

Department für Veterinärwissenschaften

# Pro-Biotika und Darm-assoziiertes Immunsystem

Cornelia Deeg



## Flug3 - BA0206

<b>Von</b>	Miami International (FL)	<b>Abflug</b>	So 13 Mai 2012 - 17:25 (Ortszeit)
<b>Nach</b>	Heathrow (London) Terminal 5	<b>Arriving</b>	Mo 14 Mai 2012 - 06:40 (Ortszeit)

**Reiseklasse** World Traveller

**Durchführende Fluggesellschaft** British Airways

## Flug4 - BA0948

<b>Von</b>	Heathrow (London) Terminal 5	<b>Abflug</b>	Mo 14 Mai 2012 - 07:55 (Ortszeit)
<b>Nach</b>	Munich Terminal 1	<b>Arriving</b>	Mo 14 Mai 2012 - 10:45 (Ortszeit)

**Reiseklasse** Euro Traveller

**Durchführende Fluggesellschaft** British Airways



- Definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen



- Probiotika spielen eine wichtige Rolle bei der Festlegung und Beibehaltung der Balance zwischen notwendigen und überschießenden Reaktionen des Immunsystems
- Wirken auf das angeborene und das erworbene Immunsystem





- Friedliche Ko-Existenz von Bakterien, Viren und Einzellern
- Kolonisieren jede Oberfläche des Körpers, die mit der Außenwelt in Kontakt ist
- Zusammensetzung und Rolle der beteiligten Bakterien wurde in den letzten Jahren zunehmend erforscht
- *Lactobacillus* (L.) und *Bifidobacterium* (B.) vordringlich untersucht
- Publikationenszahl 1991: 110; 2011: 535

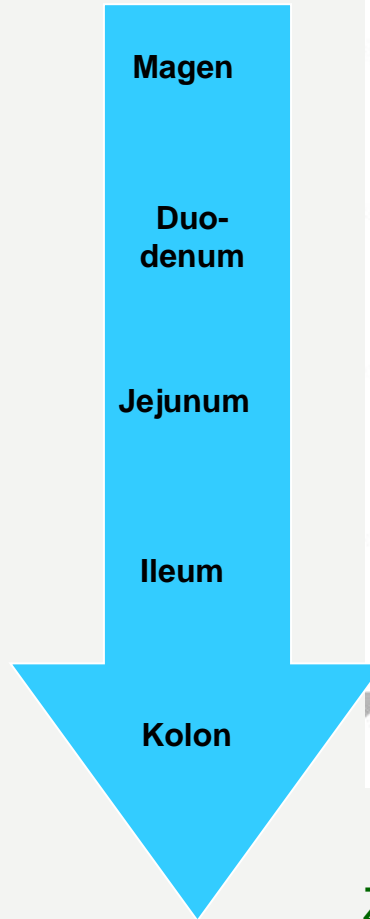


- Große Schwankungen bei Untersuchungen beim Menschen
- Ca. 500-1000 Spezies im Darm des Menschen
- Kollektives Darmmikrobiom des Menschen hat ca. 35000 Spezies
- Milchsäurebakterien sind mit weitem Abstand die wichtigsten Vertreter der als probiotisch bezeichneten Mikroorganismen



Höhere Anzahl und  
höhere Diversität

Proximal



Magen

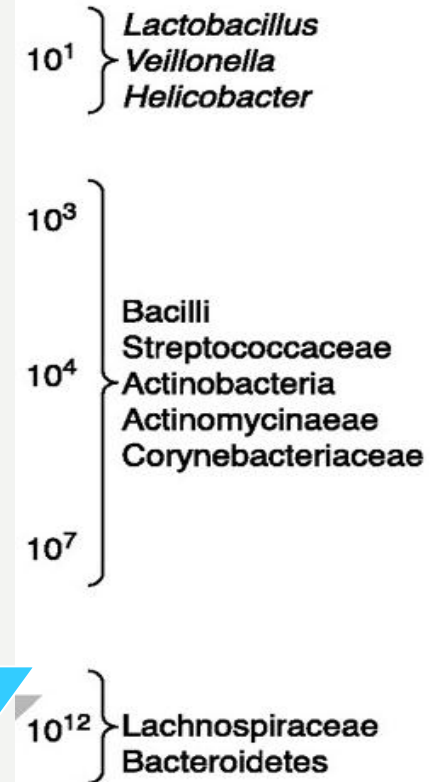
Duo-  
denum

Jejunum

Ileum

Kolon

Distal



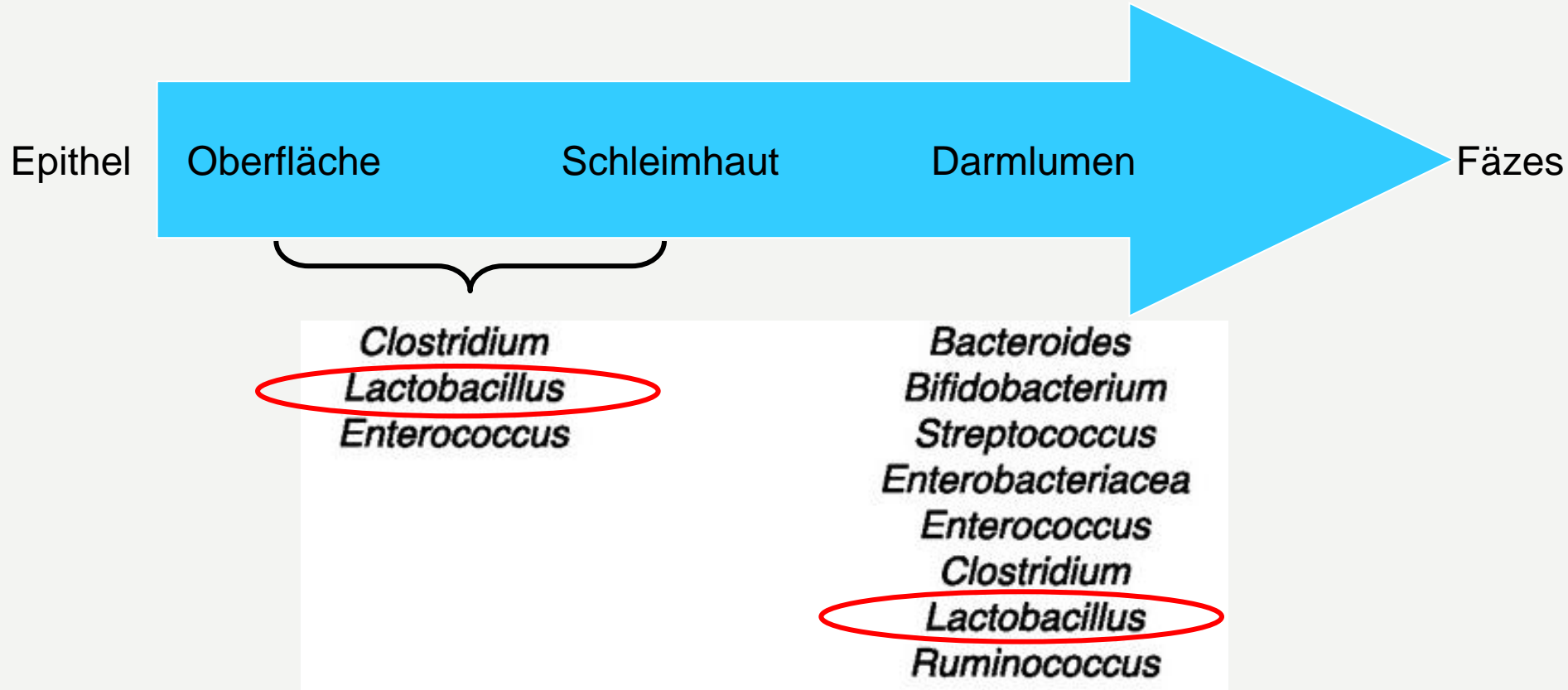
Sekirov I et al. *Physiol Rev* 2010;90:859-904

