.1.1. Klinische Manifestation einer EPEC-Infektion .....	11
1.4.1.2. Morphologie .....	11
1.4.1.2.1. Flagellen.....	11
1.4.1.2.2. <i>Outer membrane vesicles</i> (OMVs).....	12
1.4.1.3. Genetik.....	13
1.4.1.4. Regulationsmechanismen der Virulenz des Pathogens .....	15
1.4.1.5. Das <i>Type III secretion system</i> (TTSS).....	15
1.4.1.6. Pathogenese der Infektion von gastrointestinalen Epithelzellen mit EPEC.....	17
1.5. Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>Kapitel 2 Material</b> .....	<b>19</b>
2.1. Bakterienstämme .....	19
2.2. Eukaryotische Zelllinien.....	19
2.3. Kulturmedien, Reagenzien und Puffer .....	19
2.3.1. Kulturmedien und Reagenzien für die Kultivierung von Bakterien.....	19
2.3.1.1. Kulturmedien für die Kultivierung von enteropathogenem <i>Escherichia coli</i> E2348/69	19
2.3.1.2. Kulturmedien für die Kultivierung von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	20
2.3.2. Kulturmedien, Reagenzien und Puffer für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	20
2.4. Proteingrößenstandard .....	22

2.5. Antikörper .....	22
2.6. Primer .....	23
2.7. Enzyme .....	23
2.8. Chemikalien .....	24
2.9. Fluoreszenzkonjugate.....	24
2.10. Kits .....	25
2.11. Verbrauchsmaterial .....	25
2.12. Geräte.....	26
2.13. Programme und Software .....	27
<b>Kapitel 3 Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.1. Mikrobiologische Methoden .....	28
3.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien .....	28
3.1.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von enteropathogenem <i>Escherichia coli</i> E2348/69 ...	28
3.1.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Stämmen .....	28
3.1.2. Bestimmung der optischen Dichte .....	28
3.1.3. Bestimmung der Zellzahl .....	29
3.1.4. Gewinnung des zellfreien Kulturüberstandes .....	29
3.1.5. Inkubationsstudien.....	29
3.1.6. Negativfärbung von Bakterien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	30
3.1.7. Immunfluoreszenzfärbung des EPEC E2348/69 .....	31
3.2. Zellbiologische Methoden .....	31
3.2.1. Kultivierung und Passage von eukaryotischen Zellen .....	31
3.2.1.1. Revitalisierung von kryokonservierten Zellen .....	32
3.2.1.2. Passage von eukaryotischen Zellen.....	32
3.2.1.3. Kultivierung und Passage von T84-Zellen.....	32
3.2.1.4. Kultivierung und Passage von HT29-Zellen .....	32
3.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl.....	33
3.2.2. Adhärenzstudien .....	33
3.2.2.1. Analyse nach der Ausplattiermethode.....	34
3.2.2.2. Bildbasierte Analyse .....	34
3.2.3. Immunfluoreszenzfärbungen .....	35
3.2.4. Präparation von Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	35
3.3. Molekularbiologische Methoden .....	36
3.3.1. RNA-Isolierung aus prokaryontischen Zellen .....	36
3.3.2. RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung am NanoDrop Spektrophotometer .....	37

3.3.3. cDNA-Synthese .....	37
3.3.4. <i>Quantitative real-time</i> PCR (qRT-PCR) .....	38
3.4. Proteinbiochemische Methoden.....	40
3.4.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	40
3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
3.4.3. Färbungen mit Coomassie Brilliant Blue .....	43
3.4.4. <i>Semi-dry</i> Western Blotting .....	43
3.4.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran .....	44
Kapitel 4 Ergebnisse .....	47
4.1. Auswahl und Charakterisierung der ausgewählten Bakterienstämme.....	47
4.1.1. Enteropathogener <i>Escherichia coli</i> Stamm E2348/69 .....	47
4.1.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	50
4.1.2.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 .....	50
4.1.2.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1121 .....	51
4.2. Wachstumsverhalten des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> Stamms E2348/69 in unterschiedlichen Medien.....	52
4.2.1. Analyse der Wachstumskurve anhand der optischen Dichte der Bakteriensuspension ....	52
4.2.2. Mikroskopische Analyse des EPEC E2348/69 .....	55
4.2.3. Analyse der Virulenzgenexpression des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69.....	57
4.2.4. Analyse der Proteinexpression im Western Blot .....	58
4.3. Einfluss des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 auf die Virulenz des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69.....	61
4.4. Adhärenz des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 an das gastrointestinale Epithel. 64	
4.4.1. Auswahl und Charakterisierung der <i>in vitro</i> Modelle .....	64
4.4.1.1. T84-Zellen .....	64
4.4.1.1.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen .....	64
4.4.1.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	65
4.4.1.2. HT29-Zellen.....	66
4.4.1.2.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen .....	66
4.4.1.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	67
4.4.1.2.3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	68
4.4.2. Infektion der T84-Zellen mit enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 .....	72
4.4.2.1. Einfluss des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 auf die Infektion der T84-Zellen mit EPEC E2348/69 .....	72
4.4.3. Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69.....	73

4.4.3.1. Einfluss des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 auf die Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69 .....	74
4.4.3.2. Einfluss des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1121 auf die Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69 .....	74
<b>Kapitel 5 Diskussion.....</b>	<b>76</b>
5.1. Wachstum des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 in unterschiedlichen Medien....	76
5.2. Einfluss des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 auf die Virulenz des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69.....	78
5.3. Wirksamkeit von Kulturüberständen probiotischer Bakterien .....	79
5.4. Gentranskriptionsanalysen regulativer Elemente.....	80
5.5. Adhärenzstudien des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 an gastrointestinalen Epithelzelllinien .....	80
5.6. Bildbasierte Analysen .....	81
5.7. Ausblick .....	83
5.7.1. Membranstabilisierender Effekt von Probiotika .....	83
5.7.2. Induktion der Muzin-Produktion und der Effekt auf das Pathogen.....	84
5.8. Fazit .....	85
Literaturverzeichnis.....	86
Danksagung .....	93
Lebenslauf .....	94
Anhang .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1. Das humane Mikrobiom

Die Bezeichnung des humanen Mikrobioms beschreibt die Gesamtheit aller, den menschlichen Körper besiedelnden, Mikroorganismen [1]. Archea, Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren bilden Bestandteile des humanen Mikrobioms [1]. Der menschliche Körper besitzt eine der Außenwelt entgegen gerichtete Oberfläche. Neben der äußeren Oberfläche, der Haut, die eine Fläche von bis zu 2 m<sup>2</sup> umfasst, bilden die Schleimhäute des Respirationstrakts (HNO, Larynx, Trachea und Lunge) sowie des Gastrointestinal- und des Urogenitaltrakts weitere von Mikroorganismen besiedelte Oberflächen. Die Schleimhaut des Intestinaltrakts erfährt durch makro- und mikroskopische Charakteristika (Kerckring-Falten, Krypten und Zotten, Mikrovilli) eine Vergrößerung der Oberfläche um den Faktor 600 [2]. Diese Gesamtfläche von 150 bis 200 m<sup>2</sup> [3] bietet die Möglichkeit einer umfangreichen Besiedlung durch Mikroorganismen.

Das menschliche Mikrobiom ist essenziell für das Erreichen der vollständigen Organfunktion [1]. Der Begriff des Holobionten [1] beschreibt den Menschen und das Mikrobiom als ein Gesamtlebewesen, das als biologisches System aus einem eukaryotischen Wirtsorganismus und einer Vielzahl, den Wirtsorganismus besiedelnden, prokaryotischer Lebewesen besteht. Diese intime Verbindung mit dem Mikrobiom entwickelt sich bei der Geburt und begleitet den Menschen bis zu seinem Tod [4]. Der Terminus Mutualismus beschreibt das Zusammenleben zwischen dem humanen Wirtsorganismus und seinem Mikrobiom genauer [4]. Er definiert eine Beziehung, die – in der Regel – für beide Interaktionspartner von Vorteil ist [4].

Die Zusammensetzung des Mikrobioms verschiedener Organe unterscheidet sich deutlich. Die intestinale Mikrobiota setzt sich zu mehr als 99 % aus bakteriellen Mikroorganismen zusammen [5], während zum Mikrobiom der Haut auch Pilze mit einem relativ großen Anteil von etwa 10 % beitragen [6].

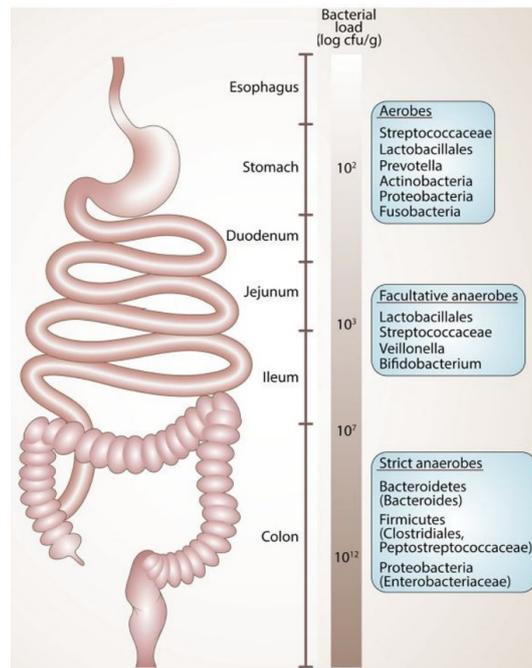


Abbildung 1 Organisation des Gastrointestinaltrakts (GIT) und Zusammensetzung des residenten Mikrobioms. Links: schematische Darstellung des GIT; Rechts: Bakterienvorkommen und Vertreter des lokalen Mikrobioms. Modifiziert nach [1].

Abbildung 1 stellt schematisch den Verdauungstrakt, die Bakterienbesiedelung (cfu/g) und die charakteristischen Vertreter der einzelnen Abschnitte des Magen-Darm-Trakts dar [1]. Die Zusammensetzung differiert im Verlauf der Darmpassage beginnend mit aeroben, über fakultativ anaerobe bis zu obligat anaeroben Spezies [7]. Die Besiedelung nimmt von oral nach aboral zu [1]. Bedingt durch den sauren pH-Wert sind im Magen Werte von  $10^3$  cfu/g Chymus dokumentiert. Das neutralisierte Milieu (pH-Wert: 7) im Dünndarm, hervorgerufen durch die alkalischen Verdauungssäfte des Pankreas und der Gallenblase, ermöglichen einen Anstieg der Bakterienzahlen bis zu  $10^8$  cfu/g im Ileum. Im Kolon erreicht die Bakterienkonzentration ein Maximum von etwa  $10^{13}$  cfu/g mit einer Speziendiversität von 300 bis 400 unterschiedlichen Gattungen. Mehr als 70 % der residenten Darmflora des Gastrointestinaltrakts besiedeln den Dickdarm [1].

### 1.1.1. Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms

Schon 1997 beschrieb Gerald W. Tannock die individuelle Zusammensetzung des Mikrobioms und sprach von einem genetischen Fingerabdruck der Darmflora [8]. Auch intraindividuelle Unterschiede in der Komposition der Mikrobiota konnten festgestellt werden [9,10]. Das gastrointestinale Mikrobiom setzt sich aus mehr als 1.000 Bakterienspezies zusammen [11]. *Bacteroidetes* und *Firmicutes* bilden die Hauptbestandteile des Mikrobioms, während *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* die unterrepräsentierten Spezies darstellen [12]. Veränderungen der natürlichen Darmflora

treten im Laufe des Lebens bei einigen Individuen auf, in anderen hingegen zeigt sich eine Beständigkeit der Zusammensetzung [2]. Die originäre Gestalt des Mikrobioms bildet sich durch die ersten extrauterinen Expositionen des Neugeborenen. Bei einer vaginalen Entbindung kommt der Säugling mit der Scheidenflora in Kontakt [13]. Wird das Kind über einen Kaiserschnitt entbunden, dominieren zunächst Keime der Haut das Mikrobiom des Neugeborenen [13]. Um die Umstände einer natürlichen Geburt nachzuahmen, kann ein *Vaginal Seeding* durchgeführt werden. Der Prozess des *Vaginal Seeding* bezeichnet den mikrobiellen Transfer der Vaginalflora auf den Säugling: Dabei wird ein Tupfer mit dem Vaginalsekret der Mutter getrenkt, zuerst die Mundschleimhaut, dann das Gesicht und abschließend die restliche Körperoberfläche des Babies damit benetzt [14]. Studien zufolge leiden Kinder, die durch einen Kaiserschnitt zur Welt gekommen sind, unter einem höheren Risiko, an Asthma, juveniler Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie weiteren Immundefizienzen zu erkranken [15]. Diese Beobachtungen deuten bereits daraufhin, dass der Zusammensetzung des Mikrobioms eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung des allgemeinen Gesundheitszustands zukommt.

### **1.1.2. Aufgaben des Mikrobioms**

Die Funktionen des Mikrobioms sind vielfältig und komplex und lassen sich anhand der Interaktionspartner in drei große Felder einteilen: (1) Interaktionen mit dem Wirtsorganismus, (2) Interaktion mit Pathogenen und (3) Interaktion innerhalb der Mikrobiota [4].

(1) Das Mikrobiom unterstützt den Wirt durch die Synthese von Vitaminen und verdauungsfördernden Enzymen [2]. Unter anderem durch die Produktion von SCFA (*short chain fatty acids*) stellt es bis zu 10 % der täglich benötigten Kalorien zur Verfügung [1]. Durch Stärkung der Zell-Zell-Kontakte und Unterstützung der Regeneration geschädigten Epithels trägt das Mikrobiom zur Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Barriere bei [16]. Die Stimulation des Immunsystems durch die Mikroorganismen [2] führt zur Entwicklung einer ausbalancierten Immunantwort [17]. Das Immunsystem kontrolliert die intestinale Mikrobiota, verhindert übermäßiges Wachstum und den Übertritt in die Gewebe des Organismus [16]. Zusätzlich toleriert es pathogene Keime unterhalb der minimalen Infektionsdosis und vermeidet so eine systemische Immunantwort [4]. Das gastrointestinale Epithel befindet sich damit in einem chronisch-entzündlichen Zustand, der das mikrobiotische Gleichgewicht ermöglicht [18]. Die Toleranz gegenüber den residenten Mikroorganismen wird unter anderem durch die Reduktion der TLR (*Toll-like Receptor*)-Expression und eine reduzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen ermöglicht [19].

(2) Das Mikrobiom zeigt durch die Abwehr von Pathogenen protektive Fähigkeiten gegenüber dem Wirtsorganismus. Die Besiedlung des Darmtrakts durch kommensale Mikroorganismen führt zu

einer ‚Kolonisations-Resistenz‘, einem hocheffizienten Abwehrmechanismus [20]. Die Besetzung der Bindungsstellen des intestinalen Epithels durch Bestandteile des Mikrobioms hat eine Reduktion der Adhärenz von Pathogenen zur Folge [21]. Bestandteile der Mikrobiota produzieren antimikrobiell wirksame Substanzen und dämmen dadurch bestimmte Bakterienpopulation ein. Antimikrobielle Produkte von *Laktobazillen* und *Bazillen* zeigen inhibitorische Wirkungen auf unterschiedliche enteropathogene Bakterien, Gram-positive sowie Gram-negative [22].

(3) Die mikrobiotische Population ist zu ihrer Aufrechterhaltung und der eigenständigen Regeneration fähig [23].

### **1.1.3. Eubiose und Dysbiose**

Eubiose beschreibt den Gleichgewichtszustand des humanen Mikrobioms. In einem Holobionten leben der Wirtsorganismus und das ihn besiedelnde Mikrobiom in einem mutualistischen Verhältnis [4]. Für das gastrointestinale Mikrobiom gilt, ein eubiotischer Zustand ist charakterisiert durch eine überwiegende Anzahl von unschädlichen, probiotischen Mikroorganismen und einem geringen Anteil von opportunistischen und pathogenen Spezies [4]. Diese Balance kann durch den Einfluss von externen sowie internen Faktoren aus dem Gleichgewicht geraten [4]. Alter, Ernährung, Stresslevel und Einnahme von Medikamenten tragen dazu bei [24]. Sobald der Gleichgewichtszustand nicht mehr vorherrscht, wird von einer Dysbiose gesprochen [4]. Eine Dysbiose ist dagegen definiert als ein Zustand, in dem Mikroorganismen und Wirtsorganismus nicht mehr in einem mutualistischen Verhältnis leben [4]. Eine Antibiotika-Therapie ist daher ein häufiger Auslöser der Dysbiose. Das Ungleichgewicht kann zu einer Überwucherung von Bakterien, unter anderem durch *Escherichia coli*, führen. Auch Antibiotika-assoziierte Diarrhoen können die Folge sein [4]. Die schwerste Ausprägung stellt die pseudomembranöse Kolitis (PMC) dar, die in 95 % durch das Pathogen *Clostridium difficile* hervorgerufen wird [25].

## **1.2. Antibiotika**

‚Antibiotika (griech. anti: gegen, biotikos: zum Leben gehörig) sind Stoffe, die in geringer Konzentration das Wachstum von Bakterien hemmen oder [diese] abtöten‘ [26]. 1928 entdeckte Alexander Fleming die erste antibiotisch wirksame Substanz, stammend aus dem Schimmelpilz *Penicillium chryogenum*. Neben weiteren Stoffwechselprodukten von Bakterien oder Pilzen, werden heutzutage (teil-) synthetische und gentechnisch gewonnene antibiotische Moleküle in der Therapie eingesetzt. Ein natürlicher, selektiver Anpassungsmechanismus ist die Bildung von Resistenzen gegenüber antibiotischen Molekülen. Organismen, die antimikrobielle Substanzen produzieren, überleben, in dem sie selbst die

Zielstruktur des Moleküls nicht besitzen (Beispiel: Hefepilz und Zellwandsynthese-inhibierendes Penicillin) oder durch die Entwicklung eines Schutzmechanismus, den sie in Form einer Resistenz in sich tragen. Die Anwesenheit eines Antibiotikums führt zu einem Selektionsdruck auf die Bakterienpopulation. Die empfindlichen Bakterien sterben ab, die Resistenzgen-tragenden persistieren und replizieren sich. Dieser Selektionsvorteil führt zur Veränderung des Gleichgewichts zugunsten der resistenten Bakterienpopulation. Nicht nur die Selektion resistenter Keime, auch die genetische Flexibilität des bakteriellen Genoms führt zu der Verbreitung von Resistenzen.

### **1.2.1. Antibiotikaresistenzen**

Nach Entdeckung des Penicillins 1928 durch Alexander Fleming wurde 1940 der erste Penicillin-resistente *Staphylococcus* identifiziert, 1959 folgten Tetracycline-resistente *Shigella* und 1962 wurde der erste Fall von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, kurs MRSA, beschrieben [27]. Die Anzahl von Infektionen hervorgerufen durch resistente Keime und die Charakterisierung neuer resistenter Bakterienstämme steigt an. Für die USA zeigen sich steigende Inzidenzen für  $\beta$ -Laktamase-produzierende *Enterobacteriaceae*, Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* sowie MDR (engl. *multidrug-resistant*) *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* insbesondere bei hospitalisierten Patienten [28]. Immer häufiger kommt es zur Anwendung von Reserveantibiotika. Studien zeigen für Indien eine Zunahme von 69 % des Verkaufs von Reserveantibiotika im Vergleich der Jahre 2011/12 zu 2007/08 [29]. Tom Frieden, Direktor des *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* warnte: ‚If we are not careful, we will soon be in a post-antibiotic era [...] and for some patients and for some microbes, we are already there‘ [30].

### **1.2.2. Einfluss auf die residente Darmflora**

Eine Antibiotika-Therapie kann neben dem gewünschten Effekt, die Infektionsursache zu bekämpfen und das Pathogen zu eliminieren, allerdings auch eine Vielzahl von Nebenwirkungen auslösen. Antibiotika wirken nicht selektiv nur auf Pathogene, sondern in gleichem Ausmaß auf mutualistisch mit dem Menschen lebende Bakterien der humanen Mikrobiota. Eine Regeneration des Antibiotika-therapierten Mikrobioms kann unterschiedliche Zeit in Anspruch nehmen oder sogar ausbleiben. Neben der vorübergehenden bis hin zur persistierenden Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms kommt es auch zu einer Veränderung der Immunreaktion [31].

### 1.3. Probiotika

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gemeinsam mit der *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) definierten 2001 den Terminus ‚Probiotika‘ als lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung einer adäquaten Menge dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen [32].

Das humane gastrointestinale Mikrobiom enthält eine Vielzahl an als ‚probiotisch‘ deklarierten Mikroorganismen. Probiotika erfüllen nach Sanders (2008) folgende Charakteristika: (1) Die Mikroorganismen sind gegenüber dem sauren pH-Wert des Magens und den Verdauungssäften der Gallenblase und dem Pankreassekret unempfindlich. (2) Die Besiedlung des Darms durch die Mikroorganismen ist zu dokumentieren. (3) Die Mikroorganismen sind aktiv. (4) Probiotika sind ‚sichere‘ Mikroorganismen. Sie rufen keine nachteiligen Effekte hervor [33].

Die vorteilhaften Effekte, die Probiotika auf das ‚Ökosystem Darm‘ ausüben können, sind vielfältiger Natur.

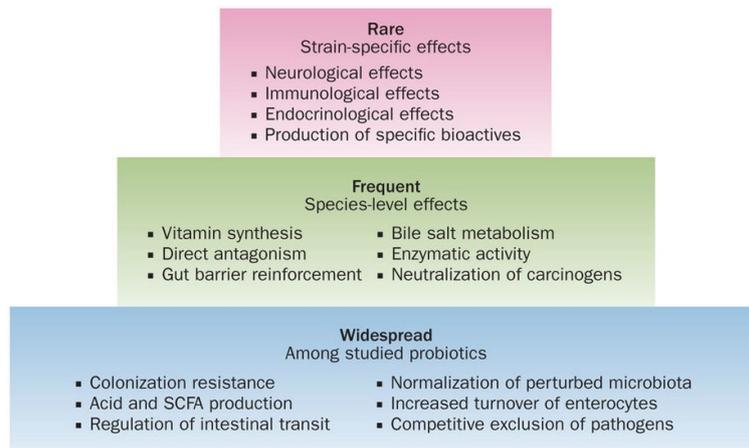


Abbildung 2 Funktionen probiotischer Mikroorganismen.

Zuordnung der Funktionen probiotischer Mikroorganismen nach dem Häufigkeitsgrad, mit den Einteilungen: selten, regelmäßig und weit verbreitet [32].

Abbildung 2 bietet einen Überblick über die vielfältigen Funktionen der Probiotika [32]. Für einen Großteil der untersuchten Probiotika sind die Funktionen der Kolonisierungsresistenz, der Säure- sowie *short chain fatty acids* (SCFA)-Produktion, der Unterstützung der Normalisierung eines gestörten Mikrobioms sowie des kompetitiven Ausschlusses von Pathogenen beschrieben. Weitere Fähigkeiten, die bestimmten Spezies zugeschrieben werden, sind die Synthese von Vitaminen, eine Stärkung der epithelialen Barriere und die Produktion von enzymatisch aktiven Substanzen. Seltene, Stamm-spezifische Effekte beschreiben die Wirkung auf Organe oder Systeme außerhalb des Gastrointestinaltraktes. Darunter fallen Wirkungen auf das Nerven- und Immunsystems sowie auf den hormonalen Haushalt [32].

In einer Metaanalyse klinischer Studien zur Wirksamkeit unterschiedlicher Probiotika konnte der positive Effekt auf die Prävention und Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen bestätigt werden. Für 6 von 8 Erkrankungen, darunter Pouchitis, Infektiöse Diarrhoe, Irritables Darmsyndrom (IDS), *Helicobacter pylori*- und *Clostridium difficile*-Infektion sowie Antibiotika-assoziierte Diarrhoe konnten bei 8 von 11 Spezies oder gemischten probiotischen Kulturen vorteilhafte Wirkungen dokumentiert werden [34].

Probiotika sind im Handel als Nahrungsmittelzusätze und als Bestandteile von fermentierten Lebensmitteln, z. B. in Sauerkraut und Jogurt, zu erwerben. Viele Nahrungsmittel werden weltweit mit dem Terminus ‚probiotisch‘ versehen. Dies geschieht häufig fälschlicherweise. Bei unbekannter Zusammensetzung der Bakterienkulturen kann keine Garantie für das Vorkommen von ausschließlich probiotischen Mikroorganismen gegeben werden [32]. In Apotheken oder Reformhäusern werden probiotische Mikroorganismen in Suspensionen, als Pulver oder Kautabletten und in Kapseln zum Verkauf angeboten. *Laktobazillen* sowie *Bifidobakterien* sind Vertreter der Gram-positiven Probiotika und werden häufig in kommerziell verfügbaren Präparaten, exemplarisch ProBio-Cult® (SYXYL) und SYMBIOLACT® (SymbioPharm GmbH), verarbeitet. Ein Gram-negativer Bakterienstamm *Escherichia coli* Nissle 1917 lässt sich als Kapsel oder Suspension mit dem Handelsnamen MUTAFLOR® (Ardeypharm GmbH) erwerben.

### **1.3.1. Laktobazillen**

*Laktobazillen* sind Gram-positive, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die auch in gekrümmten, coryneformen und kokkoiden Varianten vorkommen können. Die metabolische Eigenschaft durch Laktatdehydrogenase Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, in Laktat (= Milchsäure) umzuwandeln ist die namensgebende Eigenschaft der *Laktobazillen*. Die Produktion von Milchsäure durch die *Laktobazillen* führt zu einem pH-Abfall in der direkten Umgebung. *Laktobazillen* kommen im menschlichen Organismus in der Mundhöhle, dem Gastrointestinaltrakt und in der Vagina, dort bekannt als Döderlein-Bakterien, vor.

Eine Besonderheit der *Laktobazillen* ist deren Unabhängigkeit von Eisen. Als Kofaktoren verschiedener Enzyme nutzt diese Spezies Molybdän und Kobalt. Bei einer Infektion des Wirts und einem Anstieg des Akute-Phase-Proteins Ferritin zur Eisenspeicherung bleiben die *Laktobazillen* daher in ihrem Wachstum und ihrer Vitalität unbeeinflusst [35].

### **1.3.1.1. Probiotische Eigenschaften der Laktobazillen**

Der Wirtsorganismus profitiert durch die Präsenz von *Laktobazillen* aufgrund unterschiedlicher protektiver Eigenschaften der Probiotika. Studien bestätigten eine Wachstumsinhibition des Pathogens EAEC (enteroaggregativen *Escherichia coli*) durch drei ausgewählte *Laktobacillus* Stämme [36]. Neben dem inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Pathogene, zeigte *Lactobacillus acidophilus* RY2 eine Adhärenzinhibition des EAEC an Caco-2-Zellen [36]. Die Adhärenzinhibition weiterer Pathogene, *Enterococcus faecalis* und *Clostridium sporogenes*, konnte bei der Kolonisierung von Caco-2-Zellen durch *Lactobacillus plantarum* 423 mit einer Reduktion um 62 % (*E. faecalis*) und 74 % (*C. sporogenes*) gezeigt werden [37]. Andere *Laktobacillus* Stämme, unter anderem *Lactobacillus casei* DN-114, zeigten keine Reduktion der Anzahl adhärenter Pathogene. *L. casei* DN-114 führt jedoch zur Stabilisierung einer durch T84-Zellen gebildeten Epithelbarriere nach einer Infektion mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) sowie einer Umverteilung des zytoplasmatischen *Tight Junction*-assoziierten Moleküls Zonula occludens 2 [38]. Dieser Effekt auf die Stabilität des gastrointestinalen Epithels und die damit reduzierte parazelluläre Permeabilität konnte auch für die Zelllinien HT29 und Caco-2 gezeigt werden [39]. Eine Studie untersuchte den Einfluss verschiedener *Laktobacillus* Spezies auf die Adhärenz und Kolonisation sowie die Internalisierung enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC). Ein reduktiver Effekt konnte ausschließlich für den untersuchten *Lactobacillus rhamnosus* Stamm im Internalisierungs-Test dokumentiert werden. Eine Adhärenz- und Kolonisationinhibition wurde bei keinem der *Laktobazillen* protokolliert. Es wird angenommen, dass die Modifikation intrazellulärer Signalwege, angestoßen durch die Interaktion zwischen dem Probiotikum und der Epithelzelle, zu einem veränderten Internalisierungsverhalten führt [40].

### **1.3.1.2. *Lactobacillus rhamnosus***

Die Spezies des *Lactobacillus rhamnosus* wurde zuerst von Hansen (1968) und anschließend von Collins et al. (1989) beschrieben. Die Fähigkeit das Monosaccharid Rhamnose abbauen zu können ist namensgebend. *Lactobacillus rhamnosus* bildet gemeinsam mit *Lactobacillus reuteri* die im Urogenitaltrakt der Frau am häufigsten vertretene Spezies. Einige *Lactobacillus rhamnosus* Stämme konnten den Probiotika zugeordnet werden.

Der *Lactobacillus rhamnosus* GG wurde 1983 aus dem Gastrointestinaltrakt eines gesunden Menschen isoliert und bildet heute den am häufigsten untersuchten Stamm der *L. rhamnosus* Spezies mit mehr als 800 veröffentlichten Studien. Die Bezeichnung ‚GG‘ stammt von den Wissenschaftlern Sherwood Gorbach and Barry Goldin [41].

Charakteristika des *Lactobacillus rhamnosus* GG sind die Stabilität gegenüber den pH-Wert-Schwankungen des Magensafts, der Gallenflüssigkeit und des Pankreassekrets [42] sowie die Produktion von Milchsäure und die Adhärenz an intestinalen Epithelzellen [43]. Die Kolonisation des Verdauungstrakts und der stabilisierende Einfluss auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms wurde beschrieben [44]. Die genannten Eigenschaften ermöglichen formal die Zuordnung der *Lactobacillus rhamnosus* GG zur Klasse der Probiotika.

Eine Metaanalyse zur Effektivität der probiotischen Therapie von akuten Gastroenteritiden mit *Lactobacillus rhamnosus* GG zeigte eine Reduktion der Dauer der Diarrhoe. Eine Dosis von mehr als  $10^{10}$  Bakterien pro Tag führte zu einer höheren Wahrscheinlichkeit von der Behandlung zu profitieren im Vergleich zu niedrigeren Bakterienzahlen [45]. Über den Gastrointestinaltrakt hinaus zeigen Studien das Potential des *Lactobacillus rhamnosus* GG auf, Inzidenzen für Infektionen des Respirationstrakts und Mittelohrentzündungen (Otitis media) sowie den Verbrauch von Antibiotika bei Kindern zu senken [46]. Im Mausmodell konnte die Entwicklung einer nicht-alkoholischen Steatosis hepatis (Fettleber-Erkrankung) durch die Therapie mit *Lactobacillus rhamnosus* GG verhindert werden [47]. Weitere Studien stützen die Annahme der probiotischen Fähigkeiten des *Lactobacillus rhamnosus* GG [48,49].

#### 1.4. Humanpathogene *Escherichia coli*

Pathogene Spezies der *Escherichia coli* werden anhand ihres Pathomechanismus verschiedenen Untergruppen zugeordnet. Neben dem enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) lassen sich enterotoxische (ETEC), enterohämorrhagische (EHEC, STEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), adherent-invasive (EAIC) und diffus-adhrierende (DAEC) *Escherichia coli* voneinander abgrenzen. Zusätzlich zu diesen intestinal-pathogenen Pathotypen gibt noch eine große Gruppe extraintestinal-pathogener *E. coli* wie z. B. die harnwegspathogenen *E. coli* (UPEC) oder die Erreger der neonatalen Meningitis (NMEC).

Enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC) sind charakterisiert durch ihre, durch Fimbrien vermittelte, Adhärenz. Die Produktion von Enterotoxinen und deren Ausschüttung führt zum Auftreten von Krankheitsbildern, wie der Reisediarrhoe oder der leukozytenfreien Diarrhoe. Der enteroinvasive *E. coli* (EIEC) führt zu einer Infektion von Kolonepithelzellen, von denen er mittels Endozytose aufgenommen wird. Das infizierte Darmepithel geht zugrunde. Der Stuhl zeigt sich blutig-schleimig und leukozytenreich. Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind charakterisiert durch die Produktion eines *Shiga-like Toxins* (Stx), das auch als Verotoxin bezeichnet wird. Das Verotoxin ist ein Exotoxin, welches ins Blut und darüber in die Nierenglomeruli gelangen kann. Dort führt es zum Untergang der Endothelzellen und durch ein Einschwellen von Thromben zum Verschluss von Kapillaren. EHEC produziert

Hämolyse, welches die Erythrozyten im Blut zerstört. Bei dieser Symptomkombination spricht man von dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Der häufigste Serotyp des enterohämorrhagischen *E. coli* ist EHEC O157:H7 [50].