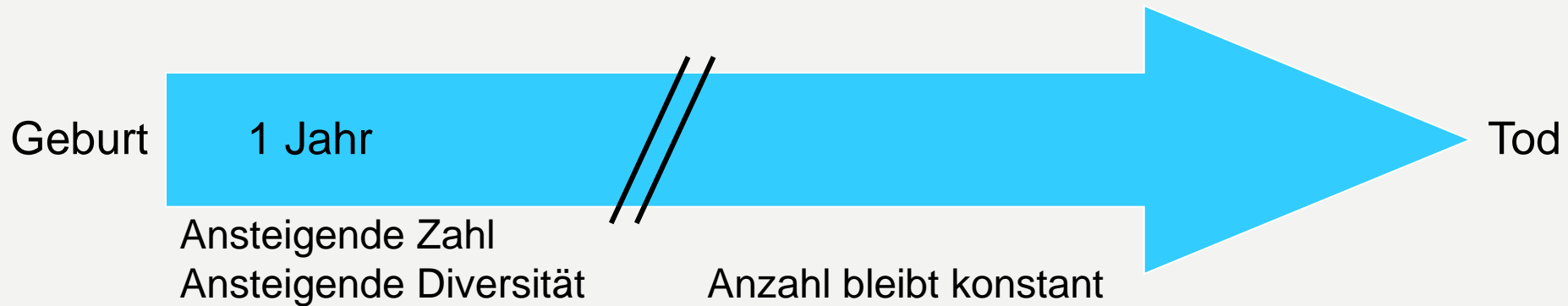
Zellen pro Gramm Darminhalt





- Großer Unterschied in der Menge der Mikroorganismen pro Gramm Darminhalt, Zunahme vom Magen zum Kolon
- Zusätzlich ändert sich die Zusammensetzung des Mikrobioms je nach Darmabschnitt (längs und quer)
- Viele Bakterien, die im Darmlumen vorhanden sind erreichen nicht die Schleimhaut und die epithelialen Strukturen, z.B. *Bifidobakterien*
- *Lactobacillus* ist in allen Schichten nachweisbar



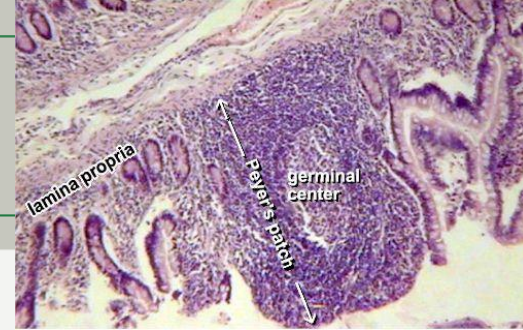


## Einflüsse:

- Maternale Besiedelung
- Diät
- Exposition über die Umwelt
- Antimikrobielle Therapie

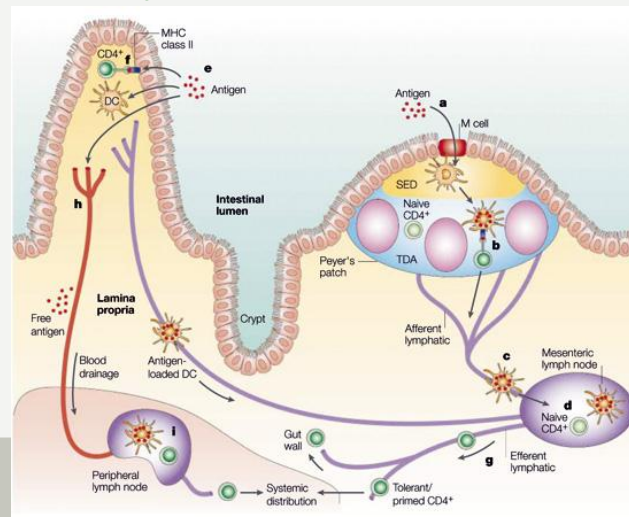


- Entwicklung der Darmkolonisierung beginnt unmittelbar nach der Geburt
- Kontakt mit den Mikroben während der Geburt führt zur Entwicklung des Darmmikrobioms
- Vaginale Besiedelung der Mutter und Darmmikrobiom des Kindes sind sehr ähnlich bei normaler Geburt und weichen ab bei Kaiserschnitt
- Darm-Mikrobiom ist sehr wichtig bei der Entwicklung des intestinalen mukosalen und systemischen Immunsystems

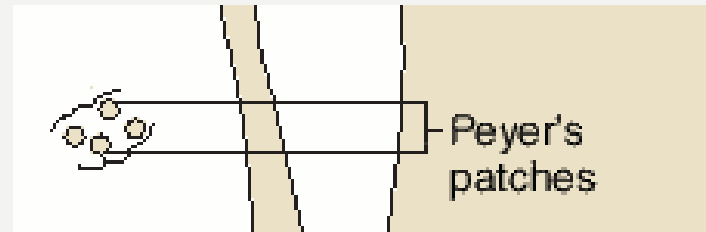


- Keimfrei aufgezogene Tiere haben defizitäre lokale und systemische lymphoide Strukturen
- Milz und Lymphknoten sind schlecht ausgeprägt
- Hypoplasie der Peyerschen Platten
- Weniger IgA produzierende Zellen, sowie weniger sekretierte Igs (IgA und IgG)
- Änderungen im Zytokinprofil
- Störung von oraler Toleranzinduktion

- Einfluss der Darm-Mikrogen auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems ist nicht überraschend
- Darmschleimhaut bietet die größte Oberfläche zur Interaktion zwischen Antigenen der Umwelt und residenten Immunzellen
- Mukosales Immunsystem hat 2 Hauptfunktionen



- 1. Toleranz gegenüber den Mikrobiota, denn sonst würde eine überschiessende und schädliche systemische Immunantwort entstehen



- 2. Aber: Die Mikroben müssen kontrolliert werden, damit es nicht zur Überwucherung kommt und/oder zur Verlagerung an andere Orte (systemische Besiedelung)

- Residente Immunzellen des Gastrointestinaltraktes haben oft einen anderen Phänotyp als die Zellen derselben Linie, die man systemisch findet
- Dendritische Zellen (DC) in der Darmmukosa induzieren eine Differenzierung von T-Zellen zu Th2 Zellen
- Dies führt zur Toleranz im GIT



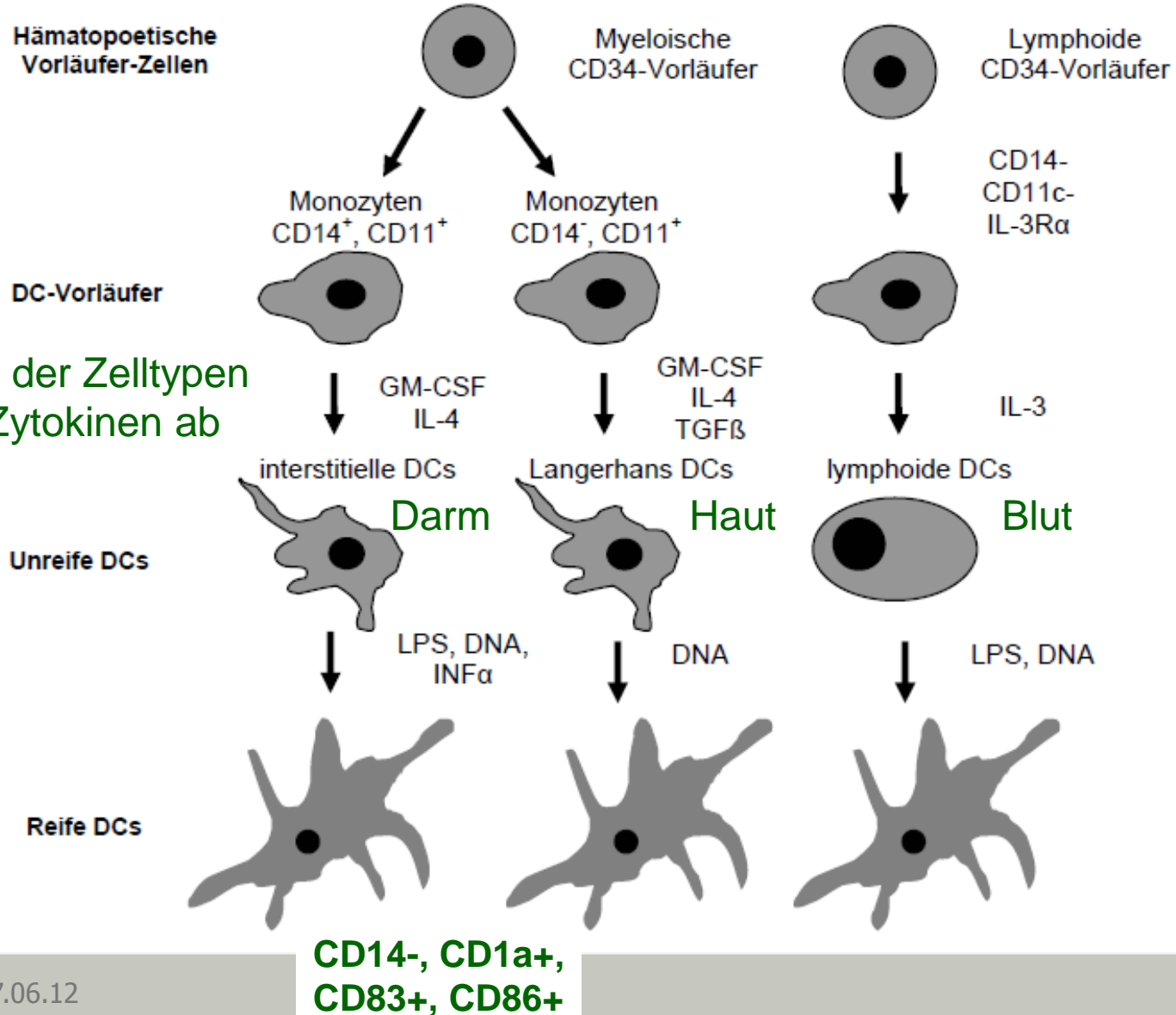




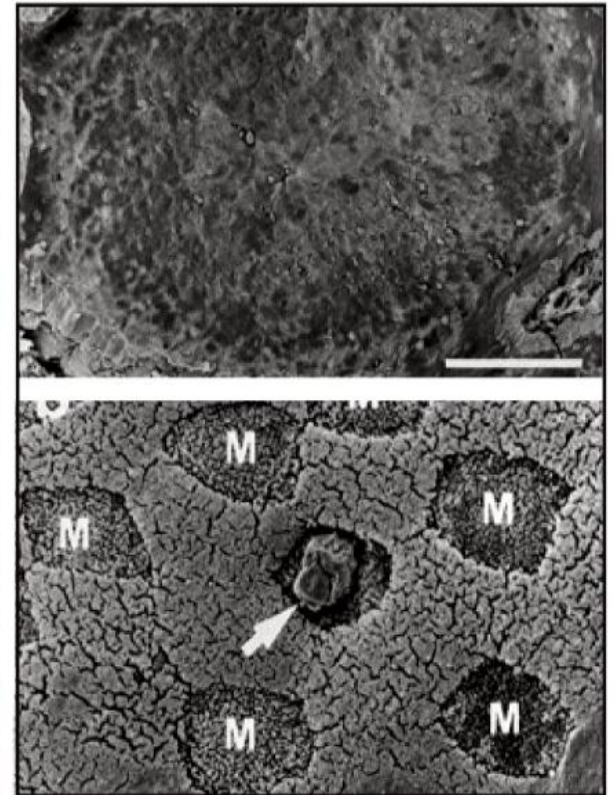
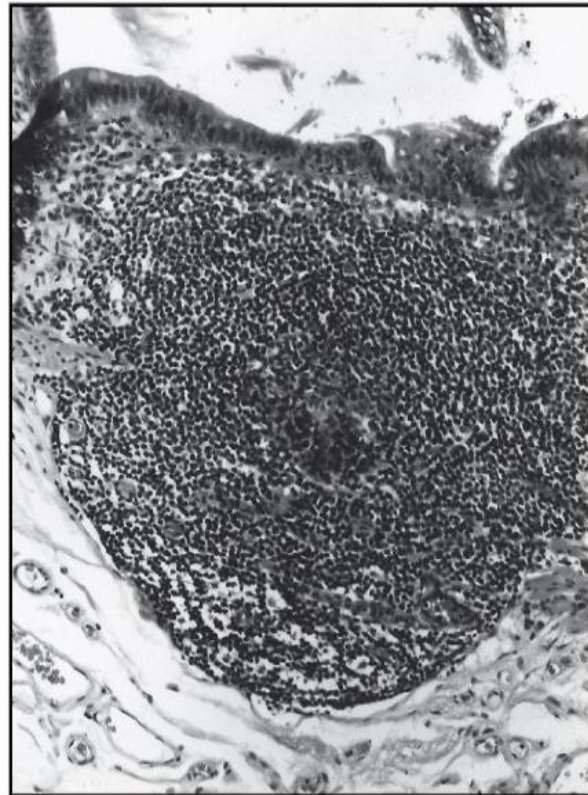
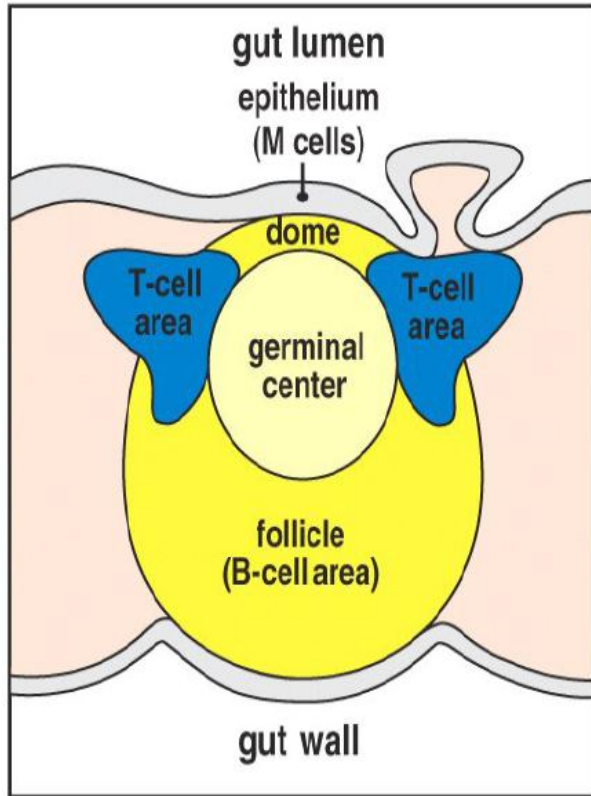
- Dendritische Zellen: Spezialisierte Antigenpräsentierer, verschiedene Phänotypen
- Jung: Sammeln Antigene, keine Kostimulation
- Gereift: Interagieren mit anderen Zellen (T-Zellen, auch B-Zellen), ko-stimulierende Aktivität



Entstehung der Zelltypen hängt von Zytokinen ab



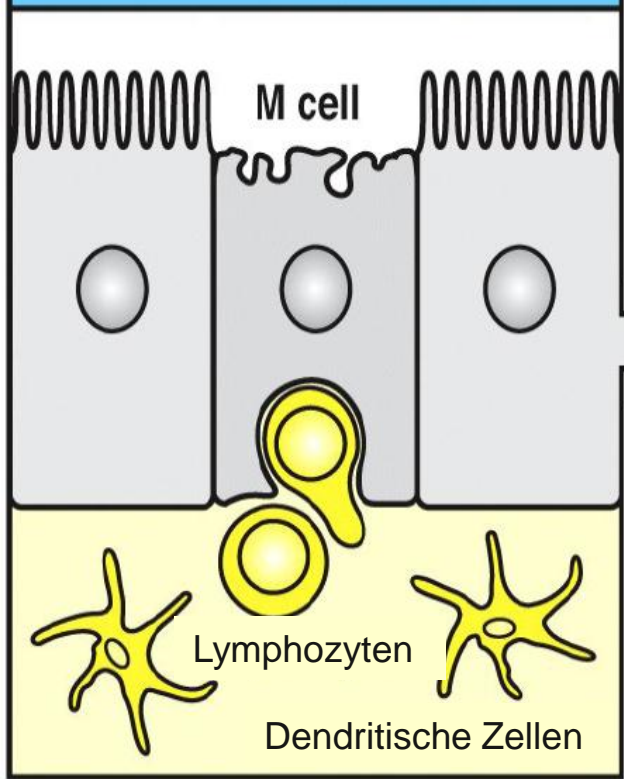
# Charakteristischer Aufbau des darmassoziierten lymphatischen Gewebes



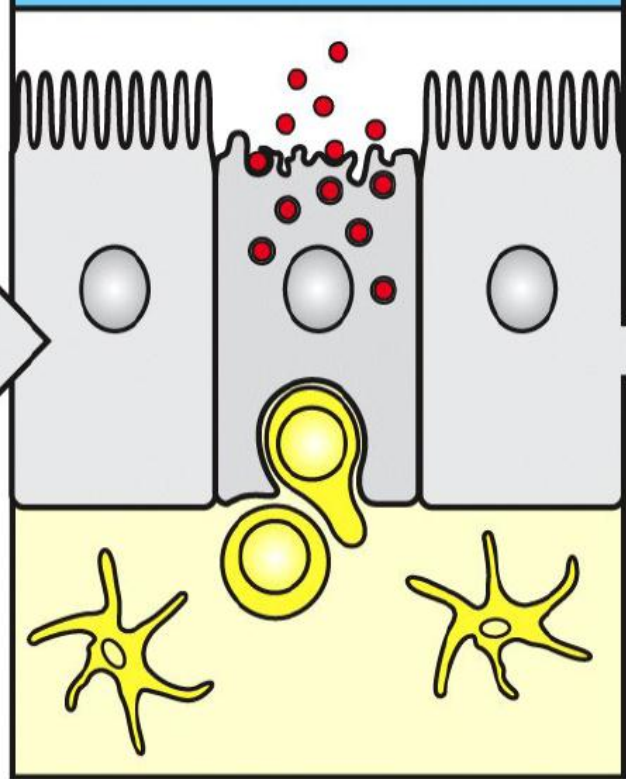
M-Zellen sind Bestandteil des Darmepithels und transportieren Antigen