Die Differenzierung der verschiedenen Pathotypen erfolgt klinisch durch spezifische Gennachweise. Die Entscheidung für oder gegen eine Antibiotika-Therapie fällt aufgrund des Pathotyps. Infektionen mit NMEC erfordern eine sofortige Applikation eines Antibiotikums, während eine Antibiotika-Therapie bei EHEC/STEC durch die folgende Toxinfreisetzung absolut kontraindiziert ist. Bei einer Diarrhoe, hervorgerufen durch *E. coli*, ist eine Antibiotika-Therapie klassisch nicht indiziert. Eine Rehydratationstherapie mit isotonischen Lösungen kompensiert den Wasser- und Elektrolytverlust. Diese kann vor allem bei Kleinkindern notwendig werden [50].

#### **1.4.1. Enteropathogene *Escherichia coli***

Der enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) wurde vor ca. 80 Jahren als erstes Pathovar von *Escherichia coli* beschrieben, das für eine Erkrankung des Menschen verantwortlich ist [51]. EPEC sind durch das Vorkommen von drei Eigenschaften definiert: (1) Sie besitzen die Fähigkeit eine Durchfallerkrankung auszulösen. (2) Die Bildung einer speziellen Histopathologie, in Form von *Attaching and Effacing Lesions* (A/E lesion), ist charakteristisch. (3) Sie bilden kein Stx [52].

Eine Untergruppierung des enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) erfolgt anhand der Präsenz des Virulenzplasmids EAF (*EPEC adhesion factor*). EPEC, die das EAF-Plasmid besitzen, werden als typische bzw. lokal-adhärierende (LA-EPEC) klassifiziert. In atypischen Erregern liegt es dementsprechend nicht vor [52].

*In vitro* sowie *in vivo* zeigen enteropathogene *Escherichia coli* charakteristische Adhärenzmuster. Die Bildung von Mikrokolonien, in Form von dichten dreidimensionalen Bakterienansammlungen, beschreibt die Eigenschaft der *localized adherence* des intestinalen Erregers [53-57]. Die Infektion des intestinalen Epithels führt zum Auftreten von A/E-Läsionen. Der Ausdruck *Attaching and Effacing* (A/E) *lesions* beschreibt die mikroskopisch erkennbaren Strukturveränderungen, hervorgerufen durch das Pathogen [58]. Neben der Bildung von Podest-artigen Strukturen entwickeln sich Pseudopodien, Ausstülpungen des eukaryotischen Zellplasmas [59]. Das *Effacement* (z. Dt. Ausradieren, Auslöschen) beschreibt den Verlust der Mikrovilli auf der apikalen Membran der Wirtszelle [60]. Die Mikrovilli sind essenzielle Strukturen des Gastrointestinaltrakts, die zur Vergrößerung der Membranoberfläche um den Faktor 20 beitragen [2]. Die Größe der Membranoberfläche beeinflusst die Resorptionsfähigkeit der Darmschleimhaut. Ein Verlust der Mikrovilli führt zur Reduktion der Resorptionsfähigkeit. Die Folge ist, ebenfalls bedingt durch die Auflockerung der dichten Zell-Zell-Kontakte und dem damit verbundenen Flüssigkeits- und Elektrolytverlust [61], eine wässrige Konsistenz des Darminhalts [62].

#### **1.4.1.1. Klinische Manifestation einer EPEC-Infektion**

Eine gastrointestinale Infektion, ausgelöst durch einen Erreger der enteropathogenen *E. coli* (EPEC), schädigt das Epithel des Dünndarms [50] und führt zu wässrigem Durchfall. Der Stuhl kann Schleim enthalten, ist jedoch frei von Blut [62]. Als Begleitsymptome können Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit und Fieber auftreten. Die Inkubationszeit beträgt ein bis drei Tage und die Beschwerden dauern in der Regel mehrere Tage an. Eine Persistenz des Krankheitserregers kommt vermehrt in Entwicklungsländern vor und führt zu einer chronischen Diarrhoe [63]. Vor allem Kinder und Neugeborene sind anfällig für die Infektion durch das Pathogen. Daher ist diese auch als Säuglingsdiarrhoe bekannt [50]. In erwachsenen Individuen konnten experimentell in Freiwilligen die Symptome einer Diarrhoe durch Inokulation mit  $10^8$  bis  $10^{10}$  Bakterien ausgelöst werden [64].

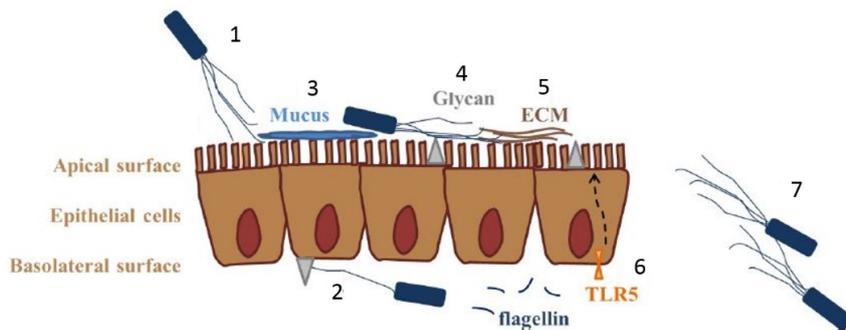
#### **1.4.1.2. Morphologie**

Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 ist der von vielen Laboratorien eingesetzte Prototyp eines enteropathogenen *E. coli*. Der Serotyp O127:H6 beschreibt die Antigeneigenschaften des Pathovars. Nach dem auf *E. coli* übertragenem Kauffmann-White Schema wird das Antigen des Lipopolysaccharid-Layers mit O bezeichnet. H steht für das Flagellin-Molekül, aus welchem das Filament der Flagellen aufgebaut ist [50].

##### **1.4.1.2.1. Flagellen**

Flagellen sind Oberflächenstrukturen von bis zu 10  $\mu\text{m}$  Länge mit einem Durchmesser von 20 nm. Mehr als 60 strukturelle und regulatorische Proteine sind am Aufbau eines Flagellums beteiligt. Ein Sekretionssystem und ein Basalkörper sind in den Zellmembranen eingebettet. Das Filament, ein Flagellin-Polymer, ist über einen Haken mit dem Basalkörper verbunden. Das Sekretionssystem sezerniert die extrazellulär beteiligten Proteine [65].

Flagellen verleihen dem Bakterium Motilität [66]. Durch Rotation des Filaments, ausgelöst durch Ionen-Ströme über die zytoplasmatische Membran, bewegt sich das Bakterium gezielt in eine Richtung [67]. Zusätzlich wurden sensorische Eigenschaften der Flagellen beschrieben. Sie besitzen die Fähigkeiten die chemische Zusammensetzung und Temperatur der Zellumgebung zu detektieren [66]. Eine gerichtete Bewegung – sich Nährstoffen nähernd, beziehungsweise von toxischen Substanzen entfernend – wurde beobachtet [67]. Neben der lokomotorischen und sensorischen Eigenschaften verleihen die Flagellen dem Bakterium die Fähigkeit zur Adhäsion [65]. Abbildung 3 fasst die adhäsiven Fähigkeiten der Flagellen an unterschiedliche Komponenten zusammen.

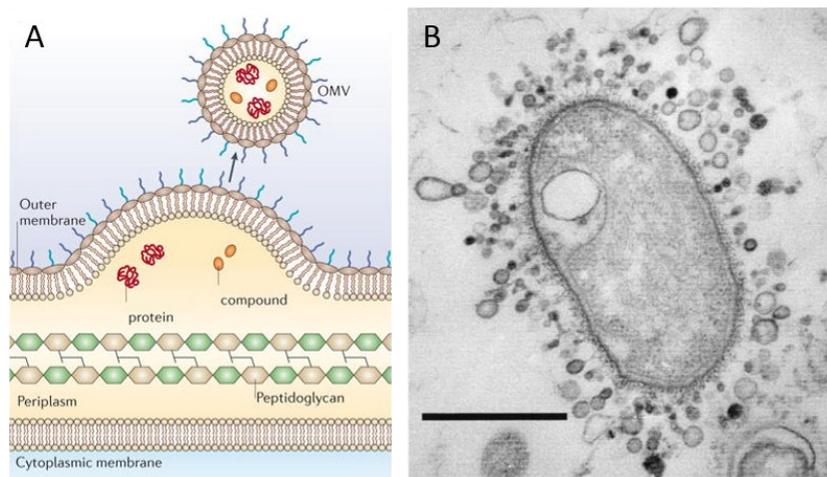


**Abbildung 3** Adhäsive Eigenschaften von Flagellen.

Flagellen ermöglichen den Bakterien über verschiedene Mechanismen eine Adhärenz an eukaryotische Zellen. Eine direkte Bindung an die Epithelzelle kann apikal (1) und basolateral (2) erfolgen. Von den Epithelzellen sezernierte Bestandteile, so wie (3) Mukus und Muzine, (4) Glykane und (5) Proteine der extrazellulären Matrix können mittels spezifischer Rezeptoren von Flagellen erkannt und gebunden werden. Das Flagellenprotein FliC wird durch den Toll-like Rezeptor 5 (TLR5) gebunden – entweder basolateral oder nach Translokation des TLR5 von der basolateralen an die apikale Zellmembran (6). Neben der Bindung an Epithelien ist die Verbindung zweier Bakterien gleicher oder unterschiedlicher Spezies (7) beschrieben worden. Modifiziert nach [65].

#### 1.4.1.2.2. Outer membrane vesicles (OMVs)

Das Abschnüren von Teilen der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien wird von einigen Autoren auch als *type-zero-secretion* (TOSS) bezeichnet [68]. Dabei entstehen sogenannte *outer membrane vesicles* (OMVs) (s. Abbildung 4). Die OMVs besitzen einen Durchmesser von 10 bis zu 300 nm [69,70]. Die Membran der OMVs besteht aus Proteinen, Lipopolysacchariden und Phospholipiden der äußeren Zellmembran des Bakteriums. Die OMVs enthalten Bestandteile des periplasmatischen Raums [69].



**Abbildung 4** Outer membrane vesicles (OMVs).

(A) Schema der Produktion von *outer membrane vesicles* (OMVs). Modifiziert nach [71]. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines unbekannten Gram-negativen Bakteriums. Das Bakterium besitzt eine Mikrokapsel und produziert große Mengen von *outer membrane vesicles* (OMVs) unterschiedlicher Größe. Maßstabsbalken = 1 µm [69].

OMVs können die Pathogenität fördern, ermöglichen ein Überleben der Bakterien in Stresssituationen und regulieren die Interaktion innerhalb einer Bakterienpopulation [71]. Durch die Stabilität der Strukturen können die OMVs weiter entfernte Zielstrukturen erreichen und erweitern so den Interaktionsradius der Bakterien mit ihrer Umgebung. Die Membran der OMVs vermittelt den Fracht Schutz vor proteolytischem Abbau [70]. Oberflächenmoleküle der Membran können durch Interaktion mit Rezeptoren spezifischer Wirtszellen eine gezielte Aufnahme vermitteln, sogenanntes *host-cell-targeting*. Die sich nicht replizierenden Abbilder der bakteriellen Oberfläche können durch endozytotische Mechanismen zum Einschleusen von aktiven Komponenten in die Zielzelle führen. Eine Modulation der Immunantwort kann die Folge sein [70]. Eine Studie zeigte protektive Eigenschaft der OMVs, isoliert aus *Escherichia coli* MG1655 Kulturüberständen, gegenüber Membran-aktiven Antibiotika, wie Colistin und Melittin. Die eigene Spezies (*E. coli* MG1655) sowie *P. aeruginosa* NCTC6751 und *A. radiodiorresistens* MMC5 wurden durch die OMVs vor der Wachstumsinhibition der Antibiotika bewahrt [72].

Die Vakzinierung stellt eine therapeutische Option zur Immunisierung eines Organismus dar. Studien zeigen, dass auch die Injektion von OMVs einen Schutz vor der entsprechenden Bakterienart bietet. Im Falle der Studie zur Immunogenität von *Leptospira interrogans* äußeren Membranvesikeln wurde im Hamstermodell eine erhöhte humorale Immunantwort nach Verabreichen der OMVs aufgezeigt, die die Überlebensrate erhöhen und die bakterielle Belastung verringern konnte [73].

#### **1.4.1.3. Genetik**

Der typische enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) ist charakterisiert durch die Präsenz eines Adhärenz-vermittelnden Virulenzplasmids. Das extrachromosomale Element, mit einer Größe von 55 bis 70 MDa, wird als *EPEC adherence factor* (EAF) Plasmid bezeichnet [56]. Das genetische Material des EPEC E2348/69 (s. Abbildung 5) verteilt sich auf einem ringförmigen Chromosom (A) und zwei Plasmiden (B). Die für die Virulenz des EPEC essenziellen genetischen Elemente liegen neben dem LEE (*locus of enterocyte effacement*) auch außerhalb des Locus (*non-LEE-encoded* = Nle) auf dem bakteriellen Chromosom sowie dem pMAR2, dem EAF Plasmid.

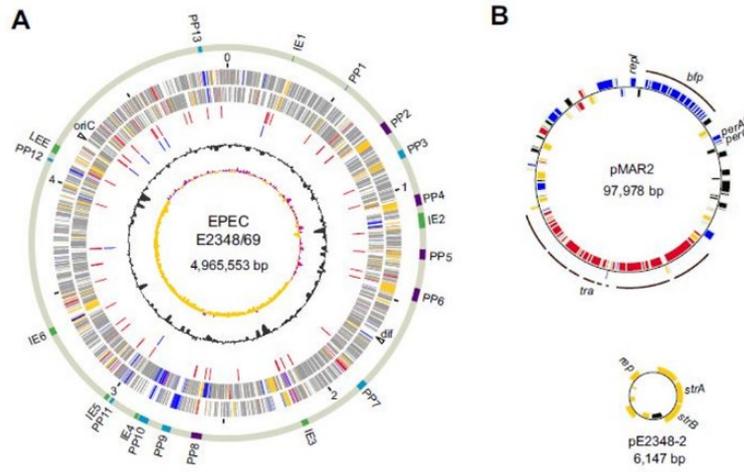


Abbildung 5 Chromosom (A) und Plasmide (B) des EPEC E2348/69.

Genetisches Material des EPEC E2348/69: (A) ringförmiges Chromosom, (B) pMAR2, dem EAF-Plasmid, und einem 6,147 KBP großen, Resistenzgen-tragenden Plasmid [51].

Das *bfp*-Gen, codierend für *bundle-forming pili*, sowie der *per* (*plasmid-encoded regulator*)-Locus, codierend für transkriptionskontrollierende Elemente, liegen auf dem EAF-Plasmid (s. Abbildung 5B) [74]. Der LEE (*locus of enterocyte effacement*) stellt eine Pathogenitätsinsel mit 35,6 KBP dar (s. Abbildung 6) und liegt auf dem ringförmigen Chromosom des EPEC. Der Locus ist unterteilt in fünf Operons, LEE 1 bis 4 und Tir (in Abbildung 6 nicht gekennzeichnet), und umfasst 41 Gene [75]. Die Präsenz der Pathogenitätsinsel allein befähigt zur Bildung von *Attaching and Effacing (A/E) lesions* [76]. Die gelb hinterlegten Gene in Abbildung 6 bilden Teile des TTSS (syn. T3SS), Chaperone und Regulatoren; rot gekennzeichnete codieren Effektorproteine.

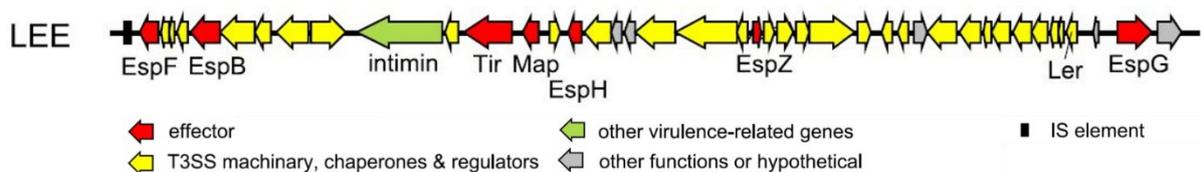


Abbildung 6 Der LEE (*locus of enterocyte effacement*) des EPEC E2348/69.

Der LEE (*locus of enterocyte effacement*) umfasst 41 Gene, unter anderem codierend für Effektorproteine, Bestandteile des TTSS, Chaperone und Regulatoren sowie andere Virulenz-assoziierte Gene. Modifiziert nach [51].

Die Effektorproteine des enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) lassen sich zwei Gruppen zuordnen. Die Effektormoleküle EspA, EspB und EspD stellen Komponenten des extrazellulären Translokationsapparats, dem *Type III secretion system* (TTSS), dar. Die Proteine Tir, EspB, EspF, EspG und Map zählen zu den in die Wirtszelle translozierten Molekülen [62,77].

#### **1.4.1.4. Regulationsmechanismen der Virulenz des Pathogens**

Regulatorische Genelemente befinden sich auf der Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) sowie im EAF-Plasmid. Das *ler* (*LEE-encoded regulator*)-Gen und das *per* (*plasmid-encoded regulator*)-Gen sind für die Expression der Virulenzgene existenziell. Die Präsenz von Ler ermöglicht die Transkription und Translation der LEE-codierten Gene und Per ist für die Expression von BFP verantwortlich [78]. Für Per ist, zusätzlich zur Regulation von BFP, ein Einfluss auf die Expression des LEE 1-Operons und somit von Ler beschrieben [74].

Die Anwesenheit von eukaryotischen Zellen oder eine Änderung der Zusammensetzung des Wachstumsmediums können zu Anpassungsreaktionen des Pathogens führen. Die Anzucht von EPEC E2348/69 in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) führt zur gesteigerten Virulenzgenexpression [79]. Unterschiedliche Bedingungen, unter anderem Veränderungen des pH-Werts, der Temperatur und der chemischen Zusammensetzung der Umgebung, und deren Einfluss auf die Regulation des TTSS wurden untersucht [80].

Der Prozess des *Quorum sensings* ist ein Mechanismus für die Regulation der Virulenzeigenschaften des EPEC. Das *Quorum sensing* beschreibt eine Geninduktion durch die Präsenz des *autoinducer-2* (AI-2), produziert von der bestehenden Bakterienpopulation [81]. Die Produktion des AI-2 erfolgt durch diverse Bakterienspezies. AI-2 ist der Vermittler einer intra- sowie interspezifischen Kommunikation [82]. Der AI-2 induziert die Expression der LEE-Operons direkt oder indirekt, über die Produktion von Ler. AI-2 wird von Bakterien in die Umgebung sezerniert. Die akkumulierte Menge gibt Auskunft über die bakterielle Besiedlung des Organs. Eine höhere Bakterienkolonisation, wie die des Dickdarms, bietet eine günstige Umgebung für die Infektion durch pathogene Keime [81].

#### **1.4.1.5. Das Type III secretion system (TTSS)**

Im folgenden Abschnitt wird auf den Aufbau des *Type III secretion systems* des EPEC eingegangen. Abbildung 7A zeigt ein Modell des Translokationsapparats. Das TTSS besteht aus einem Basalkörper und einem Nadelstück. Der Basalkörper ist in der inneren sowie äußeren Zellmembran verankert und über den *Neck part* (z. Dt. Verengung) mit der Nadelstruktur verbunden. Die Nadelstruktur befindet sich in dem Extrazellularraum und kann mit ihrer Spitze mit der Wirtszelle in Kontakt treten. In Abbildung 7B stellt sich schematisch der Entwicklungsprozess dar. Zu Beginn kommt es zum Einbau des inneren und äußeren Ringes in die jeweilige Zellmembran. Anschließend polymerisiert das Protein EscF und lagert sich den Ringstrukturen an. Durch das entstandene Sekretionssystem wird EspA in den Extrazellularraum sezerniert und die Formation der Nadelstruktur findet statt. Die Länge der Nadel ist abhängig von

der Menge des sezernierten EspA. In Abbildung 7C zeigen sich TTSS des EPEC in unterschiedlichen Längen des Nadelstücks von 32 bis 688 nm in der Elektronenmikroskopie [83].

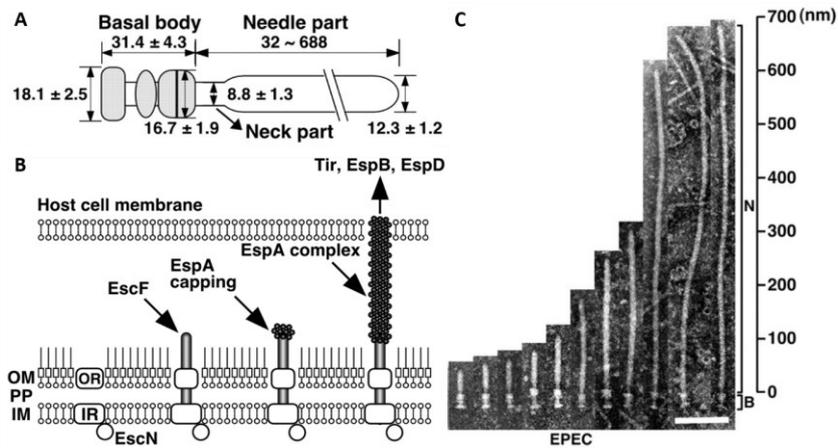


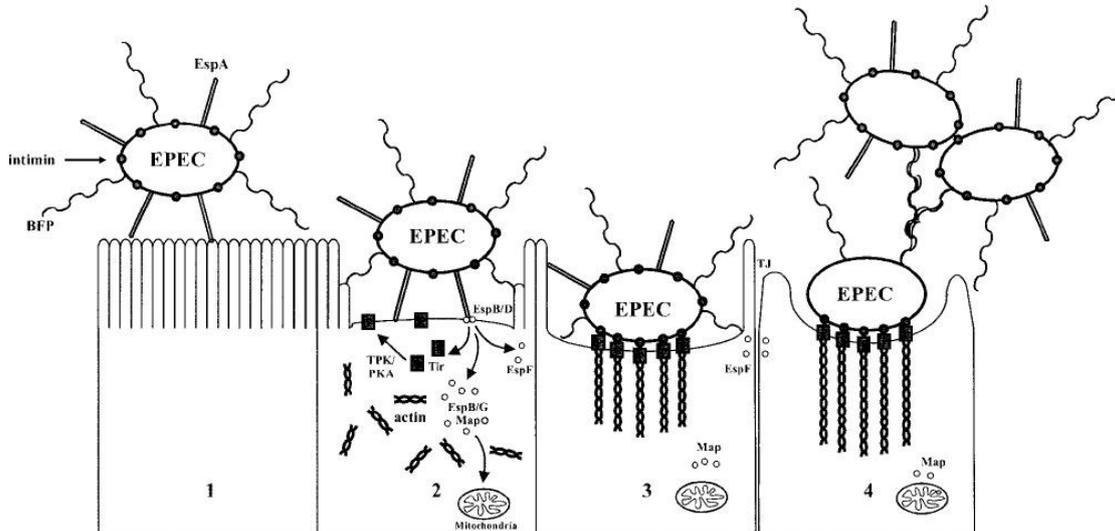
Abbildung 7 Das *Type III secretion system* (TTSS) des EPEC.

(A) Schematischer Aufbau des TTSS, bestehend aus Basalkörper und Nadelstück. Längenangaben in nm. (B) Schematische Darstellung des Formationsprozesses des TTSS. (C) Anordnung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von TTSS unterschiedlicher Länge. B = Basalkörper, N = Nadelstruktur, Maßstabsbalken = 100 nm [83].

Durch das TTSS erfolgt die Injektion der Effektorproteine Esp (für: *Escherichia coli secreted proteins*) in das Zytosol der Wirtszelle. EspB und EspD sind an der Porenbildung in der Zellmembran beteiligt [84]. EspB wird ebenfalls in die Wirtszelle abgegeben, Tir gelangt in die Wirtszellmembran. Die Effektorproteine beeinflussen intrazelluläre Prozesse.

### 1.4.1.6. Pathogenese der Infektion von gastrointestinalen Epithelzellen mit EPEC

Die Infektion des intestinalen Epithels durch den enteropathogenen *Escherichia coli* lässt sich nach Clarke et al. (2003) in vier Stadien unterteilen (s. Abbildung 8).



**Abbildung 8** Die vier Stadien der Pathogenese einer EPEC-Infektion.

(1) EPEC präsentiert BFP, Intimin und EspA auf der Bakterienzelloberfläche und nähert sich dem Epithel. (2) Die Adhärenz an die Wirtszelle, hervorgerufen durch die Strukturen BFP und EspA, ist erfolgt. Über das *Type III secretion system* injiziert das Pathogen seine Effektormoleküle (EspB/G, EspF, Map, Tir) und induziert dadurch den Ablauf intrazellulärer Prozesse. Eine Reduktion der Mikrovilli der eukaryotischen Zelle ist erkennbar. (3) Eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt zu Aggregation des Aktins unterhalb des adhärenen Pathogens. Die Verbindung des *Translocated intimin receptors* und seinem Substrat Intimin ist erfolgt und führt zu einer engen Verbindung von Bakterium und eukaryotischer Wirtszelle. (4) Die Aktin-Kondensation schreitet weiter voran. Die Stabilität der *Tight Junctions* nimmt ab und über BFP aggregiert das Bakterium mit weiteren seiner Spezies [61].

Stadium 1 beschreibt den Zustand des EPEC Bakteriums, in dem *bundle forming pili* (BFP), das Adhäsin Intimin und das *Type III secretion system* (TTSS), mit der EspA-Nadelstruktur, auf der bakteriellen Oberfläche präsentiert sind. BFP sind adhäsive Oberflächenstrukturen, die eine Autoaggregation [62] (St 4) sowie eine Bindung an die Wirtszellmembran (St 2,3) über das Membranlipid Phosphatidylethanolamin ermöglichen [85]. Nach BFP und EspA vermittelter Adhärenz (St 2,3) werden in Stadium 2 durch das TTSS des Pathogens unter anderem die Effektormoleküle Tir, EspB/G, EspF und Map in das Zytosol der Wirtszelle injiziert. Die Effektormoleküle modifizieren intrazelluläre Prozesse: Map führt zu mitochondrialen Schäden, EspF lockert die Stabilität der *Tight Junctions* (TJ), die Epithelbarriere erhaltende Zell-Zell-Kontakte [86], Tir (*Translocated intimin receptor*) wird in die Wirtszellmembran transloziert und ermöglicht dort die Bindung des membranständigen Adhäsins Intimin. Der enge Kontakt, hervorgerufen durch Tir und Intimin, führt zu einer Annäherung der Zelloberflächen von Bakterium und Wirtszelle. Intrazelluläre Signalwege, ausgehend von dem membranständigen Rezeptor Tir führen zu einer Reorganisation des Zytoskeletts. Mikrovilli gehen zu Grunde und eine Kondensation

von Aktinfilamenten lässt sich unterhalb des EPEC in Abbildung 8 (St 3,4) durch die Bildung von Kettenstrukturen zunehmender Länge erkennen. Hervorgerufen durch das Effektormolekül EspF, wird die Integrität der *Tight Junctions* gestört [86]. Die epitheliale Barriere wird destabilisiert, erkenntlich durch die Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER = *transepithelial electrical resistance*) [87]. Es folgt ein Elektrolyt- und Wasserverlust durch parazellulären Transport [61].

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Vorschreiten der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen stellt eine dramatische Entwicklung in der Therapie von bakteriellen Infektionen dar. Die daraus folgende Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten führt zur Forderung nach alternativen Strategien. Der Einsatz probiotischer Bakterienstämme in der Prophylaxe und Therapie von Infektionen des menschlichen Organismus erweckt großes Forschungsinteresse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 und die Adhärenz am gastrointestinalen Epithel untersucht. Dazu werden in einem Zellkulturmodell verschiedene Inkubations- und Infektionsszenarien und deren Auswirkung auf die Expression von Virulenzeigenschaften sowie die Modulation der Adhärenz der Bakterien an unterschiedliche humane Epithelzelllinien untersucht und analysiert.

Vorangestellt wird eine Analyse des Pathogens EPEC E2348/69 unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zur Evaluation der beeinflussenden Faktoren.

# Kapitel 2

## Material

### 2.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
Enteropathogener <i>Escherichia coli</i> E2348/69	Serotyp O127:H6	Iguchi et al., 2009
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65		Winlove Probiotics B.V. (Amsterdam, NLD)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1121		Pharma-Zentrale GmbH (Herdecke, GER)

### 2.2. Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Verwendete eukaryotische Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
T84	Humane Epithelzellen der Lungenmetastase eines kolorektalen Karzinoms, adhären.	ATCC-Nr. CCL-248
HT29	Humane Epithelzellen eines kolorektalen Adenokarzinoms, adhären.	ATCC-Nr. HTB-38

### 2.3. Kulturmedien, Reagenzien und Puffer

#### 2.3.1. Kulturmedien und Reagenzien für die Kultivierung von Bakterien

##### 2.3.1.1. Kulturmedien für die Kultivierung von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Kultivierung von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69 sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Kulturmedien wurden nach dem Ansetzen autoklaviert.

Tabelle 3      Verwendete Kulturmedien zur Kultivierung von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69.

Medium	Komponente	Menge
Flüssigkultur in Luria-Bertani (LB)-Lennox-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
Kultur auf LB-Agar-Platten	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	15 g/l

### 2.3.1.2. Kulturmedien für die Kultivierung von *Lactobacillus rhamnosus*

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien und Reagenzien zur Kultivierung von *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4      Verwendete Kulturmedien und Reagenzien zur Kultivierung von *Lactobacillus rhamnosus*.

Medium/Reagenz	Beschreibung	Hersteller
<i>Lactobacillus</i> -Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS)	52,2 g/l	Merck Millipore (Massachusetts, USA)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10 % (w/v) in dH <sub>2</sub> O	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)

Das Kulturmedium sowie das Reagenz wurden nach dem Ansetzen durch eine semipermeable Membran (Ø 0,45 µm) steril filtriert.

Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Kulturmediums zur Anzucht von *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5      Zusammensetzung des Kulturmediums zur Kultivierung von *Lactobacillus rhamnosus*.

Medium	Komponente	Menge
Kulturmedium für <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i> -Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS)	10 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (10 %)	10 % (v/v)

### 2.3.2. Kulturmedien, Reagenzien und Puffer für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien und Reagenzien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6      Verwendete Kulturmedien und Reagenzien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen.

Medium/Reagenz	Beschreibung	Hersteller
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMEM-high glucose	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Fetales Rinderserum, steril filtriert	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pen/Strep (100 x)	Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Cölbe, GER)
Trypsin/EDTA (10 x)	0,5/0,2 % (w/v) in PBS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Extracellular Matrix Basement Membrane (ECM)	Extrazelluläre Matrix Basalmembran	Harbor Bio-Products (Norwood, MA, USA)

Die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7      Zusammensetzungen der Kulturmedien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen.

Medium	Komponente	Menge
Kulturmedium für T84-Zellen	DMEM/F-12	500 ml
	Fetal Bovine Serum (FBS)	5 % (v/v)
	Pen/Strep (100 x)	1 % (v/v)
Infektionsmedium für T84-Zellen	DMEM/F-12	500 ml
	Fetal Bovine Serum (FBS)	5 % (v/v)
	Pen/Strep (100 x)	1 % (v/v)
Kulturmedium für HT29-Zellen	DMEM-high glucose	500 ml
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)
	Pen/Strep (100 x)	1 % (v/v)
Infektionsmedium für HT29-Zellen	DMEM-high glucose	500 ml
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8      In der Zellkultur verwendete Puffer.

Puffer	Hersteller
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (D-PBS) + Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (D-PBS) - Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

## 2.4. Proteingrößenstandard

Der in dieser Arbeit zur SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendete Proteingrößenstandard „Protein Marker VI (10-245) prestained“ wurde von AppliChem (Darmstadt, GER) bezogen. Unter Verwendung eines 4-20%igen Tris-Glycin-Laufpuffers werden Proteingrößen von 11 bis 245 kDa dargestellt.

## 2.5. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9      Verwendete Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller/Referenz
<i>Primäre Antikörper</i> : anti- :			
bfpA	WB 1 : 1.000	Antiserum eines Kaninchens gegen rekombinantes Pre-Bundlin aus EPEC E2348/69	Donnenberg et al., 1992
Claudin-1	IF 1 : 200	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Claudin-1	Abcam (Cambridge, GBR)
EspD	WB 1 : 1.000	Antiserum der Maus gegen EspD Maus #11, 2.BE v. 21.04.2004	Institutsbestand
GAPDH (GA1R)	WB 1 : 1.000	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen rekombinantes GAPDH	ThermoFisher Scientific (Rockford, USA)
JAM-A/JAM-1	IF 1 : 100	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen rekombinantes JAM-A/JAM-1	Santa Cruz (Dallas, USA)
O127	IF 1 : 50	Antikörper aus dem Kaninchen gegen O127 von <i>Escherichia coli</i>	Prof. Dr. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg
Tir	WB 1 : 1.000	Antiserum der Maus gegen Tir Maus #7, 3.BE v. 13.02.2006	Institutsbestand
ZO-2	IF 1 : 250	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen ZO-2	Santa Cruz (Dallas, USA)

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller/Referenz
<i>Sekundäre Antikörper</i>			
GAM-FITC	IF 1 : 500	Antikörper aus der Ziege gegen F <sub>c</sub> -Teil von Antikörper aus der Maus, FITC-konjugiert	Immunotech Laboratories Inc. (Monrovia, USA)
GAM-PO	WB 1 : 10.000	Antikörper aus der Ziege gegen Maus-IgG	Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, USA)

GAR-AlexaFluor 647	IF 1 : 50	Antikörper aus der Ziege gegen F <sub>c</sub> -Teil von Antikörper aus dem Kaninchen, AlexaFluor 647-konjugiert	Prof. Dr. Peter Schierack, BTU Cottbus-Senftenberg
GAR-FITC	IF 1 : 500	Antikörper aus der Ziege gegen F <sub>c</sub> -Teil von Antikörper aus dem Kaninchen, FITC-konjugiert	Dianova GmbH (Hamburg, GER)
GAR-PO	WB 1 : 10.000	Antikörper aus der Ziege gegen IgG aus Kaninchen	Cell Signalling Technology (Danvers, USA)
RAG-FITC	IF 1 : 500	Antikörper aus Kaninchen gegen F <sub>c</sub> -Teil von Antikörper aus der Ziege, FITC-konjugiert	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

## 2.6. Primer

Die in dieser Arbeit zur quantitativen *real-time*-PCR (qRT-PCR) verwendeten Oligonukleotide wurden durch Eurofins Genomics (Ebersberg, GER) hergestellt und sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Verwendete Primer.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
rrsB_left	TCC CTA GCT GGT CTG AGG G	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
rrsB_right	CGT AGG AGT CTG GAC CGT GT	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
bfpA_left	GAT TGA ATC TGC AAT GGT GCT	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
bfpA_right	TAA AAC ATC ACA CCT GCG GTA	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
eae_left	GGC GAT TAC GCG AAA GAT AC	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
eae_right	GAT TAA CCT ATG CCG TTC CA	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
EspD_left	AAA TAA CGA TAT CCA GTC TGT GAG G	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)
EspD_right	TTA ATA CCT GAA GTA GCC GTA GCA	Eurofins Genomics (Ebersberg, GER)

## 2.7. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Lysozym	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Proteinase K	Roche (Basel, CHE)

## 2.8. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12 Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Serva (Heidelberg, GER)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, GER)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva (Heidelberg, GER)
<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (ECL) Western Blot-Substratlösung SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Essigsäure	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Ethanol 70 %	Merck KGaA (Darmstadt, GER)
Fluorescence Mounting Medium	Dako (Hamburg, GER)
Magermilchpulver	Serva (Heidelberg, GER)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Trident femto Western HRP Substratlösung	GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Triton X-100	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

## 2.9. Fluoreszenzkonjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzkonjugate sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13 Verwendete fluoreszenzkonjugierte Substrate.

Fluoreszenzkonjugat	Hersteller
DRAQ5	Biostatus (Loughborough, GBR)
DAPI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Phalloidin Atto 488	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

## 2.10. Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14      Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)	Takara Bio USA Inc. (Mountain View, CA, USA)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden, GER)
RNeasy Protect Bacteria Mini Kit	Qiagen (Hilden, GER)
RT <sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix	Qiagen (Hilden, GER)

## 2.11. Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15      Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Blotting Paper	Hahnemühle FineArt GmbH (Dassel, GER)
Deckgläser (22 x 22 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH (Edermünde, GER)
Deckgläser Ø 12 mm	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)
Drigalskispatel	Heathrow Scientific (Vernon Hills, Illinois, USA)
Einmal-Halbmikrometervküvette	Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht, GER)
FrameStar® 480, 96 well, white wells, clear frame	4titude® Ltd (Dorking, GBR)
Impfeschlingen	Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht, GER)
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, GER)
Objektträger (76 x 26 mm)	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen, GER)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Kisker (Steinfurt, GER)
Petrischalen (Ø 10 cm)	Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht, GER)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht, GER)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	BD Bioscience (Heidelberg, GER)
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Device, 10K MWCO, 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Steril Filter 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Zellkultur Plastikverbrauchsmaterialien	Greiner Bio One (Essen, GER)

## 2.12. Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16      Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
AxioCam color	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
Azure c600	Azure Biosystems (Dublin, CA, USA)
Brutschrank für Agarplatten	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, GER)
Brutschrank HERAccl®	Heraeus Holding GmbH (Hanau, GER)
BVC Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co. KG (Wertheim, GER)
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments (Holliston, MA, USA)
Eppendorf BioPhotometer®	Eppendorf AG (Hamburg, GER)
Gel Doc™ XR+ Imager	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Heizblock	Grant Instruments Ltd (Royston, GBR)
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics (Mannheim, GER)
Magnetrührer IKA® RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & Co KG (Staufen, GER)
Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
- Axiovert 100	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
- Axiovert 200 M	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
Minitron Inkubationsschüttler	Infors AG (Bottmingen, CHE)
pH-Meter S220 SevenCompact™	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, GER)
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, GER)
Rollenmischer RM5	Karl Hecht GmbH & Co KG (Sondheim/Rhön, GER)
Sanyo CO <sub>2</sub> Inkubator	Sanyo (Osaka, JPN)
Blotkammer Trans Blot® Semi-Dry Transfer Cell	BioRad (Hercules, USA)
Spektrophotometer NanoDrop ND-100	PEQLAC (Erlangen, GER)
Sterilwerkbank	
- SAVVY	LAMSYSTEMS GmbH (Berlin, GER)
- Tecnoflow	Integra Biosciences (Fernwald, GER)
Strom- und Spannungsquelle	Biometra Standard Power Pack P25 (Göttingen, GER)
T1 Thermocycler	Biometra (Göttingen, GER)
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, GER)
Waage Sartorius basic	Sartorius (Göttingen, GER)

Wasserbad	GFL mbH (Burgwedel, GER)
Zentrifuge	
- 5415 R	Eppendorf AG (Hanau, GER)
- 5417 R	Eppendorf AG (Hanau, GER)
- Varifuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, GER)

## 2.13. Programme und Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme und Software sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17      Verwendete Programme und Software.

Programm/Software	Beschreibung	Hersteller
AxioVision	Lichtmikroskopische Dokumentation	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
AzureSpot Analysis Software	Auswertung der Western Blot Banden	Azure Biosystems (Dublin, CA, USA)
cSeries Azure™ Caputure Software	Dokumentation der Chemilumineszenz von Western Blots	Azure Biosystems (Dublin, CA, USA)
GraphPad Prism 7	Statische Auswertung, Grafikerstellung	Graphpad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Image Lab™	Dokumentation und Analyse von SDS-Polyacrylamid-Gelen	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Laser Scanning Microscopy 510	Aufnahme von fluoreszenzmikroskopischen Bildern	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER)
Light Cycler® 480 Software	qRT-PCR-Analyse	Roche Diagnostics (Mannheim, GER)
LSM Image Browser	Aufbereitung von fluoreszenzmikroskopischen Bildern	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Microsoft Office 2013	Textbearbeitung, Tabellenkalkulation, statistische Auswertung und Grafikerstellung	Microsoft (Redmond, USA)
NCBI (Pubmed)	Literatursuche	National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA)
ND 1000	Auswertung der spektrophotometrischen Daten	ThermoFisher Scientific (Rockford, USA)
RefWorks	Literaturverwaltung	ProQuest (Ann Arbor, USA)

# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1. Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

##### 3.1.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69

Zur Kultivierung des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 wurden in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben 10 ml des Luria-Bertani (LB)-Lennox-Mediums mit einer einzelnen Kolonie inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 180 U/min bei 37°C. Für die Stammhaltung wurde ein Verdünnungsausstrich aus einer Übernachtskultur mit einer Impfschlinge auf einer LB-Agarplatte durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Platte im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

##### 3.1.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen

Die Kultivierung von den *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen erfolgte in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml *Lactobacillus*-Medium (s. Tabelle 5) inokuliert mit 100 µl einer Übernachtskultur. Inkubiert wurde die Kultur für 20 bis 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Stammhaltung erfolgte ebenfalls bei 37°C im Inkubator für maximal 3 bis 4 Tage. Bei längerer Verwendung wurde eine frische Inokulation wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 3.1.2. Bestimmung der optischen Dichte

Zur Dokumentation des Bakterienwachstums wurde die optische Dichte der Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Messung erfolgte mithilfe des Eppendorf BioPhotometers® in einer Einmal-Halbmikrometervkuvette. Als Referenz wurde das entsprechende Medium verwendet. Die Bestimmung erfolgte bei einer OD<sub>600nm</sub> ≥ 0,6 in aufsteigenden Verdünnungen.

### 3.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Bakterienzellzahl einer Flüssigkultur wurde unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Eine Verdünnung der Bakterienkultur von 1:100 in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  wurde dafür angesetzt. Ausgezählt wurden zentrale Goßquadrate (4 x 4 Kleinquadrate) und zur Berechnung der Bakterienzellzahl pro  $\mu\text{l}$  wurde die unten aufgeführte Formel angewandt.

$$\text{Teilchen pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Teilchen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) * Kammertiefe (mm) * Verdünnung}}$$

### 3.1.4. Gewinnung des zellfreien Kulturüberstandes

Für die Gewinnung des zellfreien Überstandes (engl. *CFS = cell free supernatant*) der *Lactobacillus rhamnosus* Kultur erfolgte eine Zentrifugation bei 2.200 x g und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und durch eine semipermeable Membran ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) steril filtriert.

### 3.1.5. Inkubationsstudien

In den in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsstudien wurde der enteropathogene *Escherichia coli* Stamm E2348/69 mit verschiedenen Additiven inkubiert. Untersucht wurde der Einfluss der *Lactobacillus rhamnosus* W65 Kultur und des zellfreien Überstandes (*CFS*) auf die Expression ausgewählter Virulenzgene sowie die entsprechende Proteinexpression des Pathogens. Die verschiedenen Ansätze sind in Tabelle 18 aufgeführt. Das Mengenverhältnis der EPEC E2348/69 Kultur und dem Additiv wurde 1:1 gewählt, mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  pro Ansatz.

Tabelle 18 Inkubationsansätze.

Inkubationsansatz	Additiv
1	Luria-Bertani (LB)-Lennox-Medium
2	D-PBS mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$
3	<i>Lactobacillus</i> -Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS)
4	zellfreier Überstand der <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur
5	zellfreier Überstand der <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur, dialysiert gegen LB-Medium
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur, gewaschen mit und resuspendiert in D-PBS mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$

Die Anzucht der Bakterienkulturen wurde, wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, durchgeführt. Zum Waschen der *Lactobacillus rhamnosus* Kultur erfolgte eine Zentrifugation in einem 15 ml Falcon bei

2.200 x g und 4°C für 10 min. Das Bakterien-Sediment wurde in D-PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in der entsprechenden Menge D-PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> aufgenommen.

Die Gewinnung des zellfreien *Lactobacillus rhamnosus* Kulturüberstandes (CFS) erfolgte durch Abnahme des Überstandes der zentrifugierten Übernachtskultur. Verbliebene Bakterien wurden unter Verwendung eines sterilen 45 µm Spritzenfilters entfernt.

Die Dialyse des im Ansatz 5 (s. Tabelle 18) verwendeten Kulturüberstandes erfolgte unter Verwendung des Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Device (10K MWCO, 0,5 ml). Dafür wurden 500 µl des steril filtrierten Überstandes in das Dialyse-Kompartiment transferiert. Als Dialyse-Puffer wurde LB-Medium gewählt. Die Dialyse erfolgte im Inkubationsschüttler bei 180 U/min bei 4°C über Nacht. Ein Pufferwechsel erfolgte nach 4 h.

Die Inkubationsstudien wurden in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen bei 37°C für 6 h auf dem Rollenmischer RM5 (Karl Hecht GmbH & Co KG) durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für die Analyse der Genexpression und der Proteinexpression voneinander getrennt.

Für die Genexpressionsanalyse wurde die RNA der Bakterien gereinigt. Zur Vorbereitung für die RNA-Isolation wurden die Proben mit dem RNA Protect Reagenz behandelt. Dafür wurden 200 µl RNA Protect Reagenz mit 100 µl der Probe vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Protect Reagenz stabilisiert die RNA, um eine zuverlässige Genexpressionsanalyse zu gewährleisten. Anschließend wurde die Probe bei Raumtemperatur und für 10 min bei 2.300 x g sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und das Sediment kurz an der Luft getrocknet. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei - 20°C.

Die Proben für die Proteinexpressionsanalyse wurden bei 4°C und 9.300 x g für 5 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden bei - 20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.1.6. Negativfärbung von Bakterien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Für die Durchführung einer Negativfärbung wurden 5 bis 10 µl der zu untersuchenden Bakterien suspension auf ein Kupfernetz geträufelt. Die Kupfernetze wurden zuvor mit einem Kunststoff (Formvar) beschichtet und zur Stabilisierung mit Kohle bedampft. Dies führt zu einer Hydrophilie der Oberfläche und einer leichten Hintergrundkontrastierung. Nach 10 Minuten, in denen die Partikel sedimentieren, wird die Flüssigkeit auf dem Kupfernetz leicht mit einem Filterpapier abgesaugt. Die Kontrastierung der Probe erfolgt je nach Bakterienstamm mit 1%iger Phosphorwolframsäure (pH 7,0) für 45 s bis zu 1 min. Die Metall-Ionen der Lösung lagern sich um die zu untersuchenden Strukturen an, sodass ein Negativbild der Probe entsteht. Die Grenzen der Bakterien und deren Oberflächenmerkmale lassen sich so

darstellen. Anschließend wird die Probe auf einem Filterpapier getrocknet und innerhalb der nächsten 24 h elektronenmikroskopisch untersucht und ausgewertet.

### 3.1.7. Immunfluoreszenzfärbung des EPEC E2348/69

Die Immunfluoreszenzfärbung des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das O127-Antigen (s. Tabelle 9). Dafür wurden die Bakterien mit 4% PFA fixiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Zugabe von 50 µl anti-Coli O127 (Verdünnung 1:50) erfolgte mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. Es wurde erneut gewaschen. Der sekundäre Antikörper (GAR, konjugiert mit AlexaFluor 647; Verdünnung 1:50) wurde ebenfalls für 30 min inkubiert. Ein abschließendes Waschen wurde durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte an einem Mikroskop von Olympus in den Laboratorien von Prof. Dr. Peter Schierack an der Brandenburgischen Technischen Universität (BTU) Cottbus-Senftenberg.

## 3.2. Zellbiologische Methoden

### 3.2.1. Kultivierung und Passage von eukaryotischen Zellen

Die Anzucht der eukaryotischen Zellen erfolgte im HERAcell® Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die verwendeten Medien und Reagenzien wurden vor der Anwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Ein Medienwechsel erfolgte nach Bedarf und/oder alle 2 bis 3 Tage.

Für die Anzucht der Zellen wurden verschiedene Plastikmaterialien verwendet. Die dabei verwendeten Kulturmedienmengen sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19      Verwendete Kultivierungskompartimente und Kulturmedienmenge.

Kultivierungskompartiment	Menge des Kulturmediums
Flasche	
- F25	5 ml
- F75	16 ml
well-Platten	
- 12	2 ml
- 24	1 ml
Petri-Schale	
- Ø 3 cm	3 ml

### **3.2.1.1. Revitalisierung von kryokonservierten Zellen**

Die kryokonservierten Zellen werden in Aliquots im flüssigen Stickstoff bei - 196°C gelagert. Bei Bedarf werden die Zellen in F25-Flaschen in Kultur genommen. Diese werden in 5 ml frisches Medium gegeben und über Nacht inkubiert. Am Folgetag muss obligatorisch ein Medienwechsel stattfinden, um das für die Kryokonservierung benötigte, toxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen bzw. stark zu verdünnen.

### **3.2.1.2. Passage von eukaryotischen Zellen**

Für die langfristige Kultivierung der Zellen wurden F75-Flaschen verwendet. Daher beziehen sich alle Volumenangaben zur Passage der Zellen auf dieses Kultivierungskompartiment. Die Passage der eukaryotischen Zellen erfolgte bei 70% bis 80% Konfluenz. Nach Abnahme des Mediums wurden die adhärennten Zellen mehrfach mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und für 10 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 1 x Trypsin benetzt und bis zur Ablösung, ca. 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 7 ml Kulturmedium zum Absättigen des Trypsins und eine vorsichtige Resuspendierung. Die Zellen wurden nach Bedarf in die unterschiedlichen Kultivierungskompartimente ausgesät.

### **3.2.1.3. Kultivierung und Passage von T84-Zellen**

Die Kultivierung von T84-Zellen erfolgte mit dem T84-Kulturmedium (s. Tabelle 7). Die für das Aussäen der Zellen verwendeten Zellzahlen sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20 Zellzahlen zum Aussäen von T84-Zellen.

Kultivierungskompartiment	Zellzahl/Verdünnung
F75-Kulturflasche	1:5 oder 1:10
24-well-Platte	2 x 10 <sup>6</sup>

### **3.2.1.4. Kultivierung und Passage von HT29-Zellen**

Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgte mit dem HT29-Kulturmedium (s. Tabelle 7). Die für das Aussäen der Zellen verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21 Zellzahlen zum Aussäen von HT29-Zellen.

Kultivierungskompartiment	Zellzahl/Verdünnung
F75-Kulturflasche	1:10 oder 1:20
24-well-Platte	2 x 10 <sup>6</sup>
12-well-Platte	5 x 10 <sup>6</sup>

### 3.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der eukaryotischen Zellzahl wurde unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt. Die äußeren Großquadrate (4 x 4 Kleinquadrate) wurden ausgezählt, das arithmetische Mittel bestimmt und die unten aufgeführte Formel zur Berechnung der Zellzahl in ml verwendet.

$$\text{Zellzahl pro ml Volumen} = \text{arithmetisches Mittel} * 10^4$$

### 3.2.2. Adhärenzstudien

Die in dieser Arbeit durchgeführten Adhärenzstudien erfolgten an konfluent gewachsenen Monolayern der intestinalen Epithelzellen. Zur Vorbereitung des Experiments wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mehrfach mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Frisches Infektionsmedium (Kulturmedium ohne Antibiotika, s. Tabelle 7), 500  $\mu\text{l}$  im 24-well-Format und 2 ml im 12-well-Format, wurden mindestens eine Stunde vor der Infektion aufgetragen. Die Anzucht der Bakterienkulturen sowie die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie in Kapitel 3.1.1. und 3.1.3. beschrieben. Die Verdünnungen erfolgten in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Ebenfalls wurden Adhärenzstudien mit in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschenen Kulturen durchgeführt. Dafür wurden die Übernachtskulturen bei  $2.200 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert, das Sediment in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in dem Ausgangsvolumen von PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen. Die Bestimmung der Bakterienzellzahl erfolgte anschließend, wie im Kapitel 3.1.3. beschrieben.

Für die Adhärenzstudien wurde eine Infektion mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* Stamm E2348/69 mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1,5 durchgeführt. Das Inkubationsverhältnis EPEC : *Lactobacillus rhamnosus* wurde 1:1 gewählt. Das Verhältnis EPEC : zellfreiem *Lactobacillus rhamnosus* Überstand wurde 1:2 gewählt. Das Mengenverhältnis von 2:1 (zellfreiem Überstand : Kultur) wurde in Vorversuchen anhand der vorliegenden Proteinmenge ermittelt.

Die Infektion der intestinalen Monolayer wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. Einen Überblick gibt die Tabelle 22. Während der Infektion wurden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Tabelle 22 Adhärenzstudien.

Ausschluss (= <i>exclusion</i> )	Konkurrenz (= <i>competition</i> )
2 h Präinkubation <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur / zellfreiem Kulturüberstand + 2 h / 4 h Infektion mit enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69	2 h / 4 h Inkubation mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Kultur / zellfreiem Kulturüberstand + Infektion mit enteropathogenem <i>Escherichia coli</i> E2348/69

### 3.2.2.1. Analyse nach der Ausplattiermethode

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mehrfach mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Dies geschah, um die nicht-adhärenenten Bakterien zu entfernen und um die divalenten Ionen aus der Zellumgebung zu verdrängen. Durch die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  1 x Trypsin und Inkubation bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  lösten sich die Zellverbände vom Boden der well-Platte. Anschließend wurden 800  $\mu\text{l}$  PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgegeben und es erfolgte eine Resuspension. Die Proben wurden in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  auf 1:500 oder 1:5000 verdünnt. Von der Verdünnung wurden 100  $\mu\text{l}$  mit Hilfe eines Drigalskispaltels auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden fachgemäß beschriftet und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Analyse erfolgte am nächsten Morgen durch Auszählung der gewachsenen Kolonien.

### 3.2.2.2. Bildbasierte Analyse

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Peter Schierack entwickelte eine alternative Methode zur Auswertung von Adhärenzstudien. Fluoreszenzmikroskopisch werden parallel Zelllinien und Bakterien mit Hilfe unterschiedlicher Färbungen dargestellt. Die Zellen werden mit DAPI angefärbt (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{l}$  pro well, 30 s), die Färbung der Pathogene erfolgt wie in 3.1.7. beschrieben mit dem O127-Antikörper. Die Auswertung erfolgt in den Laboratorien von Prof. Dr. Peter Schierack an der Brandenburgischen Technischen Universität (BTU) Cottbus-Senftenberg. Eine eigens dafür entwickelte Software ermöglicht die Auswertung von adhärenenten Bakterien pro Zelle bzw. pro Fläche [88].

### **3.2.3. Immunfluoreszenzfärbungen**

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden zur Visualisierung der Adhärenz von enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an beiden intestinalen Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden dafür in 24-well-Platten auf Ø 12 mm Deckgläsern ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Alle Reagenzien wurden in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> verdünnt. Auch alle Waschschriffe wurden mit diesem Puffer durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Inkubationen bei Raumtemperatur. Die Volumenangaben beziehen sich auf eine Vertiefung einer 24-well-Platte.

Nach Ablauf der Infektionszeit wurde das Medium abgenommen und die Zelllayer wurden dreimal gewaschen. Es folgte eine Fixierung mit 200 µl 4% PFA für 20 min. Anschließend wurde gewaschen. Zum Quenchen erfolgte eine Inkubation von 200 µl 0,2% Glycin pro well für 20 min. Erneut wurde zweimal gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden 100 µl 0,2% Triton X-100 auf die Zellen aufgetragen und für 5 min inkubiert. Der Waschschriff wurde viermal durchgeführt, bevor das Blocken mit 100 µl 1% BSA für 10 min erfolgte. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (100 µl/well) erfolgte für 1 h. Anschließend wurde acht Mal kräftig gewaschen. Der sekundäre Antikörper (für Verdünnungen s. Tabelle 9) wurde zusammen mit DRAQ5 (Verdünnung von 1:500) verdünnt. 250 µl wurden aufgetragen und es erfolgte eine Inkubation für 30 min. Erneutes, achtmaliges, kräftiges Waschen wurde durchgeführt. 250 µl des Phalloidin-Reagenzes wurden in einer 1:500-Verdünnung aufgetragen und für 30 min inkubiert. Achtmal wurde gewaschen. Abschließend wurde 1 ml dH<sub>2</sub>O auf die Zellen aufgetragen, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Objektträger wurden mit einem Tropfen Eindeckmedium versorgt und die Deckgläser wurden darauf transferriert. Vor der Auswertung wurden die Proben mindestens über Nacht bei 4°C gelagert.

Bei einer Färbung ausschließlich mit DRAQ5 und Phalloidin wurde auf das Quenchen, die Permeabilisierung, das Blocken und die Verwendung von Antikörpern verzichtet.

Die mikroskopische Analyse erfolgte am LSM 510 (Stativ: Axiovert 200 M) mit der Software Laser Scanning Microscopy 510. Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde der LSM Image Browser verwendet.

### **3.2.4. Präparation von Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Nach Abschluss der Infektion erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 2% Glutaraldehyd. Zu Beginn wurde dem Zellmedium eine 4% Glutaraldehyd-Lösung im 1:1 Verhältnis zugegeben. Nach 10 min wurden die Zellen in reines 2% Glutaraldehyd (pH 7,4) überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag wurden drei Waschschriffe à 10 min mit D-PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> durchgeführt. Die Fixierung und Kontrastierung mit 1% Osmiumtetroxid in D-PBS erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Zur Dehydratation der Proben wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend bei 50% für

je 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Über 70%, 90%, 96% und abschließender doppelter Inkubation in 100%igem Ethanol wurden die Präparate auf die Einbettung im Epoxidharz vorbereitet. Nach vollständiger Entwässerung wurden die Proben in reines Propylenoxid überführt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min, ein Wechsel des Propylenoxids und eine erneute 5minütige Inkubation. Anschließend wurden die Präparate in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epoxidharz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einbettung in reines Epoxidharz folgte und das Präparat wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Präparate durch mehrfaches Zentrifugieren bei 13 400 U / min in der Spitze der BEEM®-Kapsel angereichert. Die BEEM®-Kapsel wurde möglichst ohne Lufteinschlüsse mit reinem Epoxidharz aufgefüllt und zum Aushärten für 2 Tage im 60°C Schrank gelagert.

Die Proben wurden am Ultramikrotom (Leica) in circa 60 nm dicke Schichten geschnitten. Es folgte eine Schnittkontrastierung mit 4% Uranylacetat in 25% Ethanol für 20 min. Abschließend wurden die Präparate für 2 min mit Reynolds-Bleicitrat kontrastiert. Die Schnitte wurden auf ein Kupfernetz transferriert und von Lilo Greune (Institut für Infektiologie - ZMBE) am Elektronenmikroskop des Max-Planck-Instituts für molekulare Biomedizin ausgewertet.

### 3.3. Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1. RNA-Isolierung aus prokaryontischen Zellen

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy Protect Bacteria Mini Kit von Qiagen verwendet. Für die Lyse der Bakterien wurde ein TE-Puffer (s. Tabelle 23) und eine Proteinase K-Lösung mit einer Konzentration von 20 mg / ml in  $d_4H_2O$  angesetzt.

Tabelle 23 Zusammensetzung des TE-Puffers.

Komponente	Konzentration
Tris HCl	30 mM
EDTA	1 mM
Lysozym	15 mg / ml
pH 8	

Die Zusammensetzung des Lyse-Puffers ist der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24 Zusammensetzung des Lyse-Puffers pro Ansatz.

Komponente	Menge
TE-Puffer	100 $\mu$ l
Proteinase K Lösung (20 mg/ml)	15 $\mu$ l

Nach Aufnahme des Sediments in den Lyse-Puffer (s. Tabelle 24) erfolgte eine Inkubation unter Rotation für mindestens 20 min bei Raumtemperatur. Die enzymatische Lyse der Bakterien vermittelt durch das Lysozym, welches hydrolytisch die glykosidischen Bindungen im Peptidoglykan löst, ermöglicht die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile. Die Proteinase K gehört zur Familie der Serinproteasen und spaltet Peptidbindungen innerhalb sowie an den Enden eines Proteins und hat somit sowohl Endo- als auch Exopeptidase-Aktivitäten.

Die weiteren Schritte erfolgten nach einem Protokoll von Qiagen. Die Verwendung einer RNeasy *spin column* mit einer Silikon-Membran ermöglicht die Bindung der zuvor mit Ethanol gefällten RNA. Um eine Verunreinigung der Probe durch DNA zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau von 30 min durchgeführt. Durch die Zugabe von 40 µl RNase-freiem  $d_2H_2O$  wurde die RNA in einem letzten Schritt eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80°C bis zur weiteren Verwendung.

### **3.3.2. RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung am NanoDrop Spektrophotometer**

Die mit Hilfe des RNeasy Bacteria Protect Mini Kit gewonnene RNA wurde am Spektrophotometer NanoDrop ND-100 auf ihre Reinheit geprüft und deren Konzentration bestimmt. Die physikalische Grundlage bildet das Lambert-Beer'sche Gesetz. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und zeigen in der photometrischen Analyse eine charakteristische Kurve. Bei Kontaminationen zeigen sich Änderungen dieser Kurve hin zu dem Absorptionsmaximum der verunreinigenden Substanz. Zur Detektion des Verunreinigungsgrads durch Proteine, die ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, wird das Verhältnis der 260 nm- zur 280 nm Absorption verwendet. Zahlenwerte um 2 für die 260 nm / 280 nm-Ratio sprechen für das Vorliegen reiner RNA.

Da eine reine RNA-Lösung mit einer Konzentration von 40 µg / ml eine  $OD_{260nm}$  von 1 entspricht wird zur Bestimmung der RNA-Konzentration folgende Formel verwendet.

$$\text{Konzentration in } \mu\text{g pro ml} = OD_{260nm} * 40 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **3.3.3. cDNA-Synthese**

Um die isolierten RNA-Proben auf die Expression der Zielgene zu untersuchen, bedarf es dem Vorliegen von DNA-Strukturen. Zum Umschreiben der RNA in DNA wurde eine reverse Transkription der gewonnenen RNA durchgeführt. Dies erfolgte mithilfe des PrimeScript™ RT Master Mix (TAKARA) unter Einsatz von einer Maximalmenge von 500 ng RNA. Die Zusammensetzung eines Ansatzes ist der Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 25      Ansatz für die cDNA-Synthese.

Komponente	Volumen
PrimeScript™ RT Master Mix	2 µl
RNA	max. 500 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte im T1 Thermocycler (Biometra) bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde der Heizblock für 5 min auf 85°C erhitzt, um die Denaturierung der Enzyme zu erreichen. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C.

### 3.3.4. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Für die Expressionsanalyse der Virulenzgene des enteropathogenen *Escherichia coli* Stamms E2348/69 wurden *quantitative real-time* PCRs durchgeführt. Im Laufe der Reaktionszyklen der qRT-PCR (s. Tabelle 28) nimmt die Menge an DNA-Fragmenten des gesuchten Gens exponentiell zu. Durch die Anwesenheit eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes (in dieser Arbeit: SYBR Green (Biozym)) wird es möglich, die Mengenzunahme der DNA in Echtzeit zu verfolgen. Der LightCycler® 480 detektiert das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht der Wellenlänge  $\lambda = 521$  nm am Ende eines jeden Amplifikationszyklus. Der Farbstoff bindet einzelsträngige sowie doppelsträngige DNA. Das Signal der gebundenen einzelsträngigen DNA ist jedoch vernachlässigbar gering. Es ist daher zulässig, Rückschlüsse von der emittierten Lichtmenge auf den doppelsträngigen DNA-Gehalt zu ziehen.

Zur Berechnung einer verlässlichen Mengenangabe wird parallel die Menge eines bekanntermaßen gleichmäßig exprimierten Gens, einem sogenannten Referenzgen, detektiert. Als Referenzgen wurde das Gen *rrsB*, codierend für eine ribosmale 16S Untereinheit, ausgewählt. Die Auswahl der untersuchten Virulenzgene sind der Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26 Auswahl der zu untersuchenden Gene.

Gen	Name	Beschreibung
<i>bfpA</i>	<i>bundle forming pilus</i> , Untereinheit A	Untereinheit des <i>bundle forming pilus</i> , beteiligt an der Adhärenz des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 an die Wirtszelle sowie Adhärenz der Bakterien untereinander
<i>espD</i>	<i>Escherichia coli</i> secreted Protein D	Protein des <i>type-3-secretion systems</i> (T3SS), beteiligt an der Porenbildung in der Wirtszellmembran für die Translokation von Virulenzproteinen in die Wirtszelle
<i>eae</i>	Intimin	Membranprotein des EPEC E2348/69, Bindungspartner zum <i>translocated intimin receptor</i> (TIR), zuständig für Adhärenz an die Wirtszelle

Für die Analyse der Ansätze wurden die unterschiedlichen Ansätze mit aufsteigenden Verdünnungen der cDNA in eine 96-well-Platte pipettiert. Das Auslesen der Platte und die Auswertung erfolgte durch den Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics) mit der Light Cycler® 480 Software. Für die Ansätze des Referenzgens *rrsB* wurden die Verdünnungen 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>7</sup> und 1:10<sup>8</sup> gewählt. Die cDNA wurde in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 für die Analyse der untersuchten Virulenzgene verwendet.

Ein Ansatz für die qRT-PCR beinhaltet den RT<sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix, die entsprechende cDNA-Verdünnung und das spezifische Primer-Paar in insgesamt 10 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O. Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 27 zu entnehmen. In dem RT<sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix enthalten sind dNTPs, der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green und die hitzestabile Polymerase im Reaktionspuffer.

Tabelle 27 Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes.

Komponente	Menge pro Ansatz
RT <sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix	5 µl
cDNA, verdünnt	2 µl
Primer-Paar	je 5 pmol
RNase-freies dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die Reaktionsschritte des qRT-PCR-Programms sind in Tabelle 28 aufgeführt. Für eine Optimierung der Schmelzkurven wurde die *Annealing* Temperatur auf 56°C gesenkt.

Tabelle 28 Ablauf der qRT-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
I. Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1
II. Amplifikation			
Denaturierung	95°C	5 sec	} 40
<i>Annealing</i>	56°C	5 sec	
Elongation	60°C	30 sec	
III. Schmelzkurve			
Denaturierung	95°C	5 sec	} 1
<i>Annealing</i> und Elongation	60°C	1 min	
Schmelzen	95°C	+0,11°C / min	

### 3.4. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Bakterien produzieren Proteine und andere Metabolite, die in den Kulturüberstand abgegeben werden. Zur Analyse der Bestandteile mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird eine ausreichende Proteinmenge benötigt. Zum Anreichern erfolgt eine Denaturierung und Fällung mittels Trichloressigsäure (TCA). Dabei werden die Proteine gleichzeitig von anderen Biomolekülen des Kulturüberstands getrennt. Die Trichloressigsäure lagert sich dicht an die Proteinstrukturen an und maskiert die hydrophilen Gruppen. Die Löslichkeit der Proteine nimmt dadurch stark ab und dies führt zum Ausfallen der Proteine. Dieser Vorgang nennt sich Aussalzen.