aus Lehrbuch Janeway: Immunobiology

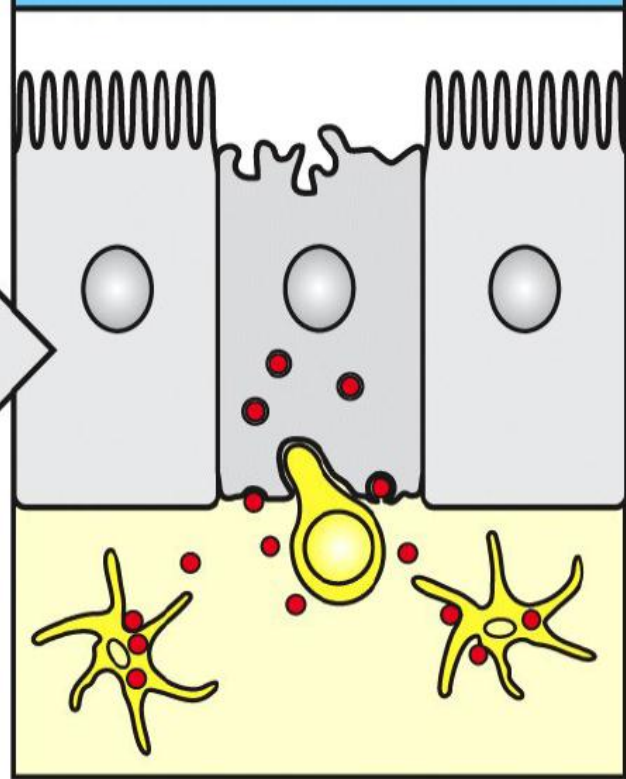
**M-Zellen sitzen zwischen den Enterozyten, im engen Kontakt mit subepithelialen Lymphozyten und dendritischen Zellen**



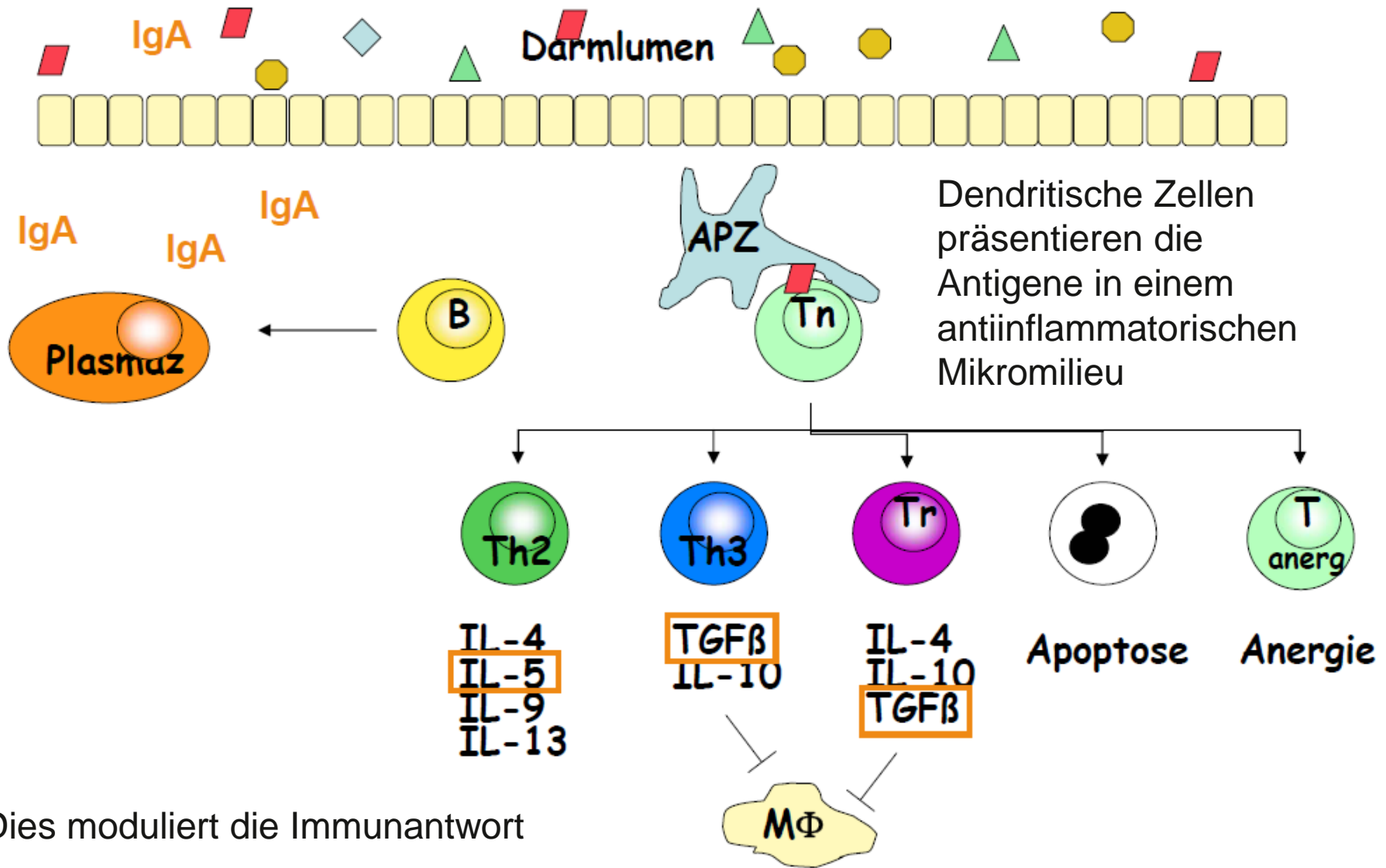
**M-Zellen nehmen Antigen aus dem Darmlumen über Endozytose auf**