Zur Durchführung des Aussalzens werden zu 1 ml zellfreiem Kulturüberstand 150 µl Trichloressigsäure gegeben. Nach kräftigem Vermischen werden die Proben für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C bei 9.300 x g. Das Sediment wird mit Aceton aufgeschwemmt und kräftig resuspendiert, um die Salze der Trichloressigsäure vom Protein zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Aceton mit der Pipette abgenommen und das Sediment an der Luft getrocknet.

#### 3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Trennung von Zelllysaten und gefällten Kulturüberständen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Die SDS-PAGE nach Laemmli ist eine

proteinbiochemische Methode zur Trennung von Stoffgemischen nach Molekülgröße in einem elektrischen Feld [89]. Das Polyacrylamid dient als Trägermaterial. Durch Polymerisation des Monomers Acrylamid kommt es zur Bildung einer dreidimensionalen, netzartigen Struktur. Bei der Wanderung von Molekülen unterschiedlicher Größe bewegen sich Moleküle kleineren Molekulargewichts schneller durch das Polyacrylamid-Gel als größere. Für die Herstellung von 5 Minigelen werden nacheinander zwei Ansätze unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentrationen angesetzt und gegossen.

Für die Fertigung der Gele wurden eine Sammelgel- und Trenngel-Lösung angesetzt. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind Tabelle 29 und Tabelle 30 zu entnehmen. Die Komponenten und entsprechenden Volumina für die Gele sind in Tabelle 31 aufgeführt. Das Ammoniumperoxodisulfat (APS), ein Salz der Peroxodischwefelsäure, ist ein Radikalbildner und agiert als Initiator der Acrylamid-Polymerisation. Das Tetramethylethyldiamin (TEMED) gehört zur Gruppe der aliphatischen Amine und katalysiert die, durch das APS initiierte, Polymerisation des Acrylamids. Nach dem Aushärten der Gele werden diese bis zur Verwendung in einer feuchten Umgebung bei 4°C gelagert.

**Tabelle 29** Zusammensetzung der Sammelgel-Lösung.

Komponente	Sammelgel-Lösung
Tris HCl 1 M (pH 6,8)	750 ml
EDTA 0,2 M (pH 8)	60 ml
SDS 10% (w/v)	60 ml
dH <sub>2</sub> O	130 ml

**Tabelle 30** Zusammensetzung der Trenngel-Lösung.

Komponente	Trenngel-Lösung
Tris HCl 1 M (pH 8,9)	900 ml
EDTA 0,2 M (pH 8)	48 ml
SDS 10% (w/v)	48 ml
dH <sub>2</sub> O	4 ml

**Tabelle 31** Zusammensetzung der Gele.

Komponente	Sammelgel, 5%ig	Trenngel, 12,5%ig	Trenngel, 15%ig
Sammelgel-Lösung	3,0 ml	-	-
Trenngel-Lösung	-	7,5 ml	7,5 ml
Acrylamid 30%	3,0 ml	15,0 ml	18,0 ml
dH <sub>2</sub> O	11,85 ml	13,5 ml	10,5 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10%	180 µl	330 µl	330 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	9 µl	18 µl	18 µl

Die Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden in einem Probenpuffer (s. Tabelle 32) aufgenommen und für 10 bis 15 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und bildet freie Thiolgruppen. Das *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) ist ein anionisches Detergens und unterbricht nicht-kovalente Bindungen und zerstört somit die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Zusätzlich maskiert das Detergens die Eigenladung der Proteine mit der negativen Ladung des Anions, wodurch eine dem Molekulargewicht entsprechende Ladung vorliegt. Die negative Ladung ermöglicht die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Vor dem Auftragen der Proben in die Taschen im Sammelgel erfolgt eine Zentrifugation bei 9.300 x g und 4°C für 5 min.

Tabelle 32 Zusammensetzung des 4 x SDS-Probenpuffers.

Komponente	Konzentration
Tris HCl	62,5 mM
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	3% (w/v)
Glycerin	8% (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	10% (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze

Das Gel wird in die Apparatur eingespannt und von Laufpuffer umspült, um den Stromfluss zu ermöglichen. Die 10 x Laufpuffer-Stammlösung (s. Tabelle 33) wird dafür 1:10 verdünnt. Der verwendete Proteingrößenstandard „Protein Marker VI (10-245) prestained“ (AppliChem, Darmstadt) wird zur Referenz mit 5  $\mu$ l aufgetragen. Die Probenmengen variieren von 2,5  $\mu$ l bis maximal 20  $\mu$ l. Die SDS-PAGE-Apparatur wird mit einer Strom- und Spannungsquelle (Biometra) verbunden. Für den Lauf im Sammelgel wird eine Stromstärke von 20 mA angelegt, beim Übergang zum Trenngel wird die Stromstärke auf 40 mA erhöht. Der Lauf wird beendet, sobald die SDS-Probenpufferfront sich dem unteren Gelrand nähert bzw. herausgelaufen ist.

Tabelle 33 Zusammensetzung des 10-fach Laufpuffers.

Komponente	Menge
Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 3.4.3. Färbungen mit Coomassie Brilliant Blue

Für die Anfärbung der getrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel wird eine Färbelösung mit Coomassie Brilliant Blue verwendet (s. Tabelle 34). Das Gel wird dafür 30 min in den Färbelösung geschwenkt. Zur Reduktion des Hintergrunds wurde das Gel in die Entfärbelösung (s. Tabelle 35) überführt und so lange geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Die Detektion und Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ Imagers (Bio-Rad Laboratories).

Tabelle 34 Zusammensetzung der Coomassie Brilliant Blue Färbelösung.

Komponente	Konzentration
Coomassie Brilliant Blue	3,3 mM
Ethanol	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Tabelle 35 Zusammensetzung der Entfärbelösung.

Komponente	Konzentration
Ethanol	10% (v/v)
Essigsäure	7% (v/v)

### 3.4.4. Semi-dry Western Blotting

Zur Vorbereitung des immunologischen Nachweises der gesuchten Proteine wurden die Proteine des Gels mithilfe des halbtrockenen (engl. *semi-dry*) Western Blotting Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die negative Ladung der Proteine führt beim Anlegen einer Spannung zu einer Wanderung der Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Proteine verlassen dabei das Gel und haften an der Membran an. Die Zusammensetzung des Transferpuffers ist der Tabelle 36 zu entnehmen. Die Whatman Papiere werden in Transferpuffer getränkt und auf den Boden der Blotapparatur, der Anode, gestapelt. Darauf wird zuerst das Gel und folgend die Nitrozellulosemembran ohne Lufteinschlüsse aufgelegt. Abschließend werden mehrere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere daraufgelegt. Die Blotapparatur wird fest verschlossen und es wird für 1 h eine Spannung von 15 V angelegt. Nach dem Transfer der Proteine wird die Membran im Luftzug getrocknet.

Tabelle 36 Zusammensetzung des Transferpuffers.

Komponente	Konzentration
Tris HCl	48 mM
Glycin	39 mM

### 3.4.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde ein immunchemischer Nachweis durchgeführt. Die Verwendung von spezifischen Erstantikörpern führt zur Erkennung der Protein-Epitope durch die Antikörperbindungsstellen. Die Präsenz der gebundenen Erstantikörper wurde mithilfe von Peroxidase (PO)-gekoppelten Sekundärantikörpern gegen den F<sub>c</sub>-Teil der Erstantikörper nachgewiesen. Zur Visualisierung der gesuchten Proteinbanden wurde die *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Western Blot-Substratlösung SignalFire™ (Cell Signaling Technology) und bei besonders sensitiven Nachweisen die Trident femto Western HRP Substratlösung (GeneTex Inc.) verwendet. Die Peroxidase, gekoppelt an den Sekundärantikörper, reagiert mit den chemischen Bestandteilen der Substratlösung und führt zu einer Lumineszenz, die mit Hilfe des Azure c600 (Azure Biosystem) detektiert werden kann. In der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die Peroxidase die Umwandlung von 3-Aminophthal-säurehydrazid zu einem angeregten divalenten Anion, welches beim Übergang in den Grundzustand der 3-Aminophthalsäure detektierbares Licht emittiert. So wird eine Detektion und Lokalisation des vom Erstantikörper-gebundenen Proteins möglich.

Die Oberfläche der Nitrozellulosemembran ist so beschaffen, dass die Proteine gut auf ihr haften können. Um eine spezifische Bindung des Erstantikörpers an das gesuchte Protein zu ermöglichen, müssen nach dem Blotten die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abgedeckt („geblockt“) werden. Dies geschieht mithilfe der Inkubation in 5% Magermilch-Pulver, suspendiert in PBST (s. Tabelle 38), für 2 h. Die Herstellung des PBST Waschpuffers erfolgt durch Zugabe von Tween® 20 mit einer Zielkonzentration von 0,1 % (v/v) zu dem vorhandenen PBS Puffer (s. Tabelle 37). Nach dem Blocken erfolgt die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Antikörper. Dieser wird in 0,5% Magermilch, suspendiert in PBST, in ausgewählten Konzentrationen (s. Tabelle 9) angesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wird die Nitrozellulosemembran in drei Waschschritten à 5 min in PBST von ungebundenen Erstantikörpern befreit. Der Zweitantikörper wird passend zum Erstantikörper gewählt (s. Tabelle 9) und ebenfalls in 0,5% Magermilchpulver, suspendiert in PBST, angesetzt. Die Inkubation für den Zweitantikörper wird für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor der Entwicklung am Azure c600 (Azure Biosystems) wird die Membran erneut 3-mal à 5 min in PBST gewaschen. Die Entwicklungsreagenzien A und B der *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Western Blot-Substratlösung SignalFire™ (Cell Signaling Technology), beziehungsweise der Trident femto Western HRP Substratlösung (GeneTex Inc.) werden auf die Membran gegeben und in einer Schale gut vermischt. Nach einer Minute wird die Membran in die Kammer eingelegt und bei vollständigem Lichtausschluss analysiert. Die durch die oben beschriebene Reaktion hervorgerufene Chemilumineszenz wird von der Kamera detektiert. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mithilfe der AzureSpot Analysis Software (Azure Biosystems).

Tabelle 37 Zusammensetzung des PBS Puffers.

Komponente	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
pH 7,4	

Tabelle 38 Zusammensetzung des PBST Waschpuffers.

Komponente	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
pH 7,4	
Tween® 20	0,1 % (v/v)

Das *Strippen* (engl. für 'Abtragen') der gebundenen Antikörper kann beim Nachweis von mehreren Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran notwendig werden. Dies ist der Fall, wenn bei einer Doppelmarkierung die gesuchten Proteine eine ähnliche Molekulargröße aufweisen und durch ihre Nähe zueinander auf der Membran das Problem der eindeutigen Zuordnung auftreten könnte. Ebenso ist die Durchführung des *Strippens* zu empfehlen, wenn zum Nachweis Antiseren verwendet werden. Die Polyklonalität der in den Antiseren vorkommenden Antikörper, gerichtet gegen unterschiedliche Epitope eines Antigens, macht das Auftreten von Hintergrundmarkierungen sowie unspezifischen Banden auf dem Blot wahrscheinlicher. Es ist denkbar, dass unspezifische Bindungsstellen besetzt werden und somit für die spezifische Bindung eines zweiten Primärantikörpers nicht mehr zur Verfügung stehen. Das *Strippen* löst die gebundenen Antikörper von der Nitrozellulosemembran und führt den Blot in seinen ursprünglichen Zustand zurück. Dies verhindert eine potenzielle Störung bei aufeinanderfolgenden Proteinnachweisen.

Das Lösen der gebundenen Antikörper erfolgt durch die Verwendung eines *Stripping Puffers* (s. Tabelle 39). Die Nitrozellulosemembran wird in einer Glasschale, bedeckt mit *Stripping Puffer*, für 30 min im Wasserbad auf 50°C erhitzt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wird die Membran in PBST gewaschen und es erfolgt ein erneutes Blocken mit 5% Magermilchpulver, suspendiert in PBST, für 2 h. Anschließend wird nach der oben beschriebenen Methode verfahren.

Tabelle 39      Zusammensetzung des *Stripping* Puffers.

Komponente	Konzentration
Tris HCl pH 6,7	62,5 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	100 mM
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	2%

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1. Auswahl und Charakterisierung der ausgewählten Bakterienstämme

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme vorgestellt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie die Analysen der Ganzzelllysate bilden die Grundlage für die folgenden Versuche.

#### 4.1.1. Enteropathogener *Escherichia coli* Stamm E2348/69

In der elektronenmikroskopischen Analyse stellt sich der enteropathogene *Escherichia coli* Stamm E2348/69 in seiner charakteristischen Stäbchenform mit den Abmessungen von 0,8  $\mu\text{m}$  Breite und 1,5  $\mu\text{m}$  Länge dar. Die Bakterien sind peritrich, mit 2 bis 6 Flagellen begeißelt (s. Abbildung 9). Die Flagellen erreichen eine Länge von bis zu 8  $\mu\text{m}$ . Bei Bündelung der Flagellenbewegung (s. Abbildung 10A) kann eine gerichtete Fortbewegung der Bakterien erfolgen.

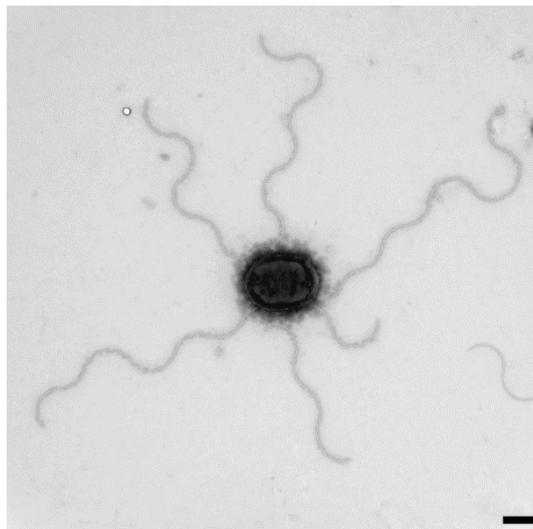


Abbildung 9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen *Escherichia coli* Stamms E2348/69. Der EPEC E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Präparation des EPEC E2348/69 für die Negativ-Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Zur Kontrastierung wurden die Bakterien mit 1% Phosphorwolframsäure für 40 s inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

Abschnürungen der äußeren Membran, sogenannte *outer membrane vesicles* (OMVs), sind für die Familie der Gram-negativen Bakterien beschrieben worden [71]. In der elektronenmikroskopischen Analyse einer Kultur des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69, gewachsen in LB-Medium, konnten keine eindeutigen Strukturen von OMVs dargestellt werden.

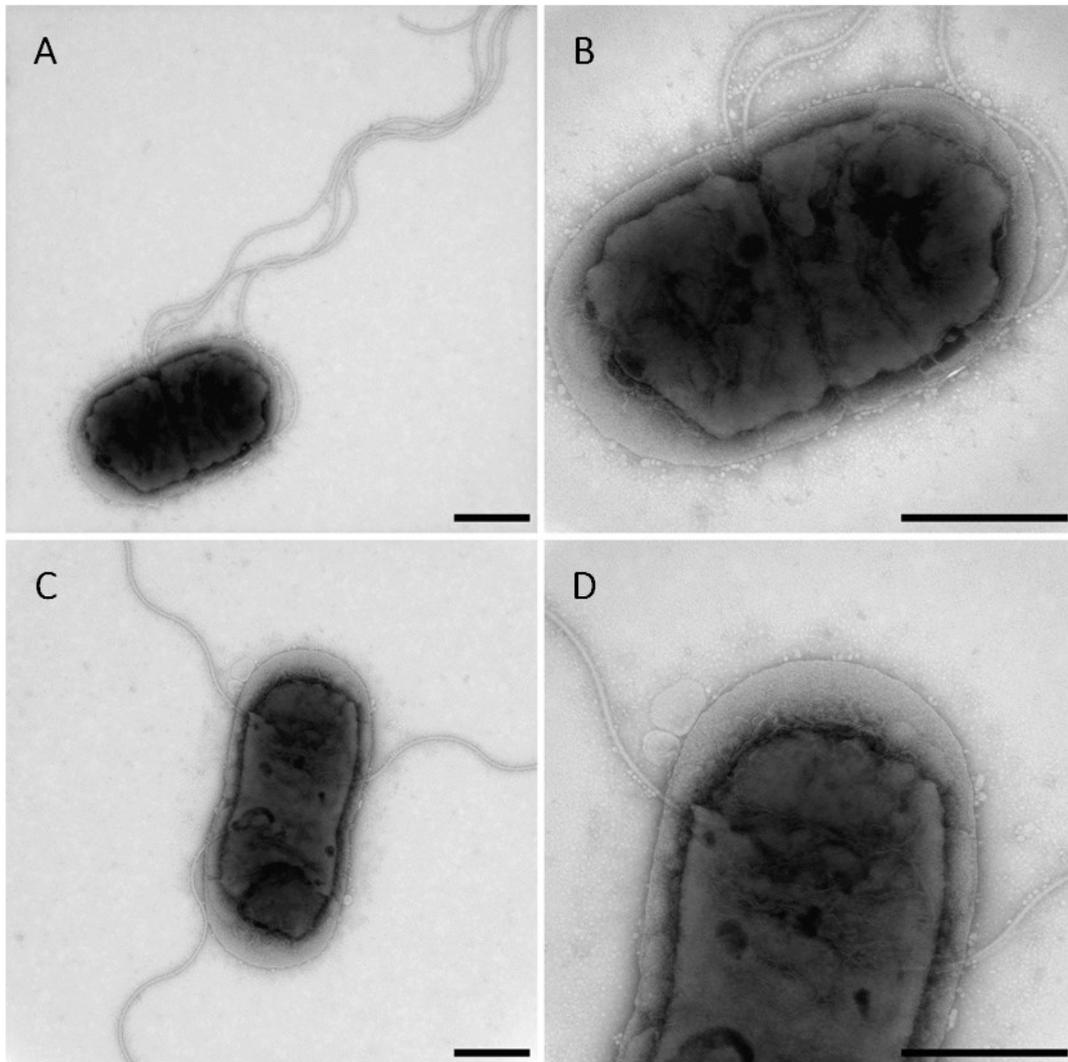
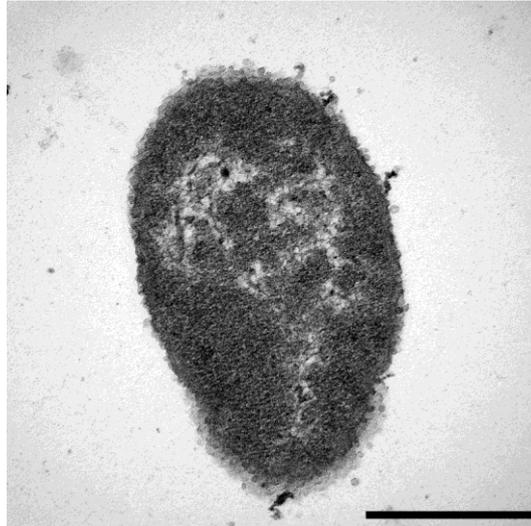


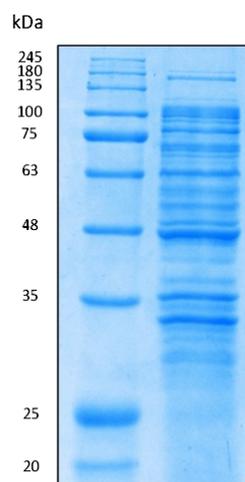
Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69. (A) EPEC mit gebündelten Flagellen, (B) Detailansicht von A, (C) EPEC mit drei, auf der Bakterienoberfläche verteilten Flagellen, (D) Detailansicht von C. Der EPEC E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Präparation des EPEC E2348/69 für die Negativ-Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Zur Kontrastierung wurden die Bakterien mit 1% Phosphorwolframsäure für 40 s inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

In einem Experiment, durchgeführt von Jessyca Gonzalez, konnte eine ausgeprägte Produktion von OMVs des EPEC E2348/69 bei der Infektion von Muzin-produzierenden HT29-MTX-E12-Zellen gezeigt werden. In Abbildung 11 lassen sich rundliche, der äußeren Membran anliegende Strukturen beschreiben. Der EPEC E2348/69 ist folglich für die Produktion von OMVs kompetent.



**Abbildung 11** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 nach der Infektion von Muzin-produzierenden HT29-MTX-E12-Zellen. Der EPEC E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Infektion eines konfluenten Monolayers von HT29-MTX-E12-Zellen erfolgte mit einer MOI von 20 für 2 h. Abgebildet ist ein nicht-adhärenter EPEC E2348/69, der eine Produktion von *outer membrane vesicles* (OMVs) aufweist. Die Präparation des EPEC E2348/69 und Färbung für die TEM erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Der Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

Die Analyse des Ganzzelllysats des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue ergab das in Abbildung 12 dargestellte Bandenmuster. Die durchgeführten Western Blotting Analysen identifizierten die Proteine, BfpA, EspD und Tir im Proteom des EPEC E2348/69 (s. 4.2.4.).



**Abbildung 12** Ganzzelllysats des EPEC E2348/69. Der EPEC E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Gewinnung der Bakterien aus der Suspension geschah durch Sedimentation bei 4°C und 9.300 x g für 5 min. Das Sediment wurde in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für 15 min denaturiert und anschließend erfolgte eine Trennung der Proteine mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 12,5%igen Trenngel. Eine Coomassie Brilliant Blue-Färbung zur Visualisierung der Banden wurde durchgeführt.

#### 4.1.2. *Lactobacillus rhamnosus*

##### 4.1.2.1. *Lactobacillus rhamnosus* W65

Der *Lactobacillus rhamnosus* W65 wurde von Winlove Probiotics B.V. (Amsterdam, NLD) als probiotischer Bakterienstamm klassifiziert. Die Einordnung in diese Gruppe erfolgte aufgrund der nach einer Inkubation mit dem *Laktobazillus*-Stamm an intestinalen Epithelzellverbänden beobachteten Barriere-stabilisierenden Eigenschaften. Die Beurteilung der Barriestabilität erfolgte anhand von TEER (*transepithelial electrical resistance*)-Messungen.

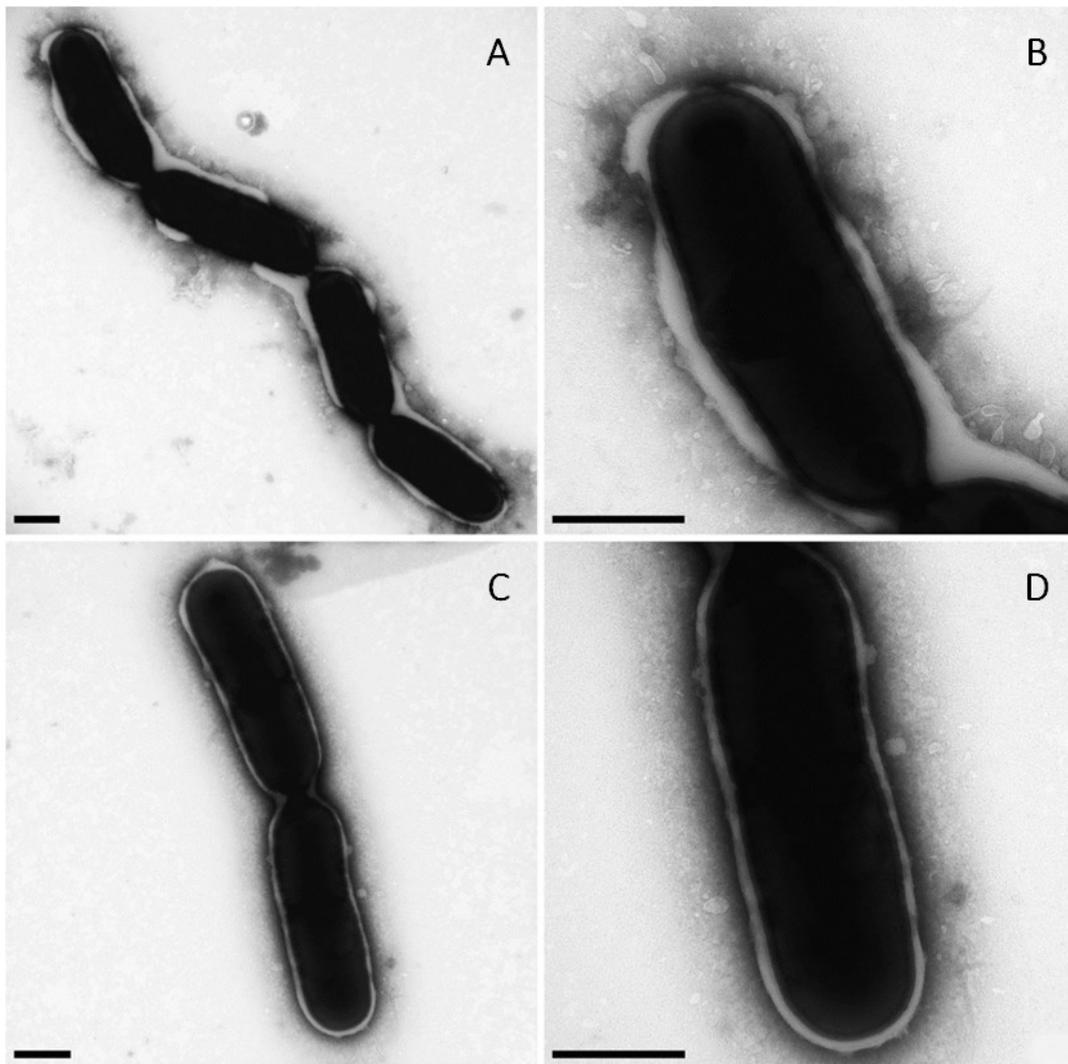
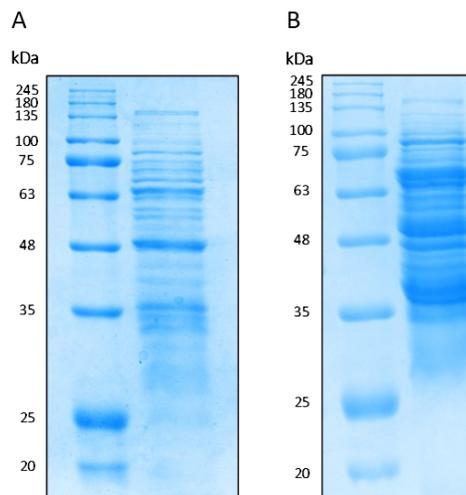


Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *Lactobacillus rhamnosus* W65. (A,C) Übersichten, (B,D) Detailaufnahmen. Der *Lactobacillus rhamnosus* W65 wurde bei 37°C für 22 h in *Lactobacillus*-Bouillon (MRS-Medium) angezogen. Die elektronenmikroskopische Analyse wurde von Lilo Greune (Institut für Infektiologie) durchgeführt. Zur Kontrastierung wurden die Bakterien für 1 min mit 1% Phosphorwolframsäure inkubiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 500 nm.

Der *Lactobacillus rhamnosus* W65 liegt vereinzelt sowie in Ketten in der Bakteriensuspension vor. In der Elektronenmikroskopie zeigt er sich überzogen mit einer dicken Schleimschicht (s. Abbildung 13). Nach Abschluss des Teilungsprozesses bleiben zum Teil Brücken der Substanz zwischen den Bakterien zurück. Andere Oberflächenstrukturen wurden bisher nicht beobachtet.

Die Analyse des *Lactobacillus rhamnosus* W65-Ganzzelllysats und des zellfreien Kulturüberstands mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab folgende, in Abbildung 14 dargestellte Bandenmuster.



**Abbildung 14** Ganzzelllysat (A) und zellfreier Kulturüberstand (B) des *Lactobacillus rhamnosus* W65. Der *Lactobacillus rhamnosus* W65 wurde bei 37°C für 22 h in *Lactobacillus*-Bouillon (MRS-Medium) angezogen. Nach Sedimentation bei 4°C und 9.300 x g für 5 min wurden Bakterien-Sediment und Kulturüberstand voneinander getrennt. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Spritzenfilter steril filtriert. Nach Fällung der Proteine mittels TCA-Fällung wurde das Sediment, ebenso wie das Bakterien-Sediment in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für 15 min denaturiert und anschließend erfolgte eine Trennung der Proteine mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 12,5%igen Trenngel. Eine Coomassie Brilliant Blue-Färbung zum Nachweis der Proteinbanden wurde durchgeführt.

#### 4.1.2.2. *Lactobacillus rhamnosus* 1121

Der *Lactobacillus rhamnosus* 1121 wurde von der Pharma-Zentrale GmbH (Herdecke, GER) zur Verfügung gestellt. Die TEER (*transepithelial electrical resistance*)-Messungen, zur Klassifizierung als probiotischer Bakterienstamm, erfolgten im Institut für Infektiologie. Der Barriere-stabilisierende Effekt auf Monolayer von intestinalen Epithelzellen nach Inkubation mit dem Bakterienstamm konnte gezeigt werden.

Der *Lactobacillus rhamnosus* 1121 ist fast ausschließlich in langen Ketten vorzufinden. Die Abgrenzung der einzelnen Bakterienzellen innerhalb einer Kettenstruktur ist hier nicht gut möglich. Einzelne Bakterien liegen bogenförmig vor, andere sind geradlinig formiert und erreichen eine Länge von

bis zu 15  $\mu\text{m}$ . Eine Kapselstruktur ist auch bei diesem Stamm zu beschreiben. Die Kapsel besteht aus einer hellen, der Bakterienwand anliegenden Schleimschicht und einer elektronendichteren, vermutlich aus Zuckerstrukturen bestehenden äußeren Schicht (s. Abbildung 15).

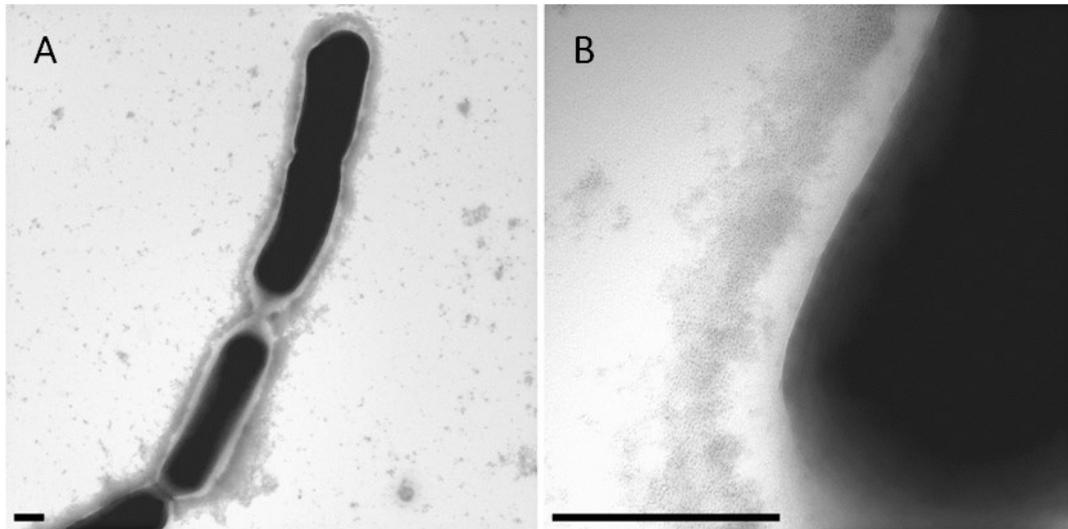


Abbildung 15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *Lactobacillus rhamnosus* 1121. (A) Übersicht, (B) Detailaufnahme der Kapselstruktur. Der *Lactobacillus rhamnosus* 1121 wurde bei 37°C für 22 h in *Lactobacillus*-Bouillon (MRS-Medium) angezogen. Die elektronenmikroskopische Analyse wurde von Lilo Greune (Institut für Infektiologie) durchgeführt. Zur Kontrastierung wurden die Bakterien für 1 min mit 1% Phosphorwolframsäure inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht in (A) 1  $\mu\text{m}$ , in (B) 300 nm.