**Antigene werden in Richtung Subepithel abgegeben und von den Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen**

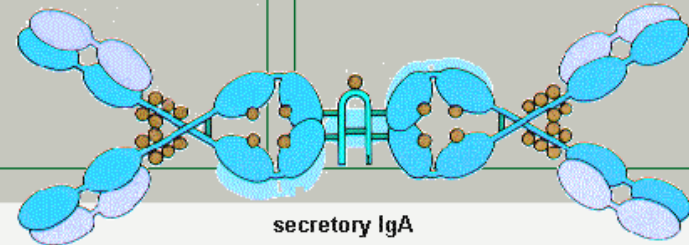


# Im gesunden Darm fördern anti-inflammatorische Zytokine und regulatorische T-Zellen die Toleranzentwicklung





- Versuch: DC *in vitro* stimuliert mit verschiedenen Mikroben, die aus dem Darm isoliert wurden (verschiedene *Lactobacillus* Stämme oder *E.coli*): Mikrobiota induzierten mehr oder weniger TGF- $\beta$  Sekretion durch die intestinalen Epithelzellen
- Insgesamt waren die gram+ *Lactobacillus* effektiver als gram- *E.coli* bei der Konditionierung von DCs zu einem tolerogenen Phänotyp
- Ein anderer Stamm verhindert die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors Nf $\kappa$ B



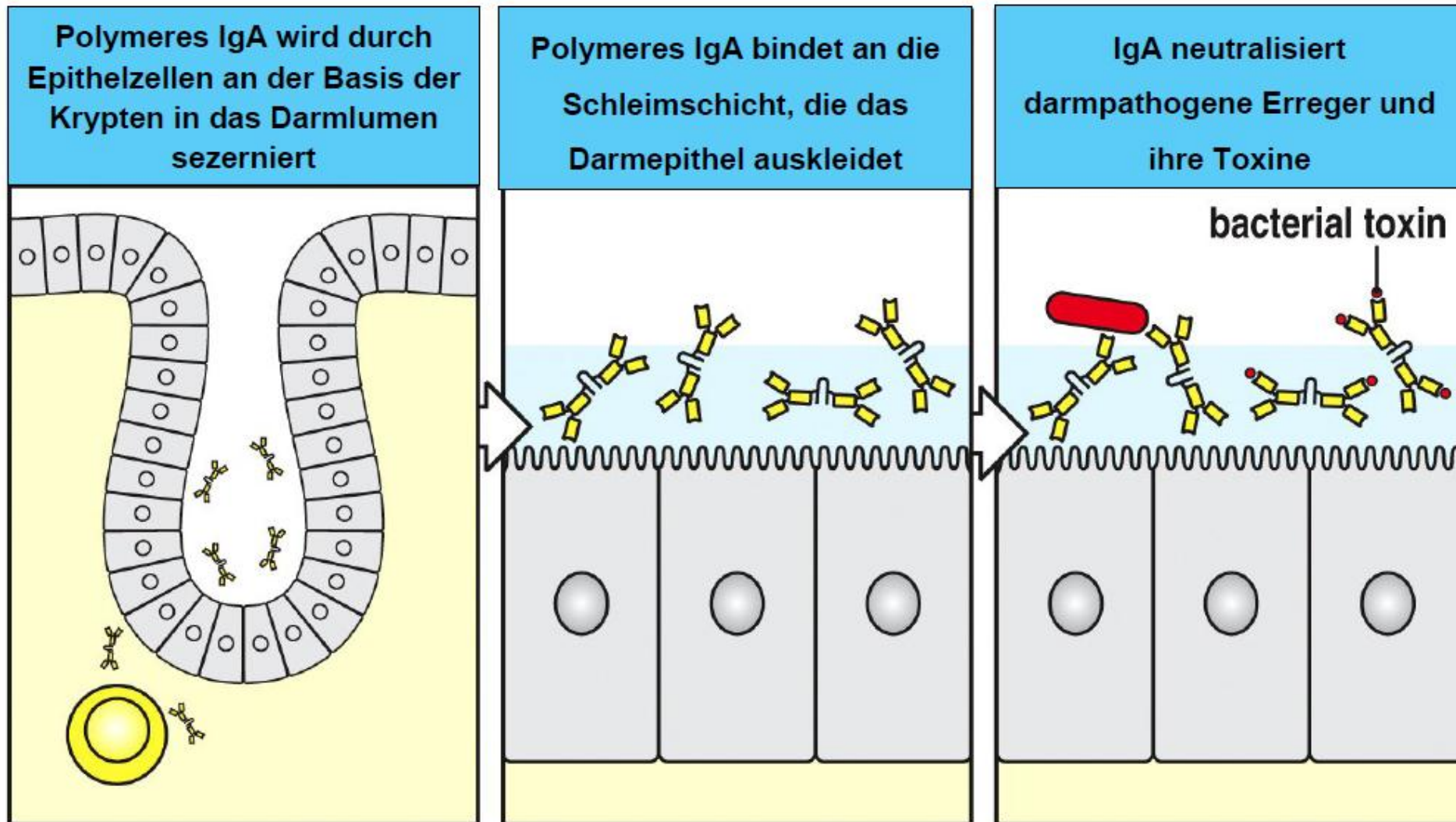
- Plasmazellen der intestinalen Mukosa produzieren sekretorisches IgA, das die Darm-Mikroben bedeckt und darüber die Kontrolle ihrer Anzahl erlaubt
- Zwei sekretorische IgA Subklassen, sIgA1 (systemisch und an mukosalen Oberflächen) und sIgA2 (produziert an mukosalen Oberflächen)
- sIgA2 ist gegenüber bakteriellen Proteasen stabiler und wird bevorzugt von den Lamina Propria Zellen gebildet



- IgA: im Blut als Monomer
- Hauptfunktion ist Schutz äußerer Oberflächen
- Plasmazellen in der Submucosa sezernieren dazu zwei durch eine J-Kette verbundene IgA-Moleküle
- Dimer wird transzytotisch durch die Zelle ins Lumen geschleust
- Teil des Rezeptors wird abgeschnitten und bleibt als secretory component (SC) am IgA-Dimer=polymeres IgA



# Der dominierende Isotyp der Mukosa ist IgA



- Secretory component schützt sIgA vor Proteasen im Darm und ist stark glykosyliert
- Das führt dazu, dass sIgA in der dünnen Schleimschicht über dem Epithel konzentriert bleibt
- Dort verhindert es, dass Viren, Bakterien und Toxine an ihre Rezeptoren binden können