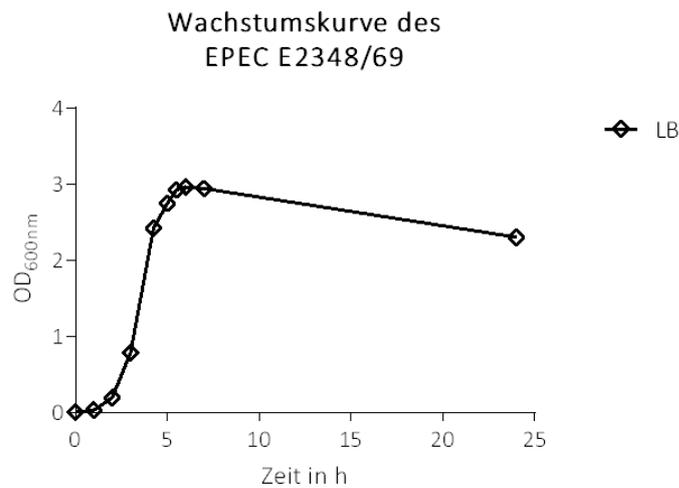
## 4.2. Wachstumsverhalten des enteropathogenen *Escherichia coli* Stamms E2348/69 in unterschiedlichen Medien

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse des Wachstumsverhaltens vom enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 in LB-Kultur, MRS-Kultur und LB-MRS-Mischkultur beschrieben. Untersucht wurden dabei die Wachstumskurven, die Morphologie des Pathogens, die Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene sowie abschließend die Expression entsprechender Proteine im Western Blot. Die Analysen werden den Inkubationsstudien (s. 4.3.) vorangestellt und sollen zum besseren Verständnis der beeinflussenden Faktoren beitragen.

### 4.2.1. Analyse der Wachstumskurve anhand der optischen Dichte der Bakteriensuspension

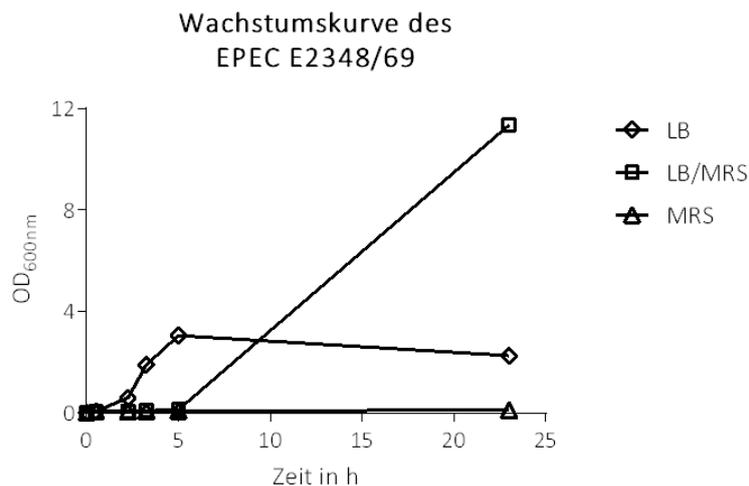
Die Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspension bei 600nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) zeigt beim Wachstum von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69 in einer LB-Flüssigkultur in Abbildung 16 eine charakteristische Kurve. Nach Durchlaufen der Latenz- und der exponentiellen Phase wird die stationäre Phase nach 5 bis 6 Stunden erreicht. Die Kultur erreicht ein  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ -Maximum von 3,0 und die

Auszählung der Bakterienzellzahl mit der Neubauer Kammer ergab eine Konzentration von  $2 \times 10^9$  Bakterien pro ml.



**Abbildung 16** Wachstum des EPEC E2348/69 in LB-Medium. Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min in LB-Medium angezogen. Die Messungen erfolgten ab einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 in 1:10-Verdünnung in einer Einmal-Halbmikrometervküvette am Eppendorf BioPhotometer®.

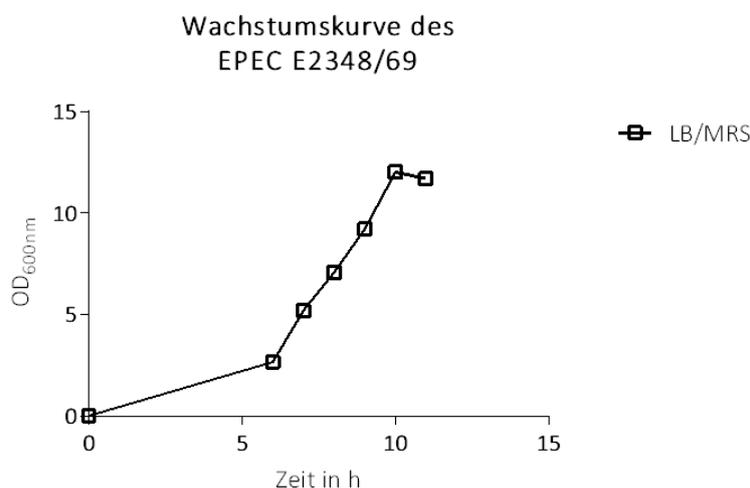
Das Wachstum des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 in unterschiedlichen Flüssigkulturen lässt sich in Abbildung 17 darstellen. Die LB-MRS-Mischkultur wurde im Volumenverhältnis 1:1 angesetzt.



**Abbildung 17** Wachstum des EPEC E2348/69 in verschiedenen Medien. Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min in verschiedenen Medien angezogen. Die Messungen erfolgten ab einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 in 1:10-Verdünnung in einer Einmal-Halbmikrometervküvette am Eppendorf BioPhotometer®.

Für die MRS-Reinkultur ist keine Zunahme der  $OD_{600nm}$  und somit kein Bakterienwachstum zu dokumentieren. Die *Lactobacillus*-Bouillon stellt für den enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 kein kompetentes Nährmedium dar.

Zu Beschreiben ist die Wachstumskurve des in LB-MRS-Mischkultur gewachsenen enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69. Bei Kultivierungsbeginn, innerhalb der ersten 5 Stunden, zeigt sich ein linearer Anstieg mit einer durchschnittlichen Zunahme der  $OD_{600nm}$  von 0,017 pro Stunde. Aufgrund der niedrigen Steigung wird das Zeitsintervall [0 h, 5 h] der Latenzphase zugeordnet. Die Messung zum Zeitpunkt  $t = 23$  h ergab eine  $OD_{600nm}$  von 12. Dies entspricht einem, um den Faktor 4, höheren Wert als für den in LB-Medium kultivierten EPEC E2348/69. Zur Analyse des Wachstumsverlaufs zwischen den Messzeitpunkten  $t = 5$  h und  $t = 23$  h wurden weitere Messungen durchgeführt (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18** Wachstum des EPEC E2348/69 in LB-MRS-Mischkultur. Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min in LB-MRS-Mischkultur angezogen. Die Messungen erfolgten ab einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 in 1:10-Verdünnung in einer Einmal-Halbmikrometervküvette am Eppendorf BioPhotometer®.

Das Wachstum des EPEC E2348/69 in LB-MRS-Mischkultur zeigt einen linearen Anstieg der optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) der Bakteriensuspension. Die durchschnittliche Zunahme der  $OD_{600nm}$  entspricht im Zeitintervall [6 h, 10 h] einem Wert von 2,3 pro Stunde. Dieser ist um den Faktor 135 größer als die Steigerung zwischen den Zeitpunkten  $t = 0$  und  $t = 5$  von 0,017. Die Präsenz des MRS-Mediums scheint die Latenzphase zu verlängern und den Eintritt in die exponentielle Phase zu verhindern. Nach Einstellen des linearen Wachstums mit einer Steigung  $m_{OD_{600nm}} = 2,3$  erfolgt ein Wachstum über 4 Stunden, sodass die maximale  $OD_{600nm}$  von 12 erreicht wird. Da keine direkte Proportionalität zwischen der optischen Dichte bei 600nm und der Bakterienzellzahl vorliegt, ist der Rückschluss auf eine um den Faktor 4 höhere Konzentration von Bakterien pro ml nicht zulässig. Die Zunahme der  $OD_{600nm}$  kann neben der erhöhten Zellzahl auf eine veränderte Größe und vermehrte Aggregation der Bakterien hinweisen.

Eine Bakterienzellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer ergab einen Wert von  $3,5 \times 10^9$  Bakterien pro ml. Dies entspricht einer, um den Faktor 1,75 größeren Bakterienpopulation im Vergleich zur in LB-Medium gewachsenen Kultur.

#### **4.2.2. Mikroskopische Analyse des EPEC E2348/69**

Neben der Auszählung der Bakterienzellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer, ermöglicht die Lichtmikroskopie eine grobe Beurteilung der Morphologie der untersuchten Bakterien. Die Verwendung eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung ergab folgende Beobachtungen. Der in LB-Medium gewachsene EPEC E2348/69 zeigte sich in einzelnen, rundlich erscheinenden Strukturen. Im direkten Vergleich zeigt sich der in LB-MRS-Mischkultur gewachsene EPEC E2348/69 länglicher und etwas deformiert. Die Bewegung der Bakterien scheint erhöht.

Die von Lilo Greune (Institut für Infektiologie) durchgeführte elektronenmikroskopische Analyse konnte diese Beobachtungen bestätigen. Die in LB-MRS-Mischkultur gewachsenen EPEC E2348/69 liegen als einzelne Bakterien, in Haufen und auch in längeren Ketten vor. In den Zellaggregaten, dargestellt in Abbildung 19A, sind die einzelnen Bakterien relativ schlecht voneinander abzugrenzen. Diese Bakterienzellaggregate führen zu einer stärkeren Streuung und Absorption des Lichts im Spektralphotometer und erklären die Zunahme der optischen Dichte. Die enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 liegen in unterschiedlichen Größen in der Kultur vor. Sie stellen sich, wie in der Lichtmikroskopie vermutet, ungleichmäßig formiert und zum Teil länger dar. In Abbildung 19B zeigen sich drei einander anliegende Bakterien unterschiedlicher Längenausprägung. Von links nach rechts lassen sich Längen von  $4,6 \mu\text{m}$ ,  $3,0 \mu\text{m}$  und  $2,5 \mu\text{m}$  dokumentieren. Die in LB-Medium gewachsenen Bakterien erreichen Maße von  $0,8 \mu\text{m}$  Breite und  $1,5 \mu\text{m}$  Länge. Dies beschreibt eine Längenzunahme auf maximal das 3-fache. Einschnürungen der Bakterienzelloberfläche, zur Vorbereitung der Zellteilung, sind nicht zu erkennen. Eine Zellteilungsstörung scheint nicht vorzuliegen.

Im Kulturüberstand finden sich viele freie, abgescherte Flagellen. Das vermehrte Vorkommen von Flagellen auf der Bakterienzelloberfläche führt zur erhöhten Motilität. Dies bestätigt die lichtmikroskopischen Beobachtungen. Die Rolle in der Vermittlung bakterieller Interaktion und Aggregation zeigt sich in Abbildung 19C und E in der Verbindung zweier Bakterien durch das Verdrillen der Flagellenstrukturen.

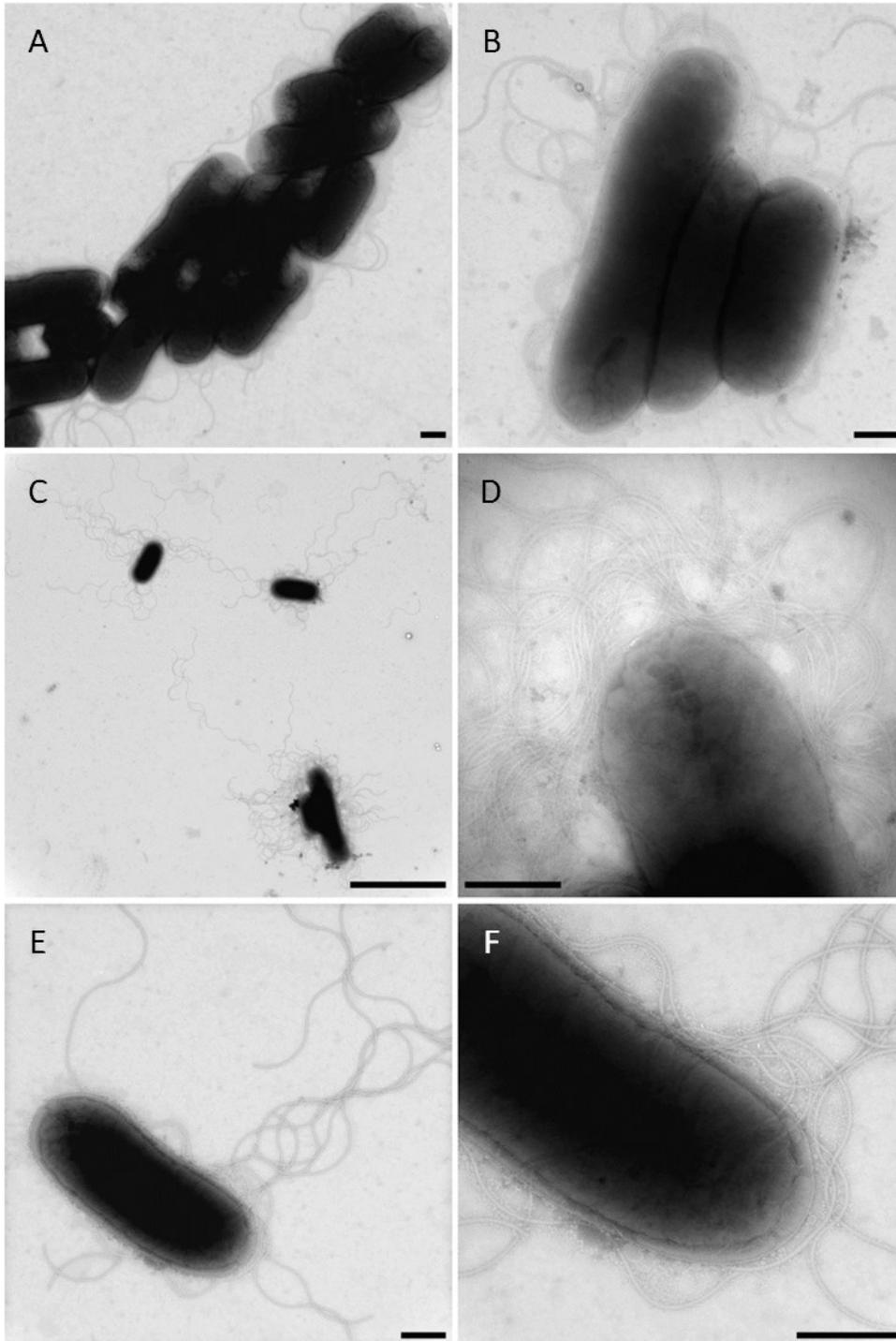


Abbildung 19 Enteropathogener *Escherichia coli* E2348/69 gewachsen in LB-MRS-Mischkultur (A-F). Der EPEC E2348/69 wurde bei 37°C und 180 U/min über Nacht in LB-MRS-Mischmedium im Verhältnis 1:1 angezogen. Die Präparation des EPEC E2348/69 für die Negativ-Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Zur Kontrastierung wurden die Bakterien für 40 s mit 1% Phosphorwolframsäure inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht in (A,B,D,E,F) 500 nm, in (C) 5 µm.

Die elektronenmikroskopische Analyse des in LB-MRS-Mischmedium gewachsenen enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 konnte kein Vorkommen von *outer membrane vesicles* (OMVs) dokumentieren.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich die Morphologie der in LB-MRS-Mischmedium gewachsenen EPEC E2348/69 in verschiedenen Charakteristika von den in LB-gewachsenen Bakterien unterscheiden. In einer Übernachtkultur wachsen  $3,5 \times 10^9$  Bakterien pro ml, dies entspricht der 1,75-fachen Menge einer in LB-Medium gewachsenen Kultur. Die Länge der Bakterien zeigt sich mit Maximalwerten von  $4,6 \mu\text{m}$  auf das Dreifache erhöht. Ebenso erhöht ist die Anzahl der Flagellen pro Bakterium. Dies alles spricht dafür, dass die Konditionen des Mischmediums für die Bakterien eine Stresssituation darstellen. Auf diese Umstände reagiert der Bakterienstoffwechsel mit der Hochregulation von Virulenzeigenschaften, wie in diesem Fall der vermehrten Expression von Flagellen auf der Zelloberfläche.

#### 4.2.3. Analyse der Virulenzgenexpression des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69

Um die Hypothese der gesteigerten Virulenz des EPEC E2348/69 nach Wachstum in LB-MRS-Mischmedium weiter zu untersuchen, wurden die Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene analysiert. Betrachtet wurden die Virulenzgene *eae*, codierend für das Intimin-Protein, *bfpA*, codierend für die Untereinheit A des Bundlin-Proteins, und *espD*, codierend für eines der Translokatorproteine des *Type III secretion systems* (TTSS), des Injektionsapparates des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69.

Die Analyse der Transkriptionsraten des EPEC E2348/69, gewachsen in LB-MRS-Mischmedium, weist auf eine Steigerung der Genexpression der ausgewählten Virulenzgene hin. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse im Verhältnis zur in LB-Medium gewachsenen Kontrolle dargestellt.

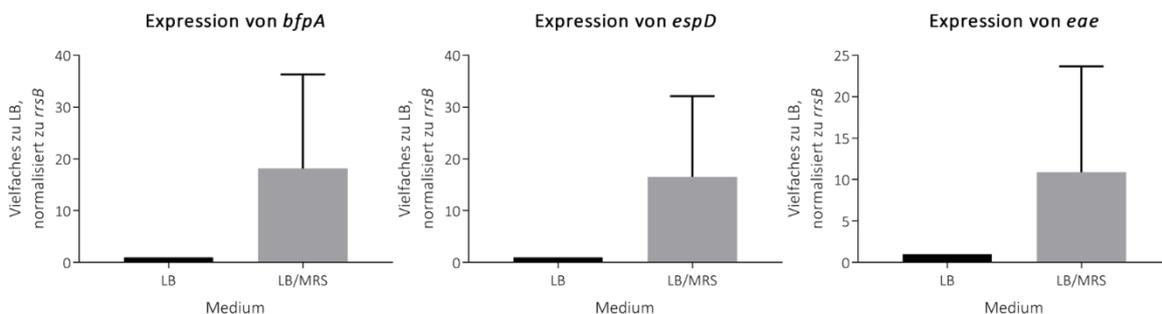


Abbildung 20 Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene des EPEC E2348/69 nach erfolgtem Wachstum in verschiedenen Medien. Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 U/min in unterschiedlichen Medien angezogen. Anschließend erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA und die Ge-

nexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zur Normalisierung der Daten wurde das Referenzgen *rrsB* verwendet. Dargestellt sind Transkriptionsraten der in LB-MRS-Mischmedium gewachsenen EPEC E2348/69 im Verhältnis zur in LB-Medium gewachsenen Kontrolle. Die Daten wurden in vier unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte keine Signifikanz.

Der Abbildung 20 zu entnehmen ist eine mittlere Steigerung der Transkriptionsraten von Vielfachwerten zwischen 10 und 18 für die drei unterschiedlichen Virulenzgene. Die erhobenen Daten zeigen eine Tendenz, die jedoch bisher keine Signifikanz zeigt.

#### 4.2.4. Analyse der Proteinexpression im Western Blot

Anschließend an die Analysen der Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene wurde die Expression der entsprechenden, bzw. der mit ihnen assoziierten Proteine im Western Blot untersucht. Für die untersuchten Gene *bfpA* und *espD* standen Antikörper gegen die von ihnen codierten Proteine BfpA (für: *bundle forming pili, subunit A*) und EspD (für: *Escherichia coli Type III secretion system protein D*) zur Verfügung. Das Protein Tir (für: *translocated intimin receptor*) wurde als Protein, assoziiert mit dem Protein Intimin, codiert von dem zuvor analysierten Gen *eae*, ausgewählt. Die genannten Proteine wurden in Ganzzelllysaten von enteropathogenem *Escherichia coli* E2348/69 detektiert und bei Möglichkeit quantifiziert. Einen Überblick bietet die Abbildung 21. Das *bfpA*-Gen codiert das BfpA-Protein mit einem Molekulargewicht von 19,5 kDa. Das EspD-Protein besitzt umfasst Molekülgröße von circa 40 kDa und der *translocated intimin receptor* (Tir) liegt vorwiegend mit einer Größe von circa 72 kDa vor. In der Arbeit von Elliott et al. [90] wurde das Auftreten unterschiedlicher Größen im Western Blot von circa 70 und 80 kDa beschrieben.

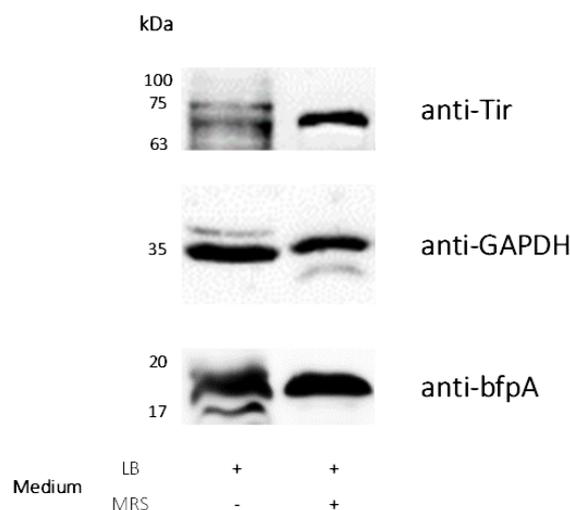


Abbildung 21 Immunchemischer Nachweis von ausgewählten Virulenzproteinen. Nach gelelektrophoretischer Trennung der Ganzzelllysate des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 erfolgte der Transfer der

Proteine nach dem *semi-dry* Western Blot-Verfahren. Anschließend wurde ein immunchemischer Nachweis mithilfe von spezifischen Antikörpern und eine Detektion mithilfe der Luminolreaktion durchgeführt.

Der *translocated intimin receptor* ist in der Probe, gewachsen in LB-MRS-Mischmedium, definiert in der Molekülgröße abgebildet (s. Abbildung 22). Orientierend an dem Proteingrößenstandard kann eine Größe von circa 72 kDa angenommen werden. Die in LB-Medium gewachsene Probe zeigt ein diffuses Muster im Bereich der Molekülgröße zwischen 70 und 75 kDa. Das Vorliegen von Vorstufen oder unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen des Tir könnte dieses Muster erklären. Zusätzlich treten Banden niedriger molekularer Massen auf.

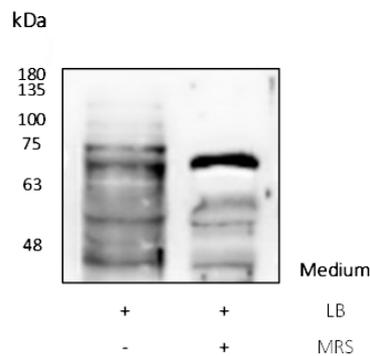


Abbildung 22 Immunchemischer Nachweis von Tir (*translocated intimin receptor*) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. Auftrennung der EPEC E2348/69-Ganzzelllysate im 12,5%igen Polyacrylamidgel mit anschließendem *semi-dry* Western Blotting und immunchemischem Proteinnachweis.

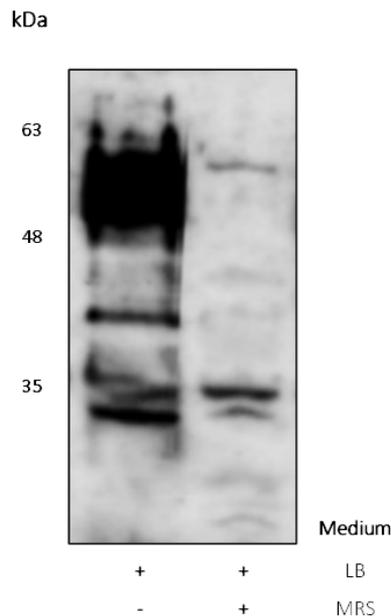
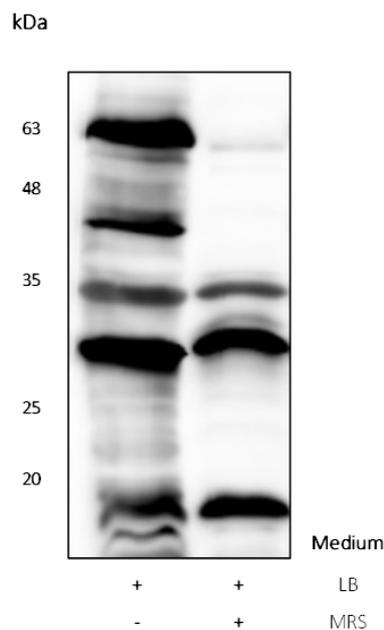


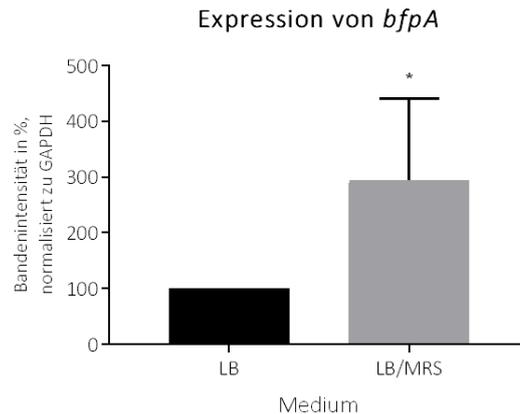
Abbildung 23 Immunchemischer Nachweis von EspD (*Escherichia coli* Type III secretion system protein D) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. Trennung der EPEC E2348/69-Ganzzelllysate im 12,5%igen Polyacrylamidgel mit anschließendem *semi-dry* Western Blotting und immunchemischem Proteinnachweis.

Der immunchemische Proteinnachweis von EspD im EPEC-Ganzzelllysate zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Medium-Konditionen auf (s. Abbildung 23). Das EspD-Protein, mit einer Molekülgröße von 40 kDa, kann in den Ganzzelllysaten des in LB-Medium gewachsenen enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 detektiert werden. In der in LB-MRS-Mischmedium gewachsenen Bakterienkultur hingegen zeigt sich kein Signal. Aufgetragen wurden die gleichen Proteinmengen. Dies ließ sich durch eine Mengenbestimmung des Referenzproteins GAPDH bestätigen.



**Abbildung 24** Immunchemischer Nachweis von BfpA (*bundle forming pili, subunit A*) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. Trennung der EPEC E2348/69-Ganzzelllysate im 15%igen Polyacrylamidgel mit anschließendem *semi-dry* Western Blotting und immunchemischem Proteinnachweis.

Unter Verwendung des Antiserums gegen rekombinantes Pre-Bundlin aus EPEC E2348/69 wurden Proteinbanden unterschiedlicher Größe detektiert (s. Abbildung 24). Von Interesse ist das Protein BfpA (*bundle forming pili, subunit A*) mit einer Größe von 19,5 kDa. Die Proteinbande des BfpA-Proteins zeigt sich nach Wachstum im LB-MRS-Mischmedium schärfer abgegrenzt und in höherer Intensität. Eine quantitative Analyse, unter Berücksichtigung der GAPDH-Referenz, zeigt eine signifikante Steigerung ( $p$ -Wert  $< 0,05$  (\*)) der BfpA-Expression auf im Mittel circa 300 % (s. Abbildung 25). Dies bestätigt die, in 4.2.3. ausgeführte, Analyse der Transkriptionsraten, die mit Hilfe der *quantitative real-time* PCR durchgeführt wurde.



**Abbildung 25** Densitometrische Analyse der BfpA-Banden im Western Blot. Dargestellt ist die Bandenintensität in % der in LB-MRS-Mischmedium gewachsenen Kultur im Verhältnis zur LB-Medium-Kontrolle. Die Normalisierung erfolgte mit dem Referenzprotein GAPDH. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte einen p-Wert < 0,05 (\*).

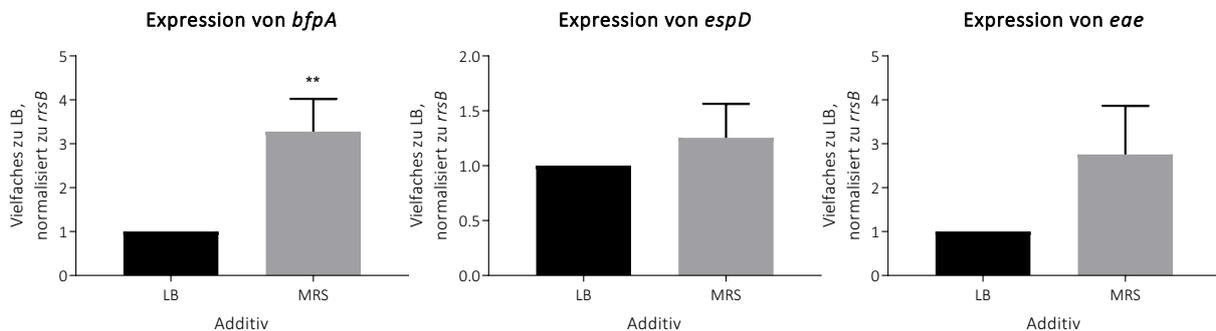
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das LB-MRS-Mischmedium einen Einfluss auf die Proteinexpression des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 hat. Nach Western Blotting Analyse der ausgewählten Virulenzproteine zeigen sich Unterschiede im Bandenmuster im Vergleich zur in LB-Medium gewachsenen EPEC E2348/69-Probe. Für alle drei Proteinnachweise gilt, die Anzahl der detektierten Banden in der LB-MRS-Mischkultur gewachsenen Probe ist geringer und die Abgrenzung schärfer als in der LB-Medium-Kontrolle.

#### 4.3. Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69

Der Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 wurde im Rahmen von Inkubationsstudien (beschrieben in 3.1.5.) untersucht. Dabei wurden die Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene mittels qRT-PCR ermittelt. Die folgenden Versuche schließen thematisch an die in Kapitel 4.2.3. beschriebenen Ergebnisse an.

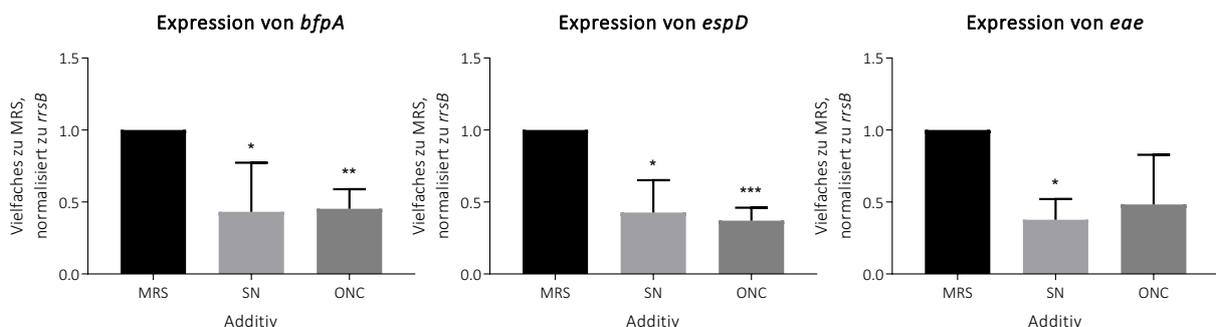
Zur Vorbereitung der Inkubationsstudien mit dem *Lactobacillus rhamnosus* W65 wurde untersucht, ob die Steigerung der Transkriptionsraten der ausgewählten Virulenzgene bei einer Inkubation über den Zeitraum von 6 h mit der *Lactobacillus*-Bouillon ebenfalls festzustellen ist (vgl. 4.2.3.). Die Darstellung der erhobenen Daten in Abbildung 26 zeigt eine signifikante Steigerung (p-Wert < 0,01 (\*\*)) der *bfpA*-Expression. Insgesamt beläuft sich die Zunahme der Transkriptionsraten maximal auf das Dreifache der Kontrolle. Die Bakterien der Übernachtskultur, die für circa 16 h aus einer einzelnen Kolonie

angewachsen sind, weisen in der Analyse deutlich höhere Vielfachwerte von 18, 16,5 und 10,8 auf. Dies könnte auf die längere Inkubationszeit zurückzuführen sein.



**Abbildung 26** Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene des EPEC E2348/69 nach Inkubation für 6 h mit LB- und MRS-Medium. Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde über Nacht bei 37°C und 180 U/min angezogen. Am Folgetag wurde eine Inkubation für 6 h mit verschiedenen Additiven unter Rotation auf einem Rollenmischer bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA und die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zur Normalisierung der Daten wurde das Referenzgen *rrsB* verwendet. Dargestellt sind Transkriptionsraten der mit MRS-Medium inkubierten EPEC E2348/69 im Verhältnis zur mit LB-Medium inkubierten Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte für *bfpA* einen p-Wert < 0,01 (\*\*), für *espD* und *eae* jedoch keine Signifikanz.

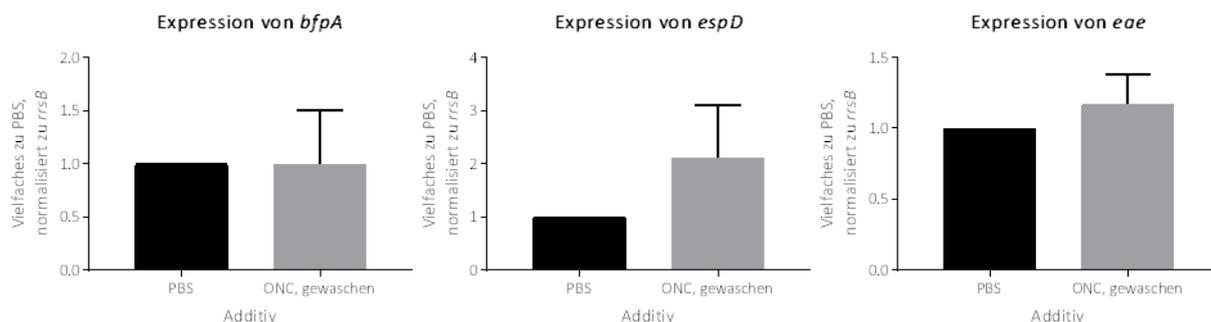
Im Rahmen der Inkubationsstudien wurde der Einfluss der *Lactobacillus rhamnosus* W65 Übernachtskultur sowie die Wirkung des zellfreien Kulturüberstands auf die Genexpression der ausgewählten Virulenzgene des EPEC E2348/69 untersucht. Die Kontrolle wird in den folgenden Ansätzen durch das MRS-Additiv abgebildet. Eine Abnahme der Virulenzgenexpression des EPEC E2348/69 nach Inkubation mit *Lactobacillus rhamnosus* Übernachtskultur und zellfreiem Kulturüberstand ist zu erkennen. Die Signifikanzniveaus sind Abbildung 27 zu entnehmen. Eine nennenswerte Differenz zwischen dem Effekt der Kultur und dem des Überstands ist nicht sichtbar. Dies lässt die Interpretation zu, dass die möglicherweise für die Reduktion verantwortlichen Bestandteile im Kulturüberstand vorliegen.



**Abbildung 27** Inkubationsansatz mit *Lactobacillus rhamnosus* W65 Übernachtskultur (ONC) und zellfreiem Kulturüberstand (SN). Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde über Nacht bei 37°C und 180 U/min

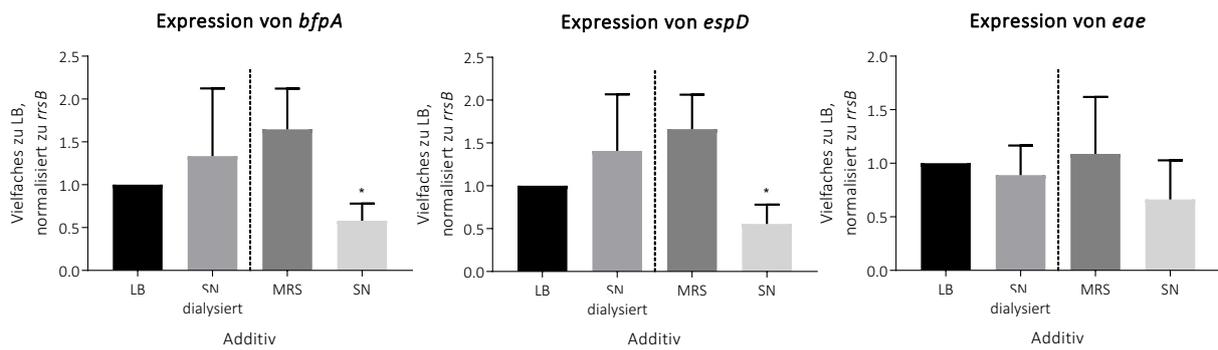
angezogen. Am Folgetag wurde eine Inkubation für 6 h mit verschiedenen Additiven unter Rotation auf einem Rollenmischer bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA und die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zur Normalisierung der Daten wurde das Referenzgen *rrsB* verwendet. Dargestellt sind Transkriptionsraten der mit *Lactobacillus rhamnosus* W65 Übernachtkultur und zellfreiem Überstand inkubierten EPEC E2348/69 im Verhältnis zur mit MRS-Medium inkubierten Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte die angegebenen Signifikanzen berechnet zur MRS-Kontrolle (p-Wert < 0,05 (\*), p-Wert < 0,01 (\*\*), p-Wert < 0,001 (\*\*\*)).

Um zu untersuchen, ob die Milchsäurebakterien ohne die Präsenz ihres Kulturüberstands einen Effekt auf die Genexpression des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 ausüben, wurden Inkubationsansätze mit PBS-gewaschener *Lactobacillus rhamnosus* W65 Kultur durchgeführt. Als Kontrolle diente reines *Dulbecco's phosphate buffered saline* (D-PBS) mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Einen reduktiven Effekt der gewaschenen Bakterienkultur auf die Transkriptionsraten von *bfpA*, *EspD* und *eae* des EPEC E2348/69 konnte nicht beobachtet werden (s. Abbildung 28).



**Abbildung 28** Inkubationsansatz mit PBS-gewaschener *Lactobacillus rhamnosus* W65 Übernachtkultur (ONC, gewaschen). Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde über Nacht bei 37°C und 180 U/min angezogen. Am Folgetag wurde eine Inkubation für 6 h mit verschiedenen Additiven unter Rotation auf einem Rollenmischer bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA und die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zur Normalisierung der Daten wurde das Referenzgen *rrsB* verwendet. Dargestellt sind Transkriptionsraten der mit in PBS gewaschener *Lactobacillus rhamnosus* W65 Übernachtkultur inkubierten EPEC E2348/69 im Verhältnis zur mit PBS inkubierten Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte keine Signifikanz.

Die Hypothese, dass Bestandteile des Kulturüberstands an der Reduktion der Transkriptionsraten beteiligt sind, wurde in den folgenden Experimenten weiter untersucht. Um den Virulenz-induzierenden Effekt des MRS-Mediums zu eliminieren und eine Identifikation der beteiligten Strukturen zu ermöglichen, wurde eine Dialyse des Kulturüberstands gegen LB-Medium durchgeführt. Für die Dialyse wurde ein Dialyse-Kompartiment mit einer Ausschlussgrenze bei einer molekularen Masse von 10 kDa gewählt. Die Dialyse gegen LB-Medium erfolgte über Nacht bei 4°C, um den Erhalt der Proteinstrukturen zu gewährleisten.



**Abbildung 29** Inkubationsansatz mit zellfreiem *Lactobacillus rhamnosus* W65 Überstand, nativ (SN) und dialysiert gegen LB-Medium (SN, dialysiert). Der enteropathogene *Escherichia coli* E2348/69 wurde über Nacht bei 37°C und 180 U/min angezogen. Am Folgetag erfolgte eine Inkubation für 6 h mit verschiedenen Additiven unter Rotation auf einem Rollenmischer bei 37°C. Anschließend erfolgten die der Gesamt-RNA und die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zur Normalisierung der Daten wurde das Referenzgen *rrsB* verwendet. Dargestellt sind Transkriptionsraten der mit verschiedenen Additiven inkubierten EPEC E2348/69 im Verhältnis zur mit LB-Medium inkubierten Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte für den dialysierten Überstand zur LB-Kontrolle keine Signifikanz. Für den nativen Überstand zur MRS-Kontrolle zeigte sich für *bfpA* und *espD* eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 (\*).

Die Ergebnisse dieser Inkubationsstudien zeigen kein einheitliches Bild (s. Abbildung 29). Die Abnahme der Transkriptionsraten bei Inkubation mit dem zellfreien Kulturüberstand im Vergleich zur MRS-Medium-Kontrolle ist für das *bfpA*- und das *espD*-Gen mit einer Signifikanz (p-Wert < 0,05) zu zeigen. Der dialysierte Überstand hingegen zeigt im Vergleich zur LB-Medium-Kontrolle keine Reduktion.

#### 4.4. Adhärenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an das gastrointestinale Epithel

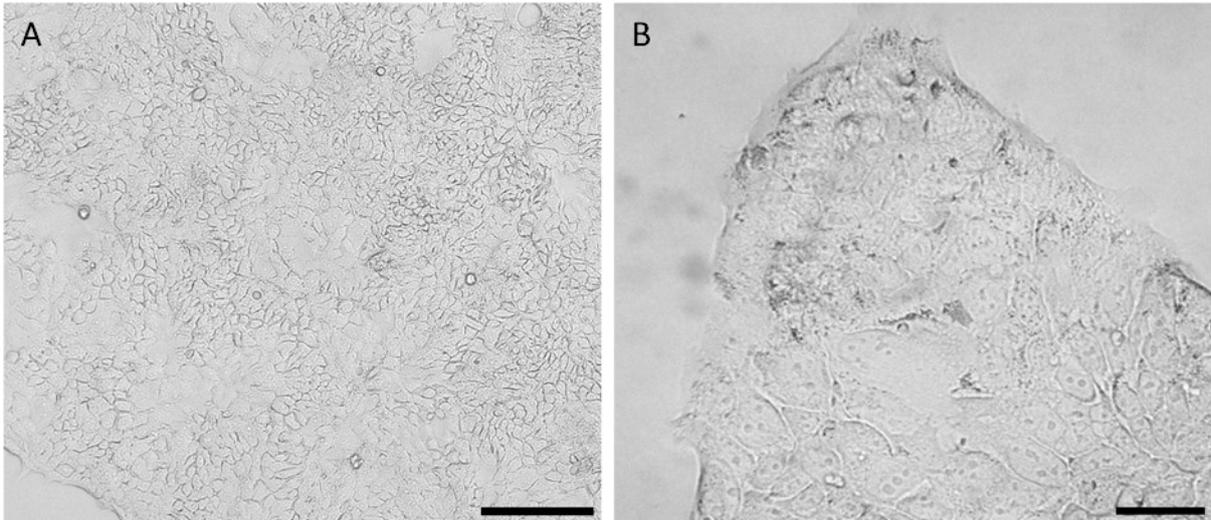
##### 4.4.1. Auswahl und Charakterisierung der *in vitro* Modelle

###### 4.4.1.1. T84-Zellen

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien vorgestellt. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie die fluoreszenzmikroskopischen Analysen werden den Adhärenzstudien (s. 4.4.2. und 4.4.3.) vorangestellt.

###### 4.4.1.1.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen

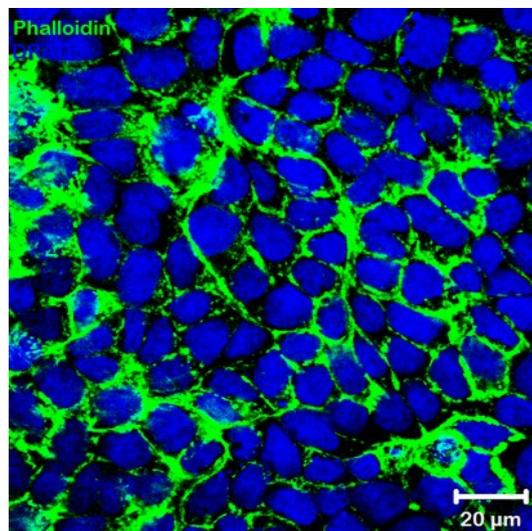
Die T84-Zelllinie wurde aus einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinoms eines 72-jährigen Mannes gewonnen. Die Epithelzellen bilden in der Zellkultur feste Monolayer unter Bildung von *Tight Junctions* und *Desmosomen* (s. Abbildung 30).



**Abbildung 30** Lichtmikroskopische Aufnahmen der T84-Zellen. (A) Monolayer unter 10-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Rand einer konfluent gewachsenen Zellinsel unter 40-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

#### 4.4.1.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

In der Fluoreszenzmikroskopie (s. Abbildung 31) zeigen sich die T84-Zellen im dichten Mono- und Multilayer.



**Abbildung 31** T84-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie. Nach einer Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern bis zur vollständigen Konfluenz erfolgte eine Fixierung mit 4% PFA. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit DRAQ5 (blau) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin Atto 488 (grün) gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop LSM 510.

Nach Infektion der T84-Zellen mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 lassen sich die adhärenenten Bakterien anhand der charakteristischen Podest-Bildung auf den eukaryotischen Zellen

nachweisen (s. Abbildung 32). Die Bildung von Mikrokolonien ist ein Hinweis auf die Expression der verschiedenen daran beteiligten Virulenzfaktoren und ein funktionierendes TTSS des Bakterienstammes. In Abbildung 32A sind Mikrokolonien des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 mit mehr als 30 Bakterien sichtbar. Eine Infektion mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 kann Zellstress induzieren und bis zum Zelltod führen. Die zentral gelegene Zelle in Abbildung 32A zeigt mit der Fragmentierung der nukleären Bestandteile Anzeichen eines apoptotischen Zelltods.

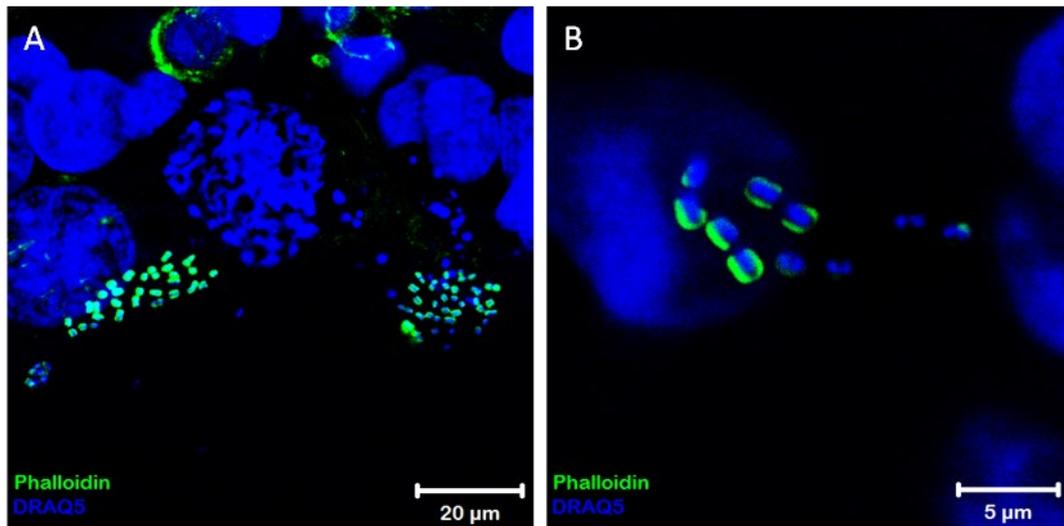
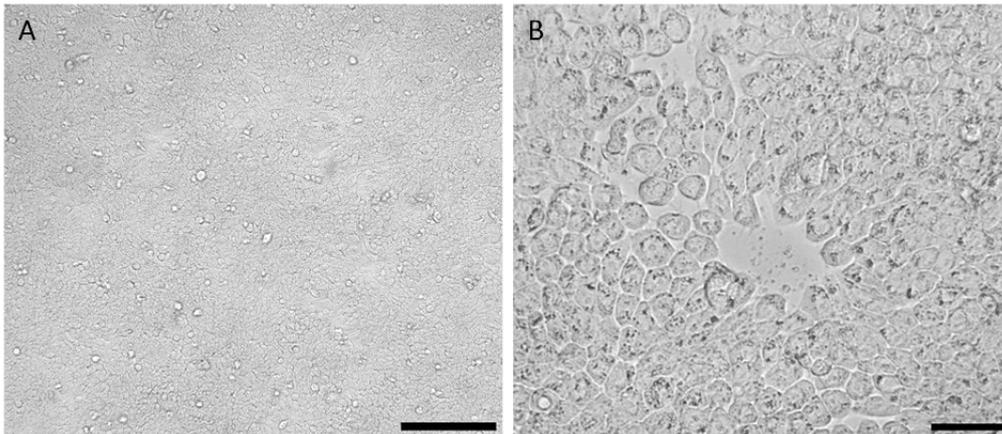


Abbildung 32 T84-Zellen, infiziert mit EPEC E2348/69 in der Fluoreszenzmikroskopie. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern bis zur vollständigen Konfluenz erfolgte eine Infektion mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1,5 für 3 h. Nach dem Waschen des Zelllayers mit PBS wurde eine Fixierung mit 4% PFA durchgeführt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit DRAQ5 (blau) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin Atto 488 (grün) gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop LSM 510. (A) Mikrokolonien des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69. Zentral gelegener, fragmentierter Nucleus. (B) Nahansicht der adhärenenten Bakterien. Darstellung der seitlich anliegenden Aktinverdichtungen an den blauen, DRAQ5-gefärbten Bakterien.

#### 4.4.1.2. HT29-Zellen

##### 4.4.1.2.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen

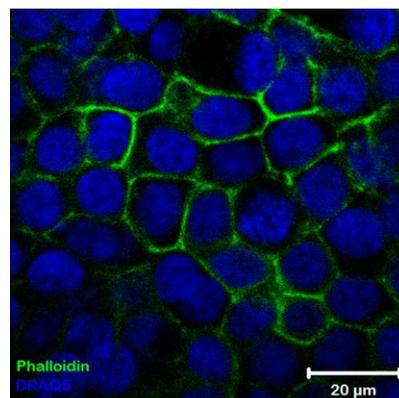
Die HT29-Zelllinie ist eine intestinale Epithelzelllinie, gewonnen aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen Frau. HT29-Zellen zeigen einen ausdifferenzierten Phänotyp mit apikalem Mikrovillisaum sowie gut ausgebildeten intrazellulären Strukturen (s. Abbildung 33).



**Abbildung 33** HT29-Zellen in der Lichtmikroskopie. (A) Monolayer unter 10-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Schmale Lücken im Monolayer unter 40-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

#### 4.4.1.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Eine Darstellung des Pathogens nach einer Infektion von HT29-Zellen mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 war in der Fluoreszenzmikroskopie nicht erfolgreich. Eine Bildung von Podest-Strukturen konnte nicht aufgefunden werden, dazu s. Abbildung 34. Möglicherweise war die *multiplicity of infection* (MOI) von 1,5 nicht ausreichend. Ebenfalls möglich wäre, dass eine schützende Muzin-Schicht, dessen Produktion von den HT29-Zellen bekannt ist, die Pathogene von einer direkten Adhärenz an die Zellmembran abhält.



**Abbildung 34** HT29-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern bis zur vollständigen Konfluenz erfolgte eine Fixierung mit 4% PFA. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit DRAQ5 (blau) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin Atto 488 (grün) gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop LSM 510.

Abbildung 35 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von ausgewählten *Tight Junctions* Proteinen der HT29-Zellen. Die HT29-Zellen wurden mit EPEC E2348/69 infiziert und für 4 Stunden inkubiert.

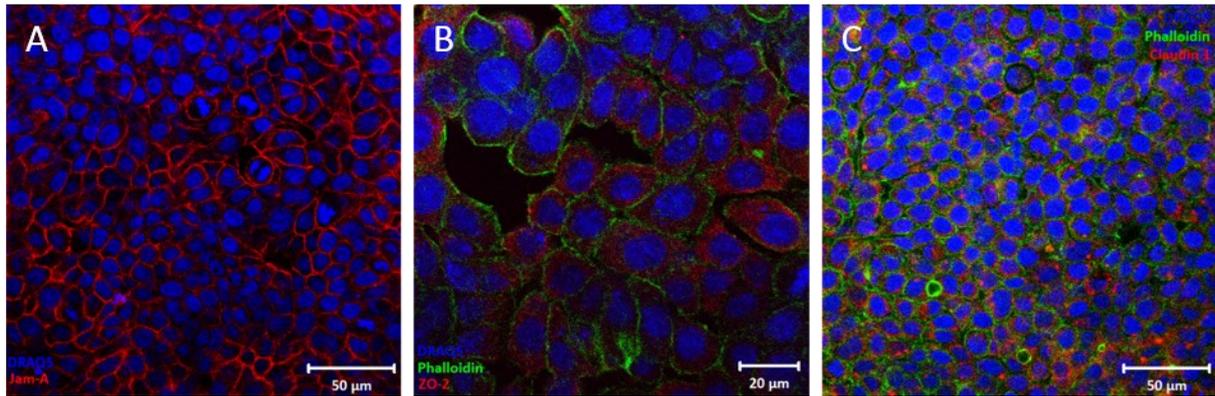


Abbildung 35 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EPEC E2348/69-infizierten HT29-Zellen. Darstellung der *Tight Junctions* Proteine Jam-A (A), ZO-2 (B) und Claudin 1 (C). Nach einer Infektionszeit von 4 h wurden die HT29-Zellen mit 4% PFA fixiert, anschließend erfolgte ein Quenchen mit 0,2% Glycin sowie eine Permeabilisierung mit 0,2% Triton X-100. Auf das Blocken mit 1% BSA folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti-Claudin 1, Anti-Jam-A, Anti-ZO-2), eine Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper und DRAQ5 sowie abschließend mit Phalloidin Atto 488. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop LSM 510.

#### 4.4.1.2.3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die von Lilo Greune (Institut für Infektiologie) durchgeführte elektronenmikroskopische Analyse ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Zelllinie. Die folgenden Aufnahmen zeigen 50 bis 60% konfluente, 3 Tage nach der Passagierung kultivierte HT29-Zellen. Abbildung 36 zeigt einen locker gewachsenen Monolayer mit polarisierten Zellen. Apikal zeigt sich ein Mikrovillisaum, wie er zur Vergrößerung der Resorptionsfläche im Darm dient. Zell-Zell-Kontakte sind vorhanden, jedoch in ihrer Ausprägung nicht besonders stark repräsentiert. In Abbildung 37 zeigen sich drei miteinander in Verbindung stehende Zellen. Die verschiedenen Zellkompartimente sind detailliert ausgeprägt. Die Mitochondrien, mit der Bildung ihrer Cristae, sind in Abbildung 38 sehr gut dargestellt. Teile des Golgi-Apparates sowie des rauen, Ribosomen-besetzten endoplasmatischen Retikulums sind abgebildet. Endosomen verschiedener Reifestadien sind in Abbildung 38 zu erkennen. Die Entwicklungsstadien der Endosomen unterscheiden sich unter anderem in der Beschaffenheit der sie begrenzenden Membran sowie der mit ihr assoziierten Proteine. Das Vorkommen von Clathrin-coats und die Präsenz der G-Proteine Rab4, 5 und 11 charakterisiert die frühen Endosomen. Späte Endosomen tragen Rab7 und Rab9, jedoch keine Clathrin-coats. Ein pH-Abfall, induziert durch ATP-getriebene H<sup>+</sup>-Pumpen, führt zu pH-Werten zwischen 5 und 6. Nach einer Fusion mit lysosomalen Strukturen werden die entsandenen Strukturen als Endolysosomen bezeichnet. Lysosomale Strukturen zeigen sich in Abbildung 38 dunkler als die anderen intrazellulären Strukturen.

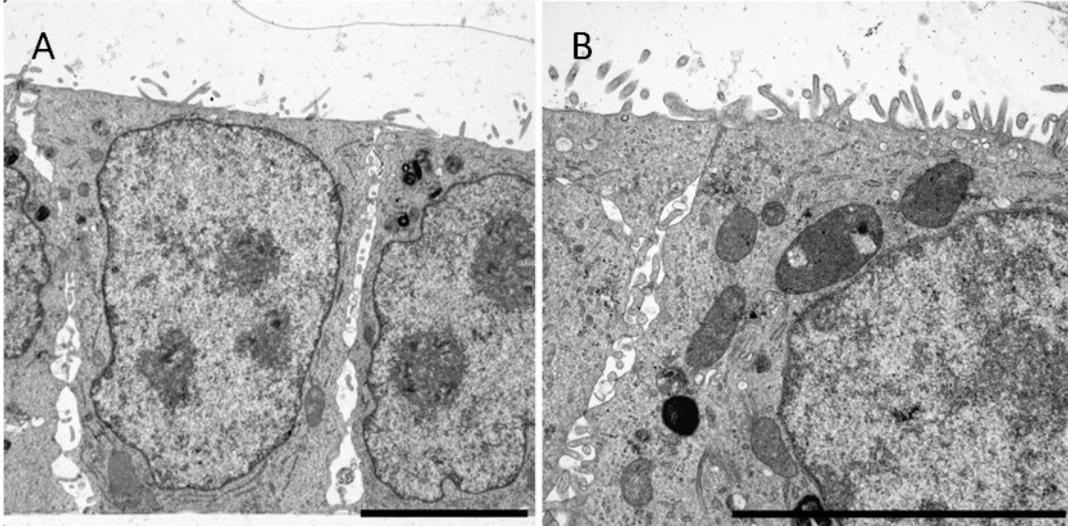


Abbildung 36 HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. Darstellung polarisierter Epithelzellen im lockeren Zellverband mit apikalem Mikrovillisaum. Die Präparation und Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 µm.

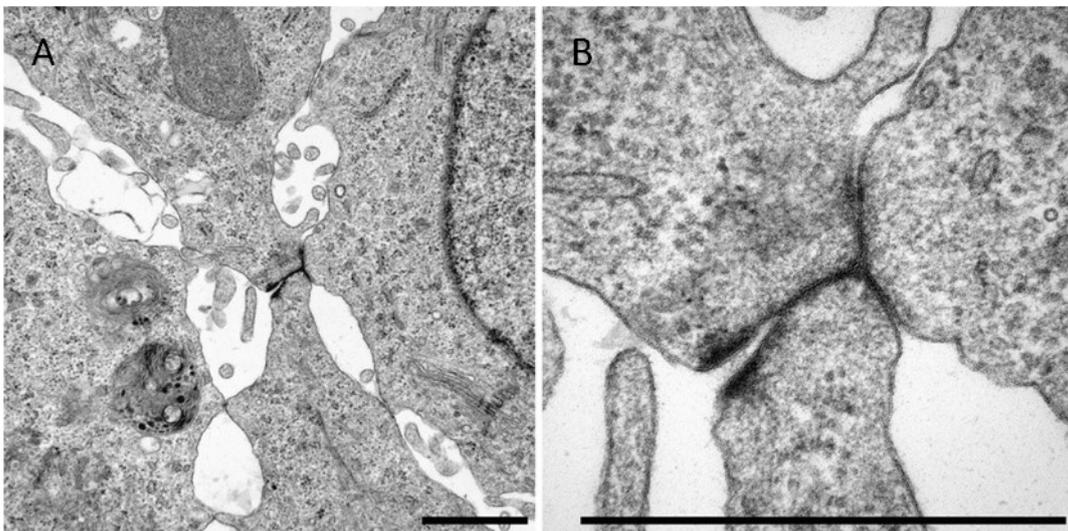
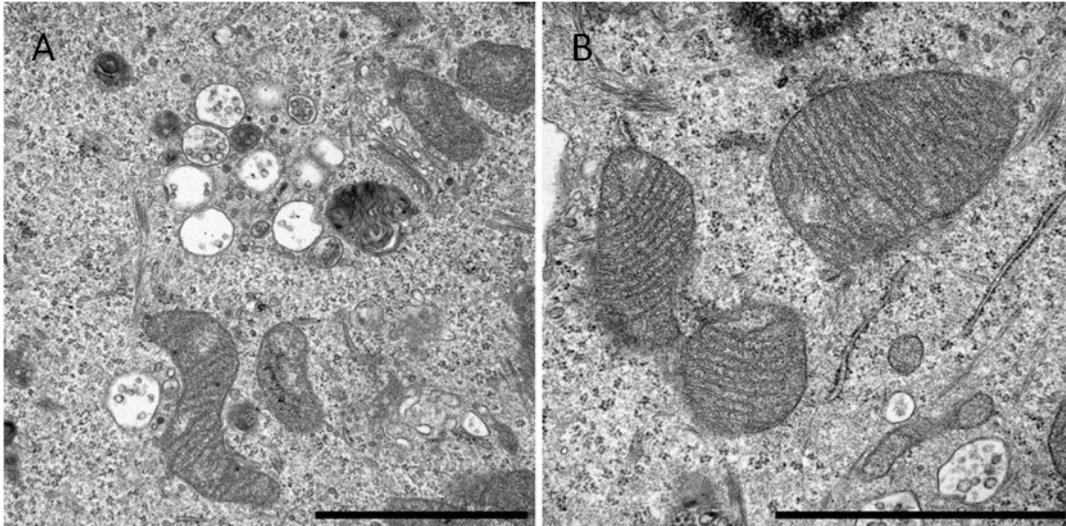


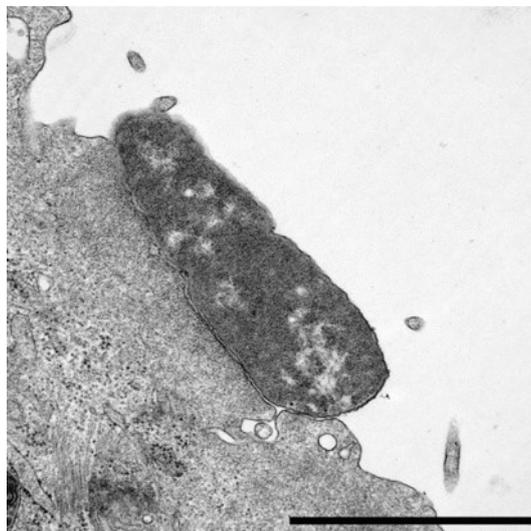
Abbildung 37 Zell-Zell-Kontakte der HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. Darstellung von Zell-Zell-Kontakten, die sich zwischen drei Zellen im lockeren Zellverband gebildet haben. Die Präparation und Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 µm.



**Abbildung 38** Intrazelluläre Strukturen der HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. Darstellung intrazellulärer Strukturen der HT29-Epithelzelllinie. Visualisierung von endosomalen und lysosomalen Strukturen sowie Teilen des rauen endoplasmatischen Retikulums und von Mitochondrien. Die Präparation und Färbung erfolgte durch Lilo Greune (Institut für Infektiologie). Die Maßstabsbalken entsprechen 2  $\mu\text{m}$ .

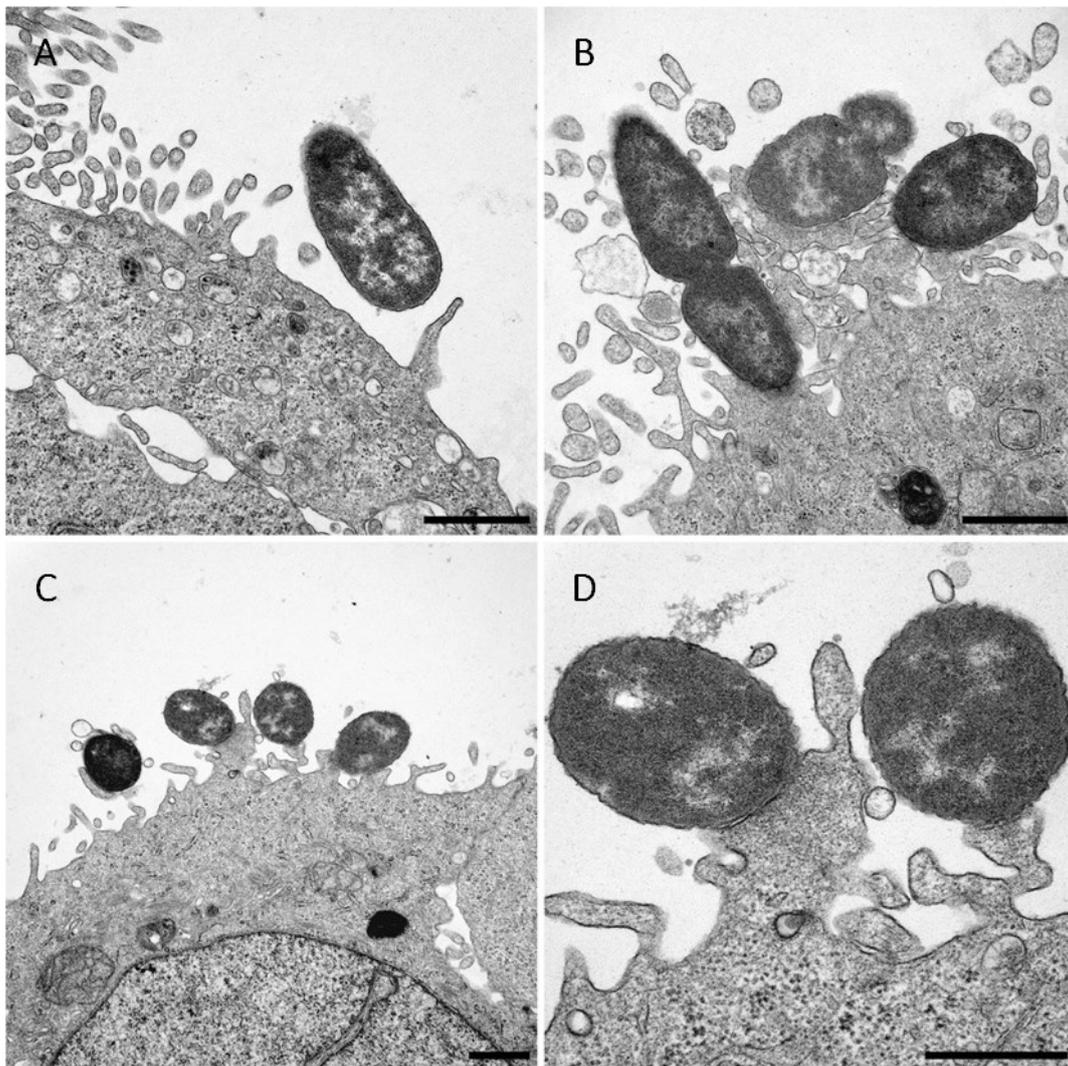
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EPEC E2348/69-infizierten HT29-Zellen wurden ebenfalls angefertigt. Die Zellen zeigten einen recht guten Strukturerehalt sowie vergrößerte interzelluläre Abstände im Vergleich zur Kontrolle. Lysosomale Strukturen traten in diesen Proben vermehrt auf. Dies spricht für eine Reaktion der Zellen auf die Infektion mit pathogenen Bakterien.