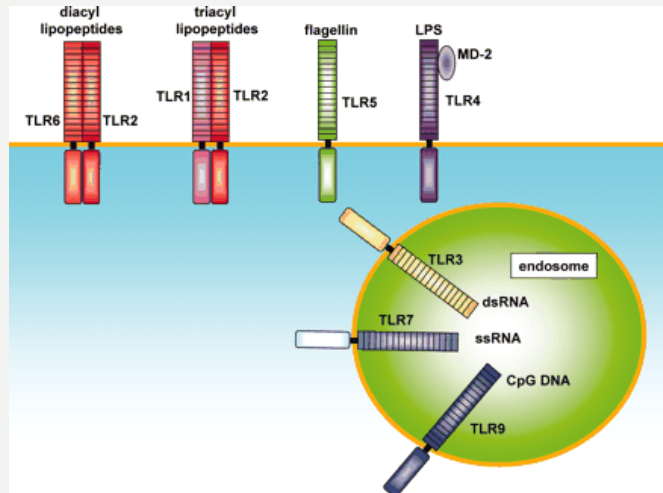


- *Laktobacillae*, *Bifidobakterien* und *Saccharomyces* sind momentan die drei am häufigsten eingesetzten und untersuchten Probiotika bei Mensch und Tier
- Die Modulation des Immunsystems ist dabei der plausibelste Mechanismus, über den die Probiotika sich positiv auf die Gesundheit des Wirtes auswirken
- Etliche positive Effekte von Probiotika auf das Darm-assoziierte Immunsystem entdeckt



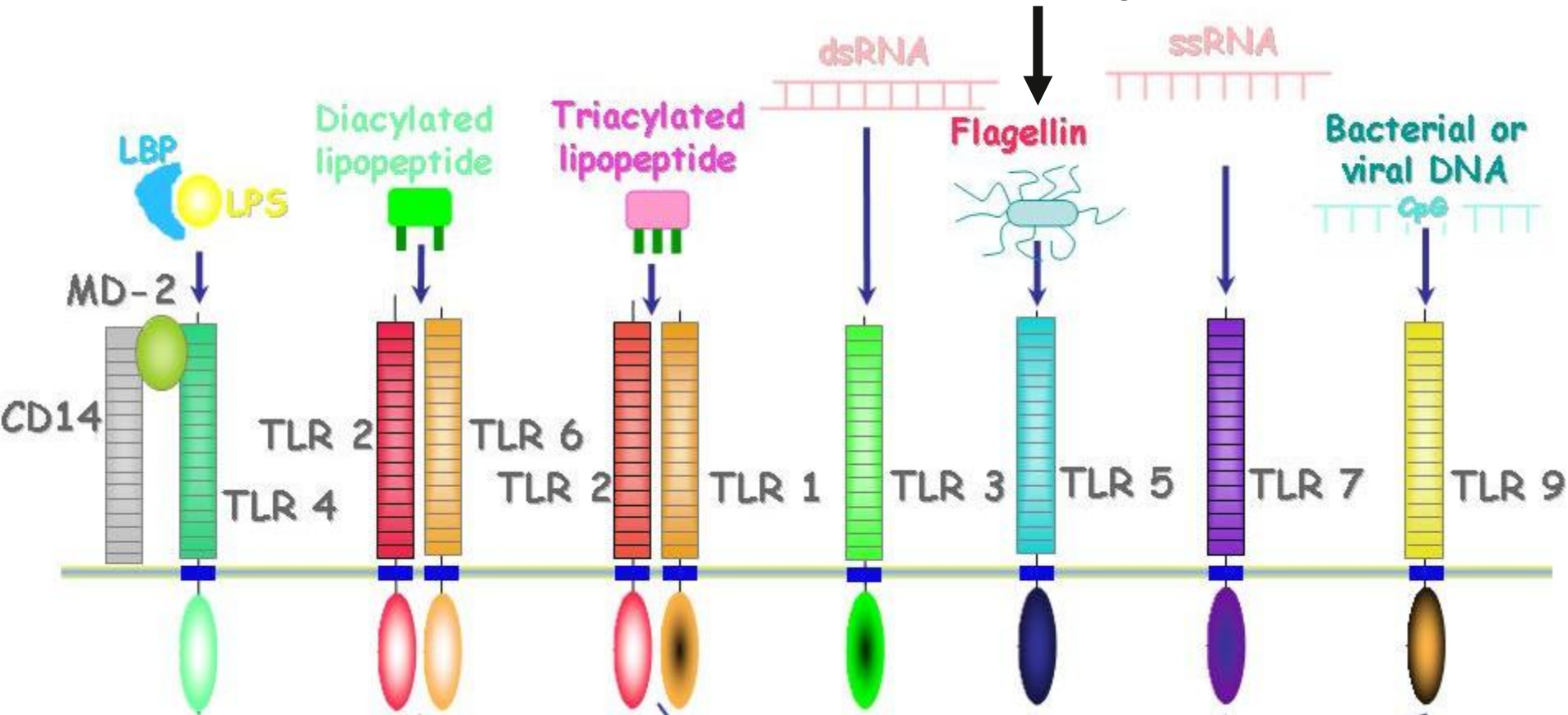
- Stamm wurde im 1. Weltkrieg vom Chirurgen Alfred Nißle isoliert aus Fäzes eines Soldaten, der im Gegensatz zu anderen nicht an einem schwerwiegenden Ausbruch von Shigellose erkrankte
- *E.coli* aus dem Darm produzieren Mikroazine, die einen Barriereeffekt gegen pathogene *E. coli* haben
- *E. coli* Nissle hat ein sehr effektives H1 Flagellin, das an TLR5 bindet und darüber IL-8 Sekretion induziert

- Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems
- Diese Rezeptoren erkennen Muster (pattern Recognition Receptors), die mit Pathogenen assoziiert sind, z.B. von Viren oder Bakterien stammende Nukleinsäuren





E. coli Nisse  
Über H1 Flagellin



PROBIOTIC EFFECT OF  
*E. coli* NISSLE 1917

FITNESS FACTORS

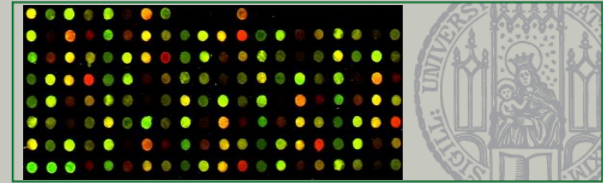
- Multiple Fe uptake systems
- Exceptionally good gut colonization (adhesins)
- Host safety (no virulence factors, semirough LPS)

INTERFERE

- Induction of anti-peptides
- Microcins
- Colonization resi

Modulation des Immunsystems

- Aktivierung der Immunabwehr über Induktion von IL-8
- Antigenerkennung über TLR5
- Stärkung der tight junctions
- Anti-inflammatorische Wirkung