Die Kontrastierung der Bakterien verlief erfolgreich. Vereinzelt war die Produktion von *outer membrane vesicles* (OMVs) zu erkennen. Eine Adhärenz des EPEC E2348/69 an das Epithel war sichtbar und stellte sich in verschiedenen Ausprägungen dar. Dies wird im Folgenden näher beschrieben. In Abbildung 39 sind zwei Bakterien zu sehen, die sich in der gesamten Bakterienlänge an die Zelloberfläche anlagern. Mikrovilli sind in dem hier abgebildeten Ausschnitt nicht dokumentiert.



**Abbildung 39** EPEC E2348/69 auf HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. Darstellung zweier der Länge nach adhärenenten EPEC E2348/69 an der Zellmembran einer HT29-Zelle. Der Maßstabsbalken entspricht 1  $\mu\text{m}$ .

Die Bildung von *pedestals* ist in Ansätzen in den Abbildungen 40B bis D zu erkennen. Die elektronendichte Struktur direkt unterhalb der Zellmembran entspricht den Aktinverdichtungen, die durch die Injektion von Effektorproteinen mittels des *Type III secretion systems* (TTSS) induziert wird und zur *pedestal* Bildung führt. Ebenfalls durch das TTSS induziert wird die Intimin-vermittelte Adhärenz sowie das Mikrovilli-Effacement. Diese beiden Charakteristika, zusammengefasst in dem Ausdruck *A(Attaching)/E(Effacing)-lesions*, lassen sich im Beginn ihrer Entwicklung in den elektronenmikroskopischen Bildern von Lilo Greune (Institut für Infektiologie) erkennen.

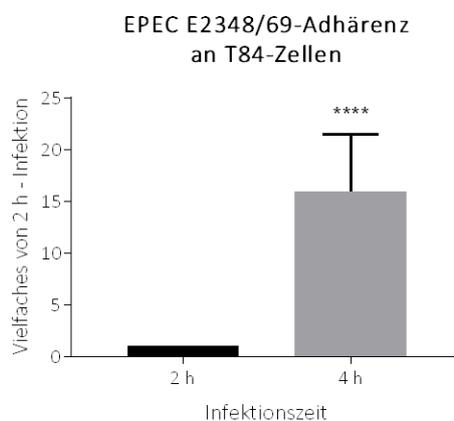


**Abbildung 40** EPEC E2348/69 auf HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. (A) Darstellung von sich annäherndem EPEC E2348/69 an die Zellmembran einer HT29-Zelle. (B-D) Adhärenz EPEC E2348/69 an der Membran von HT29-Epithelzellen. Bildung der charakteristischen Podest-artigen Strukturen. Die Maßstabsbalken entsprechen 1  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2. Infektion der T84-Zellen mit enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es die Adhärenz des EPEC E2348/69 am gastrointestinalen Epithel (hier: T84-Zellen) zu untersuchen und den Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 zu beschreiben (s. 4.4.2.1.). Den in Kapitel 4.4.2.1. dargelegten Versuchsergebnissen wurden Infektionsstudien mit EPEC E2348/69 zur Evaluation unterschiedlicher Infektionszeiten vorangestellt.

Die Durchführung der Adhärenzstudien mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* Stamm E2348/69 an T84-Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.2.2. beschrieben. Die Zell-Monolayer wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1,5 infiziert und für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Zur Analyse der Adhärenz bei unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Anzahl von adhärenenten EPEC E2348/69 nach 2 h und 4 h gezählt. Es zeigte sich eine um den Faktor 15 höhere Zahl adhärenenten enteropathogener *E. coli* E2348/69 bei einer Infektionszeit von 4 h im Vergleich zu 2 h (s. Abbildung 41). Die statistische Analyse der Datensätze mit dem t-Test bestätigte einen signifikanten Unterschied ( $p$ -Wert  $< 0,0001$  (\*\*\*\*)). Die längere Inkubationszeit führt neben einer verlängerten EPEC E2348/69-Replikation auch dazu, dass die Annäherung an das Epithel und der Aufbau einer intimen Adhärenz besser ermöglicht werden kann.

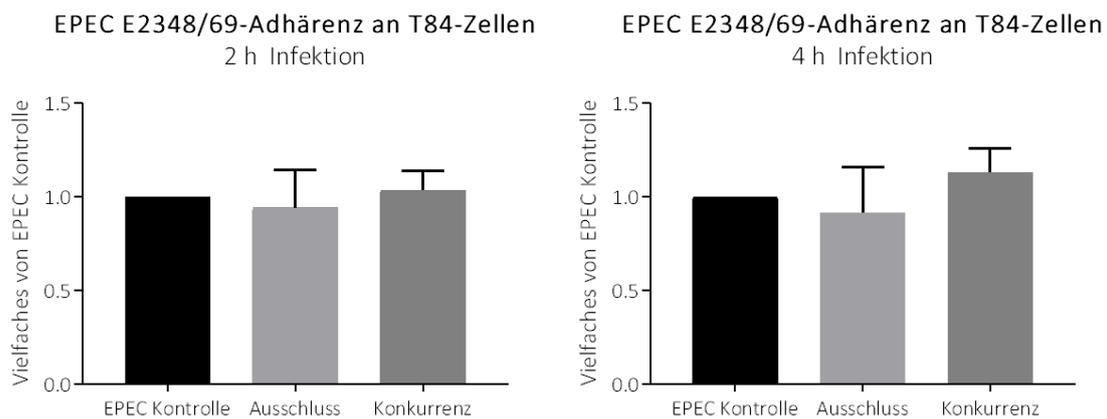


**Abbildung 41** Adhärenz des EPEC E2348/69 an T84-Zell-Monolayern mit einer MOI von 1,5. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die nicht-adhärenenten Bakterien entfernt. Die Adhärenz des EPEC E2348/69 wurde nach unterschiedlichen Infektionszeiten bestimmt. Die Anzahl adhärenenten EPEC E2348/69 nach einer Infektionszeit von 4 h ist im Verhältnis zur Adhärenz nach 2 h dargestellt. Die Daten wurden in sechs unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte einen  $p$ -Wert  $< 0,0001$  (\*\*\*\*).

##### 4.4.2.1. Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Infektion der T84-Zellen mit EPEC E2348/69

Der Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Adhärenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 am gastrointestinalen Epithel wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an-

hand von Adhärenzstudien in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen (beschrieben in 3.2.2.) beurteilt. Der Ausschluss der EPEC E2348/69-Adhärenz durch die Präinkubation mit dem probiotischen *L. rhamnosus* W65, und das Verhalten bei simultaner Applikation (Ko-Inkubation = Konkurrenz) wurden untersucht. Die Inkubation des T84-Monolayers mit den probiotischen und pathogenen Bakterienstämmen erfolgte für 2 h und für 4 h.



**Abbildung 42** Adhärenz des EPEC E2348/69 an T84-Zellen nach Prä- (= Ausschluss) oder Ko-Inkubation (= Konkurrenz) mit *Lactobacillus rhamnosus* W65 bei Infektionszeiten von 2 h und 4 h. Infektionen von T84-Zell-Monolayern mit dem EPEC E2348/69 erfolgten mit einer MOI von 1,5. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die nicht-adhärenenten Bakterien von den Zelllayern gewaschen. Die Ergebnisse der Studie werden im Verhältnis zur EPEC Kontrolle dargestellt. Die Daten wurden in vier unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte keine Signifikanz.

Die zwei Inkubationsanordnungen mit dem probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 zeigten keinen Effekt im Vergleich zur EPEC-Kontrolle auf die Anzahl von adhärenenten enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69. Dies gilt für beide Infektionszeiten von 2 h und 4 h (s. Abbildung 42).

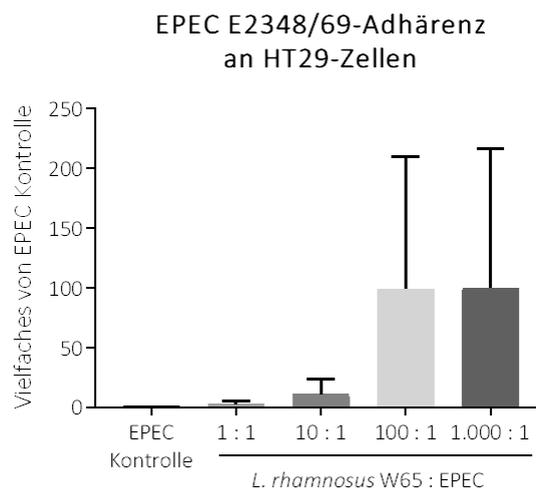
#### 4.4.3. Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69

Um eine möglicherweise zellspezifische Charakteristik der Adhärenz an T84-Epithelzellen auszuschließen, erfolgten zusätzlich Experimente an HT29-Zellen. Mack et al. beschrieben eine Inhibition der EPEC E2348/69-Adhärenz im *in vitro* Modell an HT29-Zellen durch ausgewählte *Lactobacillus* Stämme [91]. Dabei wurden die probiotischen Stämme *Lactobacillus plantarum* sowie *Lactobacillus rhamnosus* GG in aufsteigenden 10er Potenzen von 1:1- bis 10<sup>4</sup>:1-Verhältnis von Probiotikum zu Pathogenen auf die intestinalen Monolayer appliziert.

Die Durchführung der Adhärenzstudien an HT29-Zellen nach dem Protokoll von Mack et al. [91] erfolgte neben der Verwendung des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auch mit *Lactobacillus rhamnosus* 1121 als zweitem Stamm.

#### 4.4.3.1. Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69

Die Präinkubation des HT29-Monolayers für 1 h mit *Lactobacillus rhamnosus* W65 und einer anschließenden 3 h-Infektion mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 erfolgte im aufsteigenden Verhältnis *Laktobazillen* : EPEC E2348/69. Als Kontrolle dient eine 3 h-Infektion mit EPEC ohne Präinkubation.

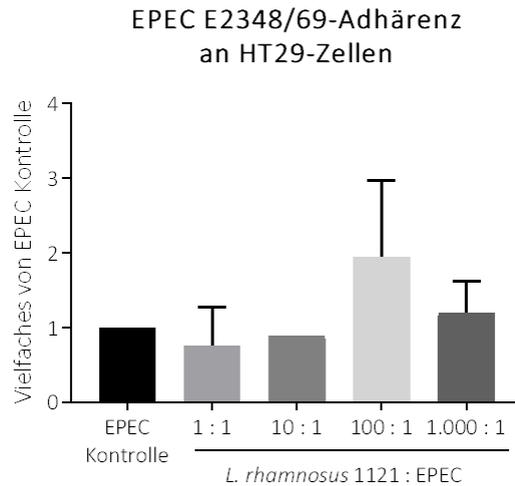


**Abbildung 43** Adhärenz des EPEC E2348/69 an HT29-Zellen nach 1 h-Präinkubation (= Ausschluss) mit *Lactobacillus rhamnosus* W65 im aufsteigenden Verhältnis *Laktobazillen* : EPEC E2348/69. Infektion von HT29-Zell-Monolayern mit dem EPEC E2348/69 mit einer MOI von 1. Die Präinkubation erfolgte im aufsteigenden Verhältnis von *Laktobazillen* : EPEC E2348/69, beginnend bei 10:1 bis 1.000:1. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die nicht-adhärenenten Bakterien von den Zelllayern entfernt. Darstellung der Ergebnisse im Verhältnis zur EPEC-Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte keine Signifikanz.

Bei einer Präinkubation mit *Laktobazillen* ist eine Zunahme der Anzahl an adhärenenten EPEC E2348/69 zu beobachten (s. Abbildung 43). Eine Proportionalität zum Anstieg des Inkubationsverhältnisses *Laktobazillen* : EPEC E2348/69 scheint gegeben. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den 1999 veröffentlichten Ergebnissen von Mack et al. [91].

#### 4.4.3.2. Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* 1121 auf die Infektion der HT29-Zellen mit EPEC E2348/69

Die Adhärenzstudien des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an den HT29-Zellen wurden mit dem *Lactobacillus rhamnosus* 1121 im selben Versuchsaufbau [91] durchgeführt. Auf die Anzahl adhärenenter EPEC E2348/69 konnte bei einer Präinkubation mit dem *Lactobacillus rhamnosus* 1121 kein Effekt dokumentiert werden (s. Abbildung 44).



**Abbildung 44** Adhärenz des EPEC E2348/69 an HT29-Zellen nach 1 h-Präinkubation (= Ausschluss) mit *Lactobacillus rhamnosus* 1121 im aufsteigenden Verhältnis *Laktobazillen* : EPEC E2348/69. Die Infektionen von HT29-Zell-Monolayern mit dem EPEC E2348/69 erfolgten mit einer MOI von 1. Die Präinkubation erfolgte im aufsteigenden Verhältnis von *Laktobazillen* : EPEC E2348/69, beginnend bei 1:1 bis 1.000:1. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die nicht-adhärenenten Bakterien von den Zellschichten entfernt. Darstellung der Ergebnisse im Verhältnis zur EPEC-Kontrolle. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen erhoben und sind mit Mittelwert + Standardabweichung abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigte keine Signifikanz.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass überraschend kein reduktiver Effekt durch die Präsenz der *Laktobazillen* auf die EPEC E2348/69-Adhärenz an HT29-Zellen dokumentiert werden konnte und die früher beschriebenen Ergebnisse von Mack et al. [91] nicht reproduziert werden konnten. Für den *Lactobacillus rhamnosus* W65 zeigte sich bei der Infektion von HT29-Zellen sogar ein gegenteiliger Effekt (s. Abbildung 43). Eine Klärung dieser Diskrepanz bedarf weiterführender Experimente.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1. Wachstum des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 in unterschiedlichen Medien

Zum besseren Verständnis des Pathogens und dessen Adaptionsverhalten an unterschiedliche Zusammensetzungen des Nährmediums wurden Wachstums-, Transkriptions- und Proteinexpressionsstudien sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. In Vorbereitung auf die Inkubations- und Infektionsstudien war dies von Bedeutung.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten eindeutig, dass das für die Anzucht von *Laktobazillen* und *Bifidobacterium bifidum* empfohlene MRS-Medium kein kompetentes Nährmedium für den enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 darstellt. Das Wachstum des EPEC E2348/69 in Luria-Bertani (LB)-Medium dagegen zeigt den zu erwartenden charakteristischen Kurvenverlauf. Bei der Zusammenführung beider Medien im 1 : 1 Verhältnis ist bereits ein abweichendes Wachstumsverhalten zu beobachten. Das Wachstum setzt erst nach einer deutlich verlängerten Latenzphase ('lag-phase') ein und erreicht nach annähernd linearem Wachstum deutlich höhere OD<sub>600nm</sub>-Werte als die in LB-Medium gewachsene Kontrolle (i. F. LB-Kontrolle). In der Elektronenmikroskopie konnten Unterschiede zur LB-Kontrolle in der Morphologie des EPEC E2348/69 festgestellt werden. Die Bakterien zeigen sich in unterschiedlicher Längenausprägung bis zu 4,6 µm und mit mehr Flagellen begießelt. Die Western Blotting Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen BfpA, EspD, Tir und GAPDH zeigten Veränderungen in den Proteinexpressionsmustern. Die densitometrische Auswertung der BfpA-Signale zeigt eine Proteinexpressionssteigerung nach Wachstum im LB-MRS-Mischmedium auf im Mittel 300 % (s. Abbildung 25). Die weiteren Western Blots lassen quantitative Analysen nicht zu. Gentranskriptionsstudien von *bfpA*, *espD* und *eae* zeigen höhere Werte nach Wachstum des EPEC E2348/69 im LB-MRS-Mischmedium als in reinem LB-Medium. Diese Ergebnisse weisen auf Veränderungen im Stoffwechsel der Bakterien hin, welche möglicherweise die Ursache für die beobachteten Veränderungen der Morphologie sind.

In der Literatur sind einige Einflussfaktoren auf das Wachstum und die Virulenz von Bakterien beschrieben. Unter anderem ist der pH-Wert von Bedeutung. Sobald sich dieser innerhalb eines tolerablen Bereichs von 4,5 bis 9 befindet, kann *E. coli*-Bakterienwachstum stattfinden. Zwischen Werten

von 5,8 bis 8,0 bleibt die Generationszeit und damit die Wachstumsgeschwindigkeit unbeeinflusst [92]. Die pH-Werte der verwendeten Medien liegen mit 6 für das MRS-Medium, 6,5 für das LB-MRS-Mischmedium und mit 7 für das reine LB-Medium innerhalb des tolerablen Bereichs. Zur Toleranz saurer pH-Konditionen besitzen einige Bakterien Neutralisationsmechanismen, wie z. B. das Glutamat-Decarboxylase-System des EPEC [93]. Ob die pH-Differenz der Medien für die beobachteten Veränderungen im Wachstum und in der Morphologie von Bedeutung ist, bedarf weiterführender Experimente.

Einen Hinweis auf den Einfluss der Zusammensetzung der Nährmedien auf die Expression von Virulenz-assoziierten Faktoren, speziell auf das *Type III secretions system* (TTSS), gibt Francis et al. [80]. Eine genauere Beschreibung bleibt dabei jedoch aus. Virulenzadaptive Prozesse an unterschiedliche Konzentrationen divalenter Kationen wurden für *Salmonella* beschrieben [94]. Ob Magnesium, als Magnesiumsulfat-Heptahydrat präsent in dem MRS-Medium, einen Einfluss auf den Stoffwechsel des EPEC E2348/69 nimmt, ist allerdings in weiterführenden Untersuchungen zu evaluieren.

Die in der Elektronenmikroskopie beschriebenen Flagellen tragen zur Virulenz des Pathogens bei, in dem sie die Bakterien u. a. zur Adhärenz an das intestinale Epithel befähigen. Die vielfältigen Eigenschaften der flagellaren Oberflächenstrukturen wurden in 1.4.1.2.1. detailliert beschrieben. Die Biosynthese der Flagellen ist sehr aufwändig und beansprucht in *Escherichia coli* etwa 2 % des gesamten Energieumsatzes [95]. Eine engmaschige Regulation gewährleistet einen effizienten Umgang mit der vorhandenen Energie. Bestimmte inhibitorische Faktoren der Flagellenbiosynthese konnten identifiziert werden. Das Vorherrschen von hohen Temperaturen, hohen Salzkonzentrationen, extremen pH-Werten, das Vorkommen von Kohlenhydraten, niedrig molekularen Alkoholen, Natrium-Salizylaten und -Desoxycholaten unterdrückt die Synthese von Flagellen. Eine Regulation durch Metall-Ionen und eine Induktion der Flagellenbiosynthese durch Sauerstoff-limitierte Konditionen wurden beschrieben [95]. Für Flagellen ist ein *Sensing* (z. Dt. Lesen, Abfühlen) Mechanismus bekannt. Dieser beschreibt die Fähigkeit die Präsenz bestimmter Moleküle in der unmittelbaren Umgebung wahrzunehmen. Die inhibitorische Wirkung, vor allem von D-Glucose, lässt sich dadurch erklären, dass die Abnahme der Motilität, durch Reduktion der Flagellen auf der Bakterienoberfläche, ein Verbleiben in der favorisierten Umgebung bewirkt [96]. Bei einer Konzentration von 20 g/l im MRS-Medium scheint die D-Glucose die beobachtete Diskrepanz nicht zu erklären.

Die Analyse der Bakterienoberfläche in Hinblick auf die Produktion von OMVs erfolgte aufgrund der beschriebenen pathogenitätsfördernden Eigenschaften sowie der Fähigkeit, Bakterien in Stresssituationen das Überleben zu sichern [71]. Eine vermehrte OMV-Produktion von EPEC E2348/69 ließ sich ausschließlich bei der Infektion von HT29-MTX-E12-Zellen, durchgeführt von Jessyca González (laufende Promotionsarbeit im Institut für Infektiologie), zeigen. Dies bietet einen Hinweis darauf, dass für die

Induktion des *Type zero secretion systems* andere Stresssignale als die veränderte Medienkomposition, in dem Fall möglicherweise die Präsenz der Muzinschicht auf den Epithelzellen, verantwortlich sind.

Ein Herausarbeiten der verantwortlichen Bestandteile des MRS-Mediums für das veränderte Verhalten des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 steht für die Vervollständigung der Analyse aus. Experimente zur Funktionalität des Pathogens sowie zur Regenerationsfähigkeit nach Transfer der abberanten EPEC in die reguläre Wachstumsumgebung (LB-Medium) würden sich als Folgeversuche anbieten.

## 5.2. Einfluss des *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Virulenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69

Ziel der Arbeit war es den Einfluss des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf den enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 zu untersuchen. Dies geschah u. a. in Inkubationsstudien, in denen die Transkriptionsraten Virulenz-assoziiierter Gene des EPEC E2348/69 analysiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen einen reduktiven Effekt des *Lactobacillus rhamnosus* W65 und dessen Kulturüberstand auf die Transkription ausgewählter Virulenzgene des prototypischen EPEC Stamms E2348/69 im Vergleich zur MRS-Medium-Kontrolle (s. Abbildung 27). Bei einer Inkubation mit dem steril-filtrierten Kulturüberstand ergab die statistische Analyse ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 für alle drei untersuchten Gene (*bfpA*, *espD*, *eae*). Die *L. rhamnosus* W65-Kultur zeigte eine signifikante Reduktion mit p-Wert < 0,05 für das *bfpA*- und *espD*-Gen. Die Exklusion des Kulturüberstands, durch Waschen der *Laktobazillen* und Resuspendieren in D-PBS, zeigte keine Reduktion der Transkriptionsraten (s. Abbildung 28). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die verantwortlichen Faktoren im Kulturüberstand vorliegen. Ein Medienausstausch (MRS- zu LB-Medium) des Kulturüberstands der *Laktobazillen* mittels Dialyse (Ausschlussgröße: 10kDa) wurde zur Exklusion von Bestandteilen des MRS-Mediums vorgenommen. Inkubationsansätze mit Führung der entsprechenden Mediumkontrolle führten zu keinen konsistenten Ergebnissen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Reduktion der Gentranskriptionsraten von *bfpA*, *espD* und *eae* des EPEC E2348/69 durch Inkubation mit dem Kulturüberstand des *Lactobacillus rhamnosus* W65.

Zum Ausschluss des Vesikel-vermittelten Transports von Effektoren des Probiotikums durch sogenannte *extracellular vesicles* (= EV), Analoga der *outer membrane vesicles* von Gram-negativen Bak-

terien bei Gram-positiven Spezies [97], wurden elektronenmikroskopische Bilder der *Laktobazillen* angefertigt. Bei der Auswertung konnten keine *extracellular vesicles* identifiziert werden. Dies macht die Beteiligung von Vesikel-vermittelten Transport von Effektoren des Probiotikums unwahrscheinlich.

Welche Bestandteile des Kulturüberstands verantwortlich für den beschriebenen Effekt sind ist noch unklar. Die SDS-PAGE des *Lactobacillus rhamnosus* W65-Kulturüberstandes bestätigt die Präsenz verschiedener Proteinstrukturen. Deren Beteiligung an der Reduktion der Transkriptionsraten der untersuchten Gene wäre möglich. Auch denkbar wäre die Beteiligung von Lipid- oder Zuckerstrukturen. Eine Differenzierung der Bestandteile des Kulturüberstands durch Größenfraktionierung (z. B. durch Säulen-Chromatographie) könnte weiter zur Identifikation der beteiligten Substanz(en) beitragen.

### 5.3. Wirksamkeit von Kulturüberständen probiotischer Bakterien

Die Reduktion der Virulenzgentranskription, hervorgerufen ausschließlich durch den Überstand des *Lactobacillus rhamnosus* W65, schließt sich einer Reihe von Studien zur Wirkung von probiotischen Kulturüberständen an. Ein wachstumsinhibierender Effekt von Kulturüberständen ausgewählter *Lactobacillus* Spezies auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien konnte am Beispiel von *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. und *Staphylococcus aureus* gezeigt werden [98]. Die Modulation der proinflammatorischen Reaktionen von Makrophagen in Hühnern durch die Exposition mit Überständen verschiedener *Lactobacillus* Spezies wurde untersucht [99]. Einige Stämme induzierten eine Zytokin-Expression, während andere ausschließlich eine positive Wirkung auf die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion zeigten [99]. Neben den Gram-positiven Vertretern stellt der Bakterienstamm *Escherichia coli* Nissle 1917 ein Gram-negatives Probiotikum dar. Bisherige Versuche im Institut für Infektiologie zeigen die Wirksamkeit des Kulturüberstandes von *E. coli* Nissle 1917 auf die Aufrechterhaltung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von T84-Epithelzelllayern [100]. Diese Barrierestabilisation konnte experimentell auch an IEC-6-Zellen nachgewiesen werden. Bei 5-Fluoruracil induziertem Zelltod in IEC-6-Zellen wurde durch Inkubation mit dem Kulturüberstand des Probiotikums ein erhöhtes Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle erreicht [101]. Auch im Tiermodell konnte an Ratten nach 5-Fluoruracil-induzierter Mukositis ein protektiver Effekt des *E. coli* Nissle 1917-Kulturüberstandes gezeigt werden. Dabei konnte die Applikation von *E. coli* Nissle 1917-Kulturüberständen einen Gewichtsverlust verhindern und die Flüssigkeitsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe normalisieren. Vermutet wird dabei ein stabilisierender Effekt auf die intestinale Barriere, speziell auf die *Tight Junctions* [102].

Die wissenschaftliche Evidenz unterstreicht die Bedeutung der protektiven Fähigkeiten von Kulturüberständen probiotischer Bakterien. Weiterführende Experimente zur Identifizierung der beteiligten Faktoren im Kulturüberstand des *Lactobacillus rhamnosus* W65 sind daher geboten und notwendig.

Lebende Mikroorganismen sind in der Therapie aufgrund einer großen Variabilität, ihrer Anpassungsfähigkeit und der Möglichkeit von Mutationsereignissen mit Risiken verbunden. Im Extremfall kann es zur Ausbreitung der Mikroorganismen über die Blutbahn und damit zu einer systemischen Infektion kommen, die bis zum Tod führen kann. Die Verwendung von Kulturüberständen oder gereinigten Effektormolekülen würde diese Risikoquelle eliminieren. Eine Skepsis gegenüber mikrobiologischen Präparaten besteht. Neben einer höheren Akzeptanz gegenüber bakterienfreien Therapeutika, wäre daher wahrscheinlich auch mit geringeren Problemen bei einer Zulassung zu rechnen.

#### 5.4. Gentranskriptionsanalysen regulativer Elemente

Wir konnten in diesen Untersuchungen zeigen, dass ein induktiver Effekt von dem MRS-Medium sowie ein reprimierende Effekt von dem *Lactobacillus rhamnosus* W65-Kulturüberstand auf die Transkription ausgewählter Virulenzgene des EPEC E2348/69 ausgeht. Die zu Grunde liegenden Mechanismen konnten bisher nicht geklärt werden. Die Regulation der Virulenzfaktoren, codiert in der Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) sowie auf dem EAF (*EPEC adherence factor*)-Plasmid, erfolgt durch die spezifischen Elementen Ler (*LEE-encoded regulator*) und Per (*plasmid-encoded regulator*). Eine Analyse der Transkriptionslevel von *ler* und *per* könnte in weiterführenden Analysen Aufschluss darüber geben, ob diese genregulatorischen Elemente an dem hier gefundenen Effekt beteiligt sind.

#### 5.5. Adhärenzstudien des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an gastrointestinalen Epithelzelllinien

Die Ergebnisse der Adhärenzstudien zeigten keinen inhibitorischen Effekt des probiotischen *Lactobacillus rhamnosus* W65 auf die Adhärenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an T84-Zellen. Die Durchführung der Versuche mit unterschiedlichen Infektionszeiten von 2 h und 4 h sowie mit verschiedenen experimentellen Szenarien, Prä- (= Ausschluss) und Ko-Inkubation (= Konkurrenz) mit dem Probiotikum, veränderten diese Ergebnisse nicht.

Zur Untersuchung der Adhärenz des enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 an HT29-Zellen wurde ein anderes Protokoll nach Mack et al. (1999) [91] verwendet. Dabei wurde eine 1 h-Präinkubation mit dem Probiotikum und 3 h-Infektion mit dem Pathogen durchgeführt. Aufgrund dessen können die mit HT29-Zellen erhaltenen Ergebnisse nicht mit den mit T84-Zellen erzielten Resultaten verglichen werden. Die Untersuchungen mit HT29-Zellen legten einen Fokus auf den Effekt abhängig von der applizierten Dosis probiotischer Bakterien. Für den *Lactobacillus rhamnosus* W65 und *Lactobacillus rhamnosus* 1121, welcher zusätzlich in die Studie aufgenommen worden ist, zeigte sich auch in dieser

experimentellen Anordnung keine Inhibition der EPEC E2348/69-Adhärenz. Für den *Lactobacillus rhamnosus* W65 wurden bei aufsteigendem Verhältnis von Probiotikum zu Pathogen steigende Zahlen adherenter Pathogene dokumentiert, während der *Lactobacillus rhamnosus* 1121 keinen Effekt auf die Anzahl der Pathogene zeigt. Diskrepanzen innerhalb einer Spezies sind für probiotische Bakterien und vor allem für *Laktobazillen* bekannt, sodass davon ausgegangen wird, dass probiotische Eigenschaften stammspezifisch sind. Die Analyse eines ausgewählten Bakterienstammes und die anschließende Übertragung der erzielten Ergebnisse auf die gesamte Spezies oder sogar auf die Gattung führt daher in der Regel zu falschen Annahmen der Wirksamkeit [103].

Ein Adhärenzinhibierender Effekt auf Pathogene durch die Applikation von Probiotika wurde für einige Bakterienstämme beschrieben (in 1.3.1.1. für *Laktobazillen* detaillierter ausgeführt). Als zu Grunde liegender Mechanismus wird unter anderem die adhäsive Fähigkeit des Probiotikums an das intestinale Epithel und die dadurch vermittelte kompetitive Exklusion des Pathogens beschrieben [104]. Nach elektronenmikroskopischer Analyse von intestinalen Epithelzellen (hier: HT29-Zellen) ko-inkubiert mit dem *Lactobacillus rhamnosus* W65 sowie dem *Lactobacillus rhamnosus* 1121 konnte allerdings keine Adhäsion der Probiotika an das Epithel dokumentiert werden. Da in diesem Fall auch keine potentiellen Bindungsstellen für den pathogenen *E. coli* Stamm blockiert werden können, ist es nicht überraschend, dass bei Prä- oder Ko-Inkubation der untersuchten probiotischen Stämme mit dem Pathogen keine inhibitorischen Effekte beobachtet werden konnten.

Für den *Lactobacillus rhamnosus* W65 sowie für den *Lactobacillus rhamnosus* 1121 lässt sich ein Adhärenzinhibierender Effekt auf den EPEC E2348/69, der hier an den intestinalen Epithelzelllinien T84 und HT29 untersucht wurde, nicht zeigen.

## 5.6. Bildbasierte Analysen

In einigen der hier durchgeführten Adhärenzstudien wurde die Auswertung, die bisher durch das Ausplattieren anheftender Bakterien durchgeführt wurde, durch bildbasierte Analysen (Multiparameterdiagnostik, BTU Cottbus-Senftenberg) ergänzt. Dazu werden intestinale Epithelzellen in konfluenten Monolayern auf 96-well-Platten mit den Bakterien infiziert. Nach Abschluss der Infektionszeit und der Entfernung der nicht-adhärenenten Bakterien durch mehrmaliges Waschen, erfolgt eine Färbung der Zellkerne mit DAPI und der Bakterien mit einer FISH-Sonde oder einer immunologischen Färbung. Die Auswertung ergibt die Bakterienanzahl pro Zelle bzw. Fläche und eine Beurteilung des Vorkommens und der Größe von Bakterienkolonien. Dies geschieht durch die Auswertung von mehreren Einzelbildern, die spiralförmig ausgehend von Zentrum des wells angefertigt werden [88]. Diese bildbasierten Analysen ermöglicht die Generierung zellbasierter Daten, da dabei die Möglichkeit besteht, einzelne Areale des

Monolayers gesondert zu betrachten. Im Vergleich dazu wird bei der Analyse nach der Ausplattiermethode nur der Durchschnitt aller anheftenden Bakterien über das gesamte well betrachtet. Nach Kontaktaufnahme mit Peter Schierack vom Fachgebiet Multiparameterdiagnostik an der BTU Cottbus-Senftenberg wurde ein gemeinsames Vorhaben zur Auswertung der Adhärenzstudien mithilfe der bildbasierten Analysen eingeleitet. Aufgrund einiger Zeitverzögerung kam es jedoch nur zur Durchführung von Vorversuchen zur Darstellung des EPEC E2348/69 mithilfe eines O127-Antikörpers sowie von zwei ersten Infektionsversuchen an HT29-Zellen. Dargestellt sind die Aufnahmen in Abbildung 45.

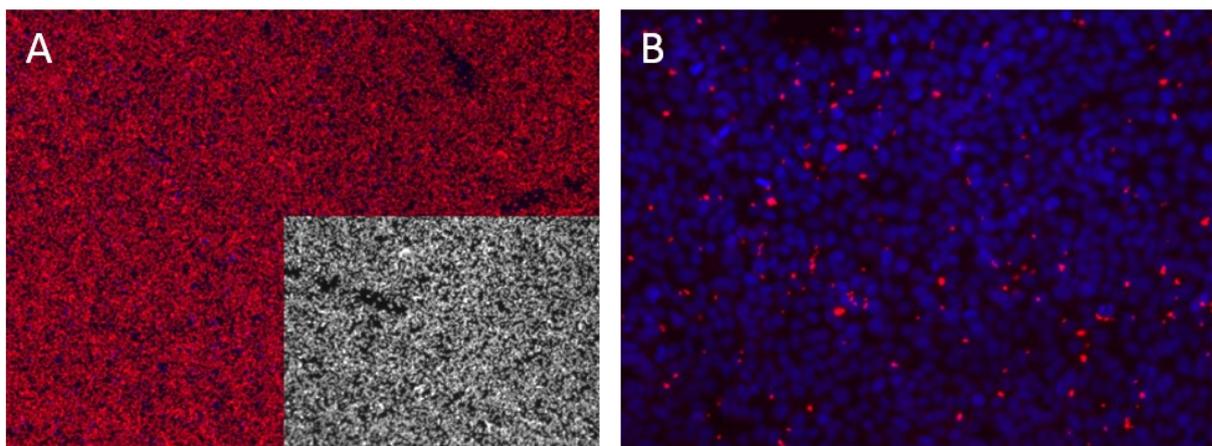


Abbildung 45 Antikörperbasierter Nachweis des O127-Antigens zur Detektion des EPEC E2348/69 (O127:H7). (A) Darstellung des EPEC E2348/69 in Lösung. 20-fache Vergrößerung (rot), 40-fache Vergrößerung (schwarz-weiß). (B) Darstellung des EPEC E2348/69 adhärenz an HT29 - Zellen. Färbung der Zellkerne mit DAPI. 40-fache Vergrößerung. Die Abbildungen wurden von Jörg Weinreich (Senftenberg) zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung der ersten Infektionsversuche weist auf einen Effekt der Kulturüberstände von *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen hin (Daten hier nicht gezeigt). Eine eigenständige Durchführung der Experimente zur Validierung der Diskrepanz zwischen den verschiedenen Methoden bleibt zukünftigen Experimenten vorbehalten. Vielfältige Faktoren, wie z. B. die Anzucht der Bakterien, die Konfluenz und das Verhalten der intestinalen Zellen im 96-well-Format sowie die Durchführung der Inkubationsansätze könnten die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen.

## 5.7. Ausblick

Ausgehend von den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen und den durchgeführten Literaturrecherchen ergaben sich weitere Fragestellungen, deren Klärung von Bedeutung ist.

### 5.7.1. Membranstabilisierender Effekt von Probiotika

In den vorangegangenen Abschnitten wurde der TEER-stabilisierende Effekt von Probiotika angeführt. Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands ist für die Beurteilung der Integrität von *Tight Junctions* ein gängiger Parameter [100,105]. Eine Studie konnte die Regeneration der TEER von Caco-2-Zellen nach 4 h-Infektion mit EPEC O26:H11 durch Applikation von getesteten *Lactobacillus* Spezies zeigen. Die Umverteilung der *Tight Junction* Proteine Claudin 1, Claudin 4, Jam-A, Occludin und ZO-1 vom Zytoplasma an die Zellmembran erfolgte in Caco-2-Zellen partiell bis vollständig nach Applikation der unterschiedlichen *Lactobacillus* Spezies. Gentranskriptionsanalysen von HT29-Zellen zeigten nur für ausgewählte Stämme eine Induktion einzelner *Tight Junction* Proteine [39]. Für die EIEC-Infektion von Caco-2-Zellen konnte ein protektiver Effekt des *Lactobacillus plantarum* auf den TEER und die *Tight Junctions* Integrität (s. Abbildung 46) gezeigt werden [106].

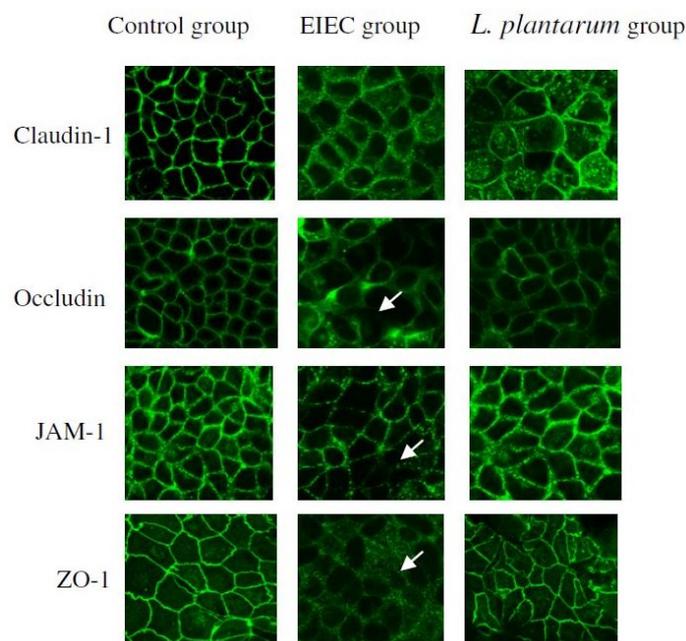


Abbildung 46 *L. plantarum* verhindert EIEC-induzierte Umverteilung der *Tight Junction* Proteine Claudin-1, Occludin, JAM-1 und ZO-1.

Die Infektion von Caco-2-Zellen mit EIEC erfolgte mit einer MOI von 100. Nach Applikation der Pathogene erfolgte eine Sedimentation, um eine schnelle Infektion zu gewährleisten. Anschließend wurde der probiotische *Lactobacillus plantarum* in einem Inokulationsverhältnis *L. plantarum* : EIEC von 10 : 1 appliziert. Die Inkubationszeit betrug 24 h. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper [106].

Zur Darstellung der Verteilungsmuster ausgewählter *Tight Junction* Proteine in EPEC-infizierten HT29-Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (s. Abbildung 35 auf Seite 68). Im ersten Experiment konnten keine optimalen Färbebedingungen geschaffen werden, eine Anpassung der Antikörper- und Färbereagenz-Konzentrationen ist für die Optimierung der Analyse notwendig. Dargestellt sind hier ausschließlich die EPEC-infizierten HT29-Präparate. Für eine vollständige Analyse (vgl. Abbildung 46) fehlen native sowie HT29-Präparate ko-inkubiert mit dem Probiotikum.

Eine Analyse des Effekts auf die *Tight Junction* Protein-Distribution wird aktuell für verschiedene Mutanten des *Escherichia coli* Nissle 1917 von Jessyca González (Institut für Infektiologie) durchgeführt. Die Untersuchung der TJ-Proteine sowohl auf der Ebene der Transkription als auch ihrer Proteinexpression (z. B. mit Hilfe des Western Blottings) wäre bei der Inkubation von intestinalen Epithelzellen mit probiotischen *Laktobazillen* interessant.

### **5.7.2. Induktion der Muzin-Produktion und der Effekt auf das Pathogen**

Ein weiterer Aspekt, beschrieben von Mack et al. (1999)[91], ist der Effekt von probiotischen *Laktobazillen* auf die Regulation der Muzin-Produktion von intestinalen Zellen. Für den Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum* 299v konnte eine Induktion der Genexpression von MUC2 und MUC3 gezeigt werden. In Adhärenzstudien des EPEC E2348/69 an HEp-2-Zellen zeigte die Zugabe von MUC2 und MUC3-reichem Medium eine Inhibition des Pathogens [91]. Eine protektive Wirkung durch Induktion der Muzin-Produktion und damit Verstärkung der Muzin-haltigen Schleimschicht scheint von dem Probiotikum auszugehen. Dabei wären auch vergleichende Studien mit HT29- und HT29-MTX-E12-Zellen interessant.

Nach Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen des EPEC E2348/69 ko-inkubiert mit Muzin-produzierenden HT29-MTX-E12-Zellen zeigte sich eine starke OMV-Produktion. Die Ursache dieser Reaktion des Bakteriums ist bisher unklar. Der Einfluss der Muzine auf den Zustand des Pathogens sollte untersucht werden. Durch die Muzin-Produktion könnte es einerseits zu einer Adhärenzinhibition an die intestinalen Epithelzellen kommen. Auf der anderen Seite könnte es jedoch auch zu einer Pathogenitätssteigerung des EPEC E2348/69 führen, indem die Effektormoleküle in OMVs verpackt ihre Zielstruktur, die intestinale Zelle, erreichen. Die Studien mit den Muzin-produzierenden HT29-MTX-E12-Zellen sind von besonderem Interesse, da davon auszugehen ist, dass die *in vivo* Situation durch die Bildung der Mukusschicht besser dargestellt wird.

## 5.8. Fazit

Diese Arbeit widmete sich der Evaluation der probiotischen Eigenschaften des *Lactobacillus rhamnosus* W65 in Hinblick auf die Virulenz des EPEC E2348/69 und die Adhärenz am gastrointestinalen Epithel. Ein Effekt auf die Adhärenz konnte entgegen der Annahme nicht bestätigt werden. In den Inkubationsstudien jedoch wurde ein Effekt auf die Transkriptionsraten ausgewählter Virulenz-assoziiierter Gene aufgezeigt, welcher weiterer Investigation bedarf.

Die Ergebnisse der Arbeit zu den probiotischen Eigenschaften des *Lactobacillus rhamnosus* W65 bestätigen die mögliche Diskrepanz zwischen den Bakterienstämmen einer Spezies. Viele Studien des *Lactobacillus rhamnosus* GG (in 1.3.1.2. beschrieben) zeigen die Wirksamkeit des Bakterienstammes auf. Zu einer Generalisierung auf die gesamte Spezies darf es korrekterweise jedoch nicht kommen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Gorkiewicz G, Moschen A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Arch* 2018 Jan;472(1):159-172.
- [2] Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998 May 26;41(2):85-101.
- [3] Waldeck F. Funktionen des Magen-Darm-Kanals. In: Schmidt R, Thews G, editors. *Physiologie des Menschen*. 22nd ed. Berlin: Springer; 1985. p. 642-667.
- [4] Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, Mancini C, Cicerone C, Corazziari E, Pantanella F, Schippa S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol* 2016 Jan;39(1):1-12.
- [5] Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010 Mar 4;464(7285):59-65.
- [6] Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Hogenauer C, Thallinger GG, Gorkiewicz G. Critical issues in mycobiota analysis. *Front Microbiol* 2017 Feb 14;8:180.
- [7] Wilson M. The indigenous microbiota of the gastrointestinal tract. In: Wilson M, editor. *Microbial inhabitants of humans - their ecology and role in health and disease*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 267-300.
- [8] Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol* 1997 Jul;15(7):270-274.
- [9] Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Aug 21;104(34):13780-13785.
- [10] Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 2011;12(5):R50.
- [11] Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 2009 Aug 20;4(8):e6669.
- [12] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005 Jun 10;308(5728):1635-1638.
- [13] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jun 29;107(26):11971-11975.
- [14] Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Knight R, Clemente JC. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016 Mar;22(3):250-253.
- [15] Sevelsted A, Stokholm J, Bonnelykke K, Bisgaard H. Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics* 2015 Jan;135(1):92-98.

- [16] Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010 Jul;90(3):859-904.
- [17] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012 Sep 13;489(7415):231-241.
- [18] Cario E. Toll-like receptors and gastrointestinal diseases: from bench to bedside? *Curr Opin Gastroenterol* 2002 Nov;18(6):696-704.
- [19] Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 1999 May;69(5):1046-1051.
- [20] Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 2013 Jan;138(1):1-11.
- [21] Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* 2012 Jan;20(1):30-39.
- [22] Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006 Apr;19(2):315-337.
- [23] Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, Heyerick A. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia* 2011 Jan;82(1):53-66.
- [24] Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 2006 Oct 20;127(2):423-433.
- [25] Eckard S. Beratung bei der Abgabe von Antibiotika. In: Eckard S, editor. *Beratungspraxis Bakterielle Infektionskrankheiten*. 2nd ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2013. p. 102-179.
- [26] Eckard S. Grundlagen der Antibiotikatherapie. In: Eckard S, editor. *Beratungspraxis Bakterielle Infektionskrankheiten*. 2nd ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2013. p. 83-101.
- [27] Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 2015 Apr;40(4):277-283.
- [28] Kaye KS, Pogue JM. Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy* 2015 Oct;35(10):949-962.
- [29] McGettigan P, Roderick P, Kadam A, Pollock AM. Access, watch, and reserve antibiotics in India: challenges for WHO stewardship. *Lancet Glob Health* 2017 Nov;5(11):1075-1076.
- [30] McKenna M. CDC threat report: 'We will soon be in a post-antibiotic era'. 2013 Sep 16 [cited 2020 Feb 19]. In: WIRED. *Science News* [Internet]. San Francisco: Condé Nast. Available from: <https://www.wired.com/2013/09/cdc-amr-rpt1/>.
- [31] Lee CR, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health* 2013 Sep 12;10(9):4274-4305.
- [32] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014 Aug;11(8):506-514.
- [33] Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 2008;46(2):58-151.

- [34] Ritchie ML, Romanuk TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One* 2012;7(4):e34938.
- [35] Hof H, Dörries R. Spezielle Bakteriologie; Grampositive, mikroaerophile bis anaerobe, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien; *Lactobacillus*. Medizinische Mikrobiologie: 237 Tabellen [Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene]. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 343-344.
- [36] Lin PP, Hsieh YM, Tsai CC. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Anaerobe* 2009 Aug;15(4):122-126.
- [37] Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LM. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 2008 Jul-Aug;159(6):470-475.
- [38] Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol* 2005 Mar;156(2):256-262.
- [39] Jariwala R, Mandal H, Bagchi T. Indigenous lactobacilli strains of food and human sources reverse enteropathogenic *E. coli* O26:H11-induced damage in intestinal epithelial cell lines: effect on redistribution of tight junction proteins. *Microbiology* 2017 Sep;163(9):1263-1272.
- [40] Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol* 2003;47(6):405-409.
- [41] Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 Aug;31(8):1231-1233.
- [42] Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987 Jan;70(1):1-12.
- [43] Ardita CS, Mercante JW, Kwon YM, Luo L, Crawford ME, Powell DN, Jones RM, Neish AS. Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. *Appl Environ Microbiol* 2014 Aug;80(16):5068-5077.
- [44] Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 2008 Aug;74(16):4985-4996.
- [45] Szajewska H, Skorka A, Ruszczynski M, Gieruszczak-Bialek D. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children - updated analysis of randomised controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Sep;38(5):467-476.
- [46] Liu S, Hu P, Du X, Zhou T, Pei X. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian Pediatr* 2013 Apr;50(4):377-381.
- [47] Ritze Y, Bardos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwiertz A, Bischoff SC. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One* 2014 Jan 27;9(1):e80169.
- [48] Cosenza L, Nocerino R, Di Scala C, di Costanzo M, Amoroso A, Leone L, Paparo L, Pezzella C, Aitoro R, Berni Canani R. Bugs for atopy: the *Lactobacillus rhamnosus* GG strategy for food allergy prevention and treatment in children. *Benef Microbes* 2015;6(2):225-232.

- [49] Sindhu KN, Sowmyanarayanan TV, Paul A, Babji S, Ajjampur SS, Priyadarshini S, Sarkar R, Balasubramanian KA, Wanke CA, Ward HD, Kang G. Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2014 Apr;58(8):1107-1115.
- [50] Mims C, Ackermann G, Rempe-Baldin W. Gastrointestinale Infektionen; Viral und bakteriell verursachte Durchfallerkrankungen; Bakterielle Ursachen; *Escherichia coli*. In: Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M, editors. *Medizinische Mikrobiologie, Infektiologie [mit Virologie und Immunologie]*. 2nd ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2006. p. 298-300.
- [51] Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 2009 Jan;191(1):347-354.
- [52] Kaper JB. Defining EPEC. *Rev Microbiol Sao Paulo* 1996;27(1):130-133.
- [53] Yamamoto T, Koyama Y, Matsumoto M, Sonoda E, Nakayama S, Uchimura M, Paveenkittiporn W, Tamura K, Yokota T, Echeverria P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *J Infect Dis* 1992 Dec;166(6):1295-1310.
- [54] Hicks S, Frankel G, Kaper JB, Dougan G, Phillips AD. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 1998 Apr;66(4):1570-1578.
- [55] Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984 Aug;45(2):534-536.
- [56] Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985 May;48(2):378-383.
- [57] Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* 1987 Jan;55(1):69-77.
- [58] Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983 Sep;41(3):1340-1351.
- [59] Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, Finlay BB. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* 1996;15(11):2613-2624.
- [60] Phillips AD, Giron J, Hicks S, Dougan G, Frankel G. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology* 2000 Jun;146(6):1333-1344.
- [61] Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2003 Jul;16(3):365-378.
- [62] Sonnenberg MS. *Escherichia coli* virulence mechanisms of a versatile pathogen. 1st ed. San Diego: Academic Press; 2002.
- [63] Stüber E. Akute Diarrhö. In: König B, Reinhardt D, Schuster HP, editors. *Kompodium der praktischen Medizin*. 1st ed. Berlin: Springer; 2000. p. 23-34.
- [64] Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1978 May 27;1(8074):1119-1122.

- [65] Haiko J, Westerlund-Wikstrom B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* 2013 Oct 25;2(4):1242-1267.
- [66] Wang Q, Suzuki A, Mariconda S, Porwollik S, Harshey RM. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO J* 2005 Jun 1;24(11):2034-2042.
- [67] Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, Li Z, Shi J, Tocheva EI, Muller A, Dobro MJ, Jensen GJ. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J* 2011 Jun 14;30(14):2972-2981.
- [68] Guerrero-Mandujano A, Hernandez-Cortez C, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: secretion system type zero. *Traffic* 2017 Jul;18(7):425-432.
- [69] Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999 Aug;181(16):4725-4733.
- [70] Bonnington KE, Kuehn MJ. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 2014 Aug;1843(8):1612-1619.
- [71] Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 2015 Oct;13(10):605-619.
- [72] Kulkarni HM, Nagaraj R, Jagannadham MV. Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiol Res* 2015 Dec;181:1-7.
- [73] Kunjantarachot A, Yan W, McDonough SP, Prapong S, Theeragool G. Immunogenicity of *Leptospira interrogans* outer membrane vesicles in a hamster model. *J Vaccines Vaccin* 2014;5(4):239.
- [74] Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Sonnenberg MS, Kaper JB. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 1999 Jul;33(2):296-306.
- [75] Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Sonnenberg MS, Kaper JB. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998 Apr;28(1):1-4.
- [76] McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 1997 Jan;23(2):399-407.
- [77] Baumann D, Salia H, Greune L, Norkowski S, Korner B, Uckelely ZM, Frankel G, Guenot M, Ruter C, Schmidt MA. Multitalented EspB of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) enters cells autonomously and induces programmed cell death in human monocytic THP-1 cells. *Int J Med Microbiol* 2018 Apr;308(3):387-404.
- [78] Tobe T, Schoolnik GK, Sohel I, Bustamante VH, Puente JL. Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996 Sep;21(5):963-975.
- [79] Leverton LQ, Kaper JB. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an in vitro model of infection. *Infect Immun* 2005 Feb;73(2):1034-1043.
- [80] Francis MS, Wolf-Watz H, Forsberg A. Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 2002 Apr;5(2):166-172.
- [81] Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Dec 21;96(26):15196-15201.

- [82] Federle MJ. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol* 2009;16:18-32.
- [83] Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 25;98(20):11638-11643.
- [84] Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2001 Oct;3(10):669-679.
- [85] Barnett Foster D, Philpott D, Abul-Milh M, Huesca M, Sherman PM, Lingwood CA. Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. *Microb Pathog* 1999 Nov;27(5):289-301.
- [86] Guttman JA, Samji FN, Li Y, Vogl AW, Finlay BB. Evidence that tight junctions are disrupted due to intimate bacterial contact and not inflammation during attaching and effacing pathogen infection in vivo. *Infect Immun* 2006;74(11):6075-6084.
- [87] Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2004 Aug;6(8):783-793.
- [88] Schierack P, Rodiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B, Romer A, Frommel U, Wieler LH, Schroder C. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PLoS One* 2013 Apr 26;8(4):e59242.
- [89] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
- [90] Elliott SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, Mellies JL, Wainwright LA, Batchelor M, Frankel G, Knutton S, Kaper JB. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999 Sep;33(6):1176-1189.
- [91] Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999 Apr;276(4):941-950.
- [92] Gale EF, Epps HMR. The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochem J* 1942;36(7-9):600-618.
- [93] Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;181(11):3525-3535.
- [94] Garcia Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA. Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 1996 Jan 12;84(1):165-174.
- [95] Soutourina OA, Bertin PN. Regulation cascade of flagellar expression in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2003 Oct;27(4):505-523.
- [96] Stella NA, Kalivoda EJ, O'Dee DM, Nau GJ, Shanks RM. Catabolite repression control of flagellum production by *Serratia marcescens*. *Res Microbiol* 2008 Sep-Oct;159(7-8):562-568.
- [97] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015 Oct;13(10):620-630.

- [98] Mariam SH, Zegeye N, Tariku T, Andargie E, Endalafer N, Aseffa A. Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. BMC Res Notes 2014 Sep 4;7:606.
- [99] Quinteiro-Filho WM, Brisbin JT, Hodgins DC, Sharif S. *Lactobacillus* and *Lactobacillus* cell-free culture supernatants modulate chicken macrophage activities. Res Vet Sci 2015 Dec;103:170-175.
- [100] Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. Cell Microbiol 2007 Mar;9(3):804-816.
- [101] Wang H, Bastian SE, Cheah KY, Lawrence A, Howarth GS. *Escherichia coli* Nissle 1917-derived factors reduce cell death and late apoptosis and increase transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell damage. Cancer Biol Ther 2014 May;15(5):560-569.
- [102] Wang H, Jatmiko YD, Bastian SE, Mashtoub S, Howarth GS. Effects of supernatants from *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Faecalibacterium prausnitzii* on intestinal epithelial cells and a rat model of 5-fluorouracil-induced mucositis. Nutr Cancer 2017 Feb-Mar;69(2):307-318.
- [103] Marteau P. Evidence of probiotic strain specificity makes extrapolation of results impossible from a strain to another, even from the same species. Ann Gastroentol Hepatol 2011;(2):1-3.
- [104] Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. FEMS Immunol Med Microbiol 1999 Nov;26(2):137-142.
- [105] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom 2015 Apr;20(2):107-126.
- [106] Qin H, Zhang Z, Hang X, Jiang Y. *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. BMC Microbiol 2009 Mar 31;9:63.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während dieser besonderen Zeit am Institut begleitet haben.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. M. Alexander Schmidt, bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit Teil einer so herzlich geleiteten Arbeitsgruppe sein zu können und meine ersten wissenschaftlichen Erfahrungen hier sammeln zu dürfen.

Dr. Christoph Cichon danke ich für die engagierte Betreuung. Danke, dass du dir immer Zeit für mich genommen und eine Antwort auf jede meiner Fragen gefunden hast.

Auch dem restlichen Team möchte ich für die gute Stimmung im Labor und das offene Ohr für Fragen danken. Besonders hervorheben möchte ich Britta und Lilo. Dir, Britta, danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und dir, Lilo, für die großartigen elektronenmikroskopischen Bilder.

Den Mädels möchte ich für die vielen schönen und lustigen Momente im Labor und auch außerhalb des Instituts danken. Ich bin sehr froh darüber in dieser Zeit ein paar besondere Freundschaften geschlossen zu haben.

Zusätzlich gilt mein Dank der Hans-Böckler-Stiftung für die finanzielle Unterstützung sowie dem Medizinerkolleg der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die promotionsbegleitenden Veranstaltungen zum Erlernen der guten wissenschaftlichen Praxis.

Abschließend möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Peter Schierack und Jörg Weinreich von der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg (Fachgebiet Multiparameterdiagnostik) für die Bereitschaft zur Kooperation im Rahmen der Adhärenzstudien danken.

# Lebenslauf

# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer	n	Nano
%	Prozent	Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius	PFA	Paraformaldehyd
µ	Mikro	S	Sekunde
A	Ampere	St	Stadium
BE	Blutentnahme	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
BSA	Bovines Serumalbumin	U	Umdrehungen
bzw.	beziehungsweise	u. a.	unter anderem
cfu	<i>colony forming units</i>	V	Volt
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	v/v	<i>volume per volume</i>
Da	Dalton	vgl.	vergleiche
engl.	englisch	w/v	<i>weight per volume</i>
et al.	et alii	WB	Western Blot
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>	z. B.	zum Beispiel
g	Erdbeschleunigung		
g	Gramm		
h	Stunde		
HNO	Hals-Nasen-Ohren		
IF	Immunfluoreszenz		
i. F.	im Folgenden		
KBP	Kilobasenpaare		
l	Liter		
M	Mega		
M	Molar		
m	Meter		
m	Milli		
m <sup>2</sup>	Quadratmeter		
min	Minute		

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Bakterienstämme .....	19
Tabelle 2	Verwendete eukaryotische Zelllinien .....	19
Tabelle 3	Verwendete Kulturmedien zur Kultivierung von enteropathogenem <i>Escherichia coli</i> E2348/69. ....	20
Tabelle 4	Verwendete Kulturmedien und Reagenzien zur Kultivierung von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....	20
Tabelle 5	Zusammensetzung des Kulturmediums zur Kultivierung von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ....	20
Tabelle 6	Verwendete Kulturmedien und Reagenzien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen.....	21
Tabelle 7	Zusammensetzungen der Kulturmedien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen .....	21
Tabelle 8	In der Zellkultur verwendete Puffer .....	21
Tabelle 9	Verwendete Antikörper .....	22
Tabelle 10	Verwendete Primer.....	23
Tabelle 11	Verwendete Enzyme.....	24
Tabelle 12	Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 13	Verwendete fluoreszenzkonjugierte Substrate.....	24
Tabelle 14	Verwendete Kits.....	25
Tabelle 15	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 16	Verwendete Geräte .....	26
Tabelle 17	Verwendete Programme und Software .....	27
Tabelle 18	Inkubationsansätze .....	29
Tabelle 19	Verwendete Kultivierungskompartimente und Kulturmedienmenge.....	31
Tabelle 20	Zellzahlen zum Aussäen von T84-Zellen .....	32
Tabelle 21	Zellzahlen zum Aussäen von HT29-Zellen .....	32
Tabelle 22	Adhärenzstudien.....	34
Tabelle 23	Zusammensetzung des TE-Puffers .....	36
Tabelle 24	Zusammensetzung des Lyse-Puffers pro Ansatz .....	36
Tabelle 25	Ansatz für die cDNA-Synthese .....	38
Tabelle 26	Auswahl der zu untersuchenden Gene .....	39
Tabelle 27	Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes.....	39
Tabelle 28	Ablauf der qRT-PCR.....	40
Tabelle 29	Zusammensetzung der Sammelgel-Lösung.....	41
Tabelle 30	Zusammensetzung der Trenngel-Lösung .....	41
Tabelle 31	Zusammensetzung der Gele .....	41
Tabelle 32	Zusammensetzung des 4 x SDS-Probenpuffers.....	42
Tabelle 33	Zusammensetzung des 10-fach Laufpuffers .....	42
Tabelle 34	Zusammensetzung der Coomassie Brilliant Blue Färbelösung.....	43
Tabelle 35	Zusammensetzung der Entfärbelösung .....	43
Tabelle 36	Zusammensetzung des Transferpuffers.....	43
Tabelle 37	Zusammensetzung des PBS Puffers .....	45
Tabelle 38	Zusammensetzung des PBST Waschpuffers.....	45
Tabelle 39	Zusammensetzung des Stripping Puffers .....	46

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Organisation des Gastrointestinaltrakts (GIT) und Zusammensetzung des residenten Mikrobioms. ....	2
Abbildung 2	Funktionen probiotischer Mikroorganismen. ....	6
Abbildung 3	Adhäsive Eigenschaften von Flagellen. ....	12
Abbildung 4	<i>Outer membrane vesicles</i> (OMVs). ....	12
Abbildung 5	Chromosom (A) und Plasmide (B) des EPEC E2348/69. ....	14
Abbildung 6	Der LEE ( <i>locus of enterocyte effacement</i> ) des EPEC E2348/69. ....	14
Abbildung 7	Das <i>Type III secretion system</i> (TTSS) des EPEC. ....	16
Abbildung 8	Die vier Stadien der Pathogenese einer EPEC-Infektion. ....	17
Abbildung 9	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> Stamms E2348/69. ....	47
Abbildung 10	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69. ....	48
Abbildung 11	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> E2348/69 nach der Infektion von Muzin-produzierenden HT29-MTX-E12-Zellen. ....	49
Abbildung 12	Ganzzelllysate des EPEC E2348/69. ....	49
Abbildung 13	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65. (A,C) Übersichten, (B,D) Detailaufnahmen. ....	50
Abbildung 14	Ganzzelllysate (A) und zellfreier Kulturüberstand (B) des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65. ....	51
Abbildung 15	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1121. (A) Übersicht, (B) Detailaufnahme der Kapselstruktur. ....	52
Abbildung 16	Wachstum des EPEC E2348/69 in LB-Medium. ....	53
Abbildung 17	Wachstum des EPEC E2348/69 in verschiedenen Medien. ....	53
Abbildung 18	Wachstum des EPEC E2348/69 in LB-MRS-Mischkultur. ....	54
Abbildung 19	Enteropathogener <i>Escherichia coli</i> E2348/69 gewachsen in LB-MRS-Mischkultur (A-F). ....	56
Abbildung 20	Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene des EPEC E2348/69 nach erfolgreichem Wachstum in verschiedenen Medien. ....	57
Abbildung 21	Immunochemischer Nachweis von ausgewählten Virulenzproteinen. ....	58
Abbildung 22	Immunochemischer Nachweis von Tir ( <i>translocated intimin receptor</i> ) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. ....	59
Abbildung 23	Immunochemischer Nachweis von EspD ( <i>Escherichia coli Type III secretion system protein D</i> ) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. ....	59
Abbildung 24	Immunochemischer Nachweis von BfpA ( <i>bundle forming pili, subunit A</i> ) in EPEC E2348/69-Ganzzelllysaten nach Wachstum in unterschiedlichen Medien. ....	60
Abbildung 25	Densitometrische Analyse der BfpA-Banden im Western Blot. ....	61
Abbildung 26	Transkriptionsraten ausgewählter Virulenzgene des EPEC E2348/69 nach Inkubation für 6 h mit LB- und MRS-Medium. ....	62
Abbildung 27	Inkubationsansatz mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 Übernachtskultur (ONC) und zellfreiem Kulturüberstand (SN). ....	62
Abbildung 28	Inkubationsansatz mit PBS-gewaschener <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 Übernachtskultur (ONC, gewaschen). ....	63
Abbildung 29	Inkubationsansatz mit zellfreiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 Überstand, nativ (SN) und dialysiert gegen LB-Medium (SN, dialysiert). ....	64
Abbildung 30	Lichtmikroskopische Aufnahmen der T84-Zellen. ....	65
Abbildung 31	T84-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie. ....	65

Abbildung 32	T84-Zellen, infiziert mit EPEC E2348/69 in der Fluoreszenzmikroskopie. ....	66
Abbildung 33	HT29-Zellen in der Lichtmikroskopie. ....	67
Abbildung 34	HT29-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie. ....	67
Abbildung 35	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EPEC E2348/69-infizierten HT29-Zellen. Darstellung der <i>Tight Junctions</i> Proteine Jam-A (A), ZO-2 (B) und Claudin 1 (C).....	68
Abbildung 36	HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie.....	69
Abbildung 37	Zell-Zell-Kontakte der HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. ....	69
Abbildung 38	Intrazelluläre Strukturen der HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. ....	70
Abbildung 39	EPEC E2348/69 auf HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. ....	70
Abbildung 40	EPEC E2348/69 auf HT29-Zellen in der Elektronenmikroskopie. ....	71
Abbildung 41	Adhärenz des EPEC E2348/69 an T84-Zell-Monolayern mit einer MOI von 1,5.....	72
Abbildung 42	Adhärenz des EPEC E2348/69 an T84-Zellen nach Prä- (= Ausschluss) oder Ko- Inkubation (= Konkurrenz) mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 bei Infektionszeiten von 2 h und 4 h. ...	73
Abbildung 43	Adhärenz des EPEC E2348/69 an HT29-Zellen nach 1 h-Präinkubation (= Ausschluss) mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> W65 im aufsteigenden Verhältnis <i>Laktobazillen</i> : EPEC E2348/69. ....	74
Abbildung 44	Adhärenz des EPEC E2348/69 an HT29-Zellen nach 1 h-Präinkubation (= Ausschluss) mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1121 im aufsteigenden Verhältnis <i>Laktobazillen</i> : EPEC E2348/69.....	75
Abbildung 45	Antikörperbasierter Nachweis des O127-Antigens zur Detektion des EPEC E2348/69 (O127:H7). ....	82
Abbildung 46	<i>L. plantarum</i> verhindert EIEC-induzierte Umverteilung der <i>Tight Junction</i> Proteine Claudin-1, Occludin, JAM-1 und ZO-1. ....	83