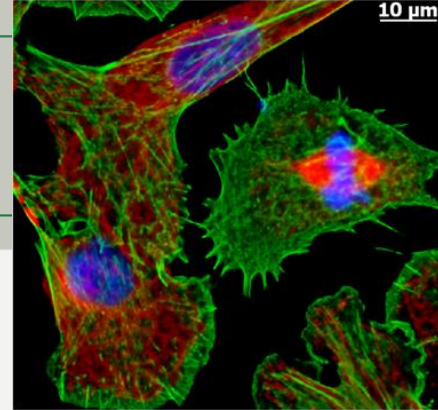


- Funktionelle Genomanalyse von drei *E. coli* Stämmen (83972, Nissle 1917 und CFT073) zeigte eine enge Verwandtschaft dieser Stämme
- Die aktiven Genprofile sind sehr ähnlich zwischen den drei Stämmen
- Dies ist erstaunlich, weil die erstgenannten Stämme Probiotika in Urin und Fäzes sind, der dritte aber ein uropathogener Stamm
- Bislange ist unklar, wie die Stämme trotz ähnlicher Transkriptome unterschiedliche Funktionen ausüben





- $10^9$  oder  $10^{11}$  CFU/Tag wurden über 21 Tage an Ferkel verfüttert
- Überprüfung der Anzahl und Verteilung von Zellen des GALT (Granulozyten, Mastzellen, CD4+, CD8+, CD25+, IgA+-Lymphozyten)
- Mukosale mRNA Expr.: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10
- Antimikrobielle Peptide: Prepro-defensin-beta 1
- Hohe Varianz der Zellzahl im Dünndarm und Kolon bei allen Gruppen, unabhängig von der Dosis
- Hochdosisgabe erhöhte mukosale CD8+ Zellen



- Probiotika regulieren angeborene und erworbene Immunantworten über die Modulation von dendritischen Zellen, T- und B-Zellen
- Humane Caco-2 Zellen plus *L. johnsonii* N6.2 reguliert TLR 7 und 9 Expression hoch
- Höhere immunologische Aktivierung über TLR9 Expression auf der Darmzelloberfläche



- Ergebnisse variieren je nach verwendetem System, auch in der Zellkultur, also welche DCs verwendet wurden und aus welcher Spezies
- *Bifidobacterium bifidum* führte zur Hochregulation von CD86 und MHC II in humanen neonatalen DC und das aktivierte IFN- $\gamma$  T-Zellen
- *Lactobacillus reuteri* induzierte eine Th2 Antwort bei DCs aus der Maus, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden

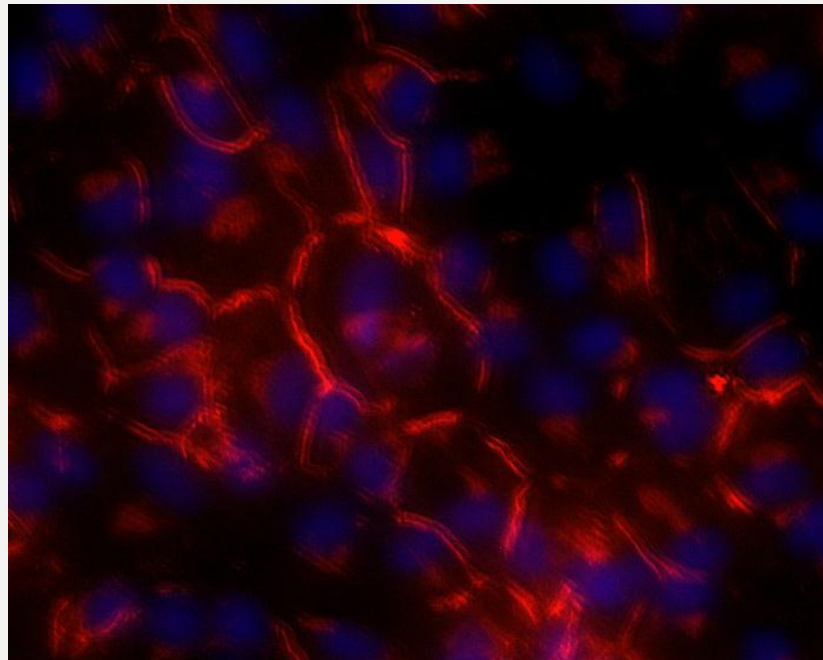


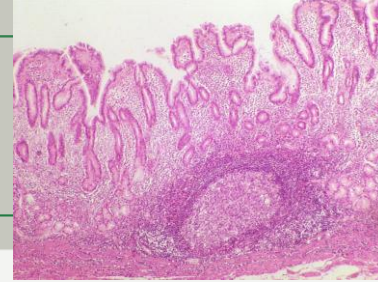
- Auch Hefen wie *Saccharomyces* haben probiotische Effekte
- In Mäusen führte die orale Gabe von *S. cerevisiae* zur Verhinderung von bakterieller Translokation von *E. coli* ins Blut
- Behandlung mit Hefe führte zur verringerten intestinalen Permeabilität
- Diese Effekte konnten mit lebender, aber auch hitzeinaktivierter Hefe erzielt werden



- Beide Behandlungen mit Hefe induzierten signifikant erhöhte IL-10 Werte, aber nur lebende Hefe induzierte sIgA
- Beide Hefen verhinderten den Transfer der Bakterien ins Blut, vermutet wird ein Mechanismus über Immunmodulation und Stärkung der Darmschrankenintegrität
- Die Stimulation der IgA-Produktion ist von lebenden Hefen abhängig

- *Lactobacillae* oder Bifidobakterien plus sIgA erhöhen die transepitheliale Resistenz von Darmzellen über die Phosphorylierung von tight junction Proteinen wie ZO-1 oder Occludin





- Verkompliziert wird das Verständnis der Effekte von Probiotika durch die Ergebnisse einer Plazebo-kontrollierten Doppelblindstudie, die bei gesunden Menschen die Effekte von *L. acidophilus lafti* L10, *Lactobacillus casei* CRL-431 und *L. rhamnosus* GG auf die Mukosa untersuchte
- Effekte unterschieden sich von Person zu Person



- Zum anderen induzierten die drei untersuchten probiotischen Bakterien verschiedene Gen-regulierte Netzwerke in der Dünndarmmukosa
- *L. acidophilus lafti* L10 regulierte Gene, die eine Th1-Immunreaktion mediieren,  
*Lactobacillus casei* CRL-431 vermittelte eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung einer Th2-Immunantwort und *L. rhamnosus* GG modulierte die Ionen-Homöostase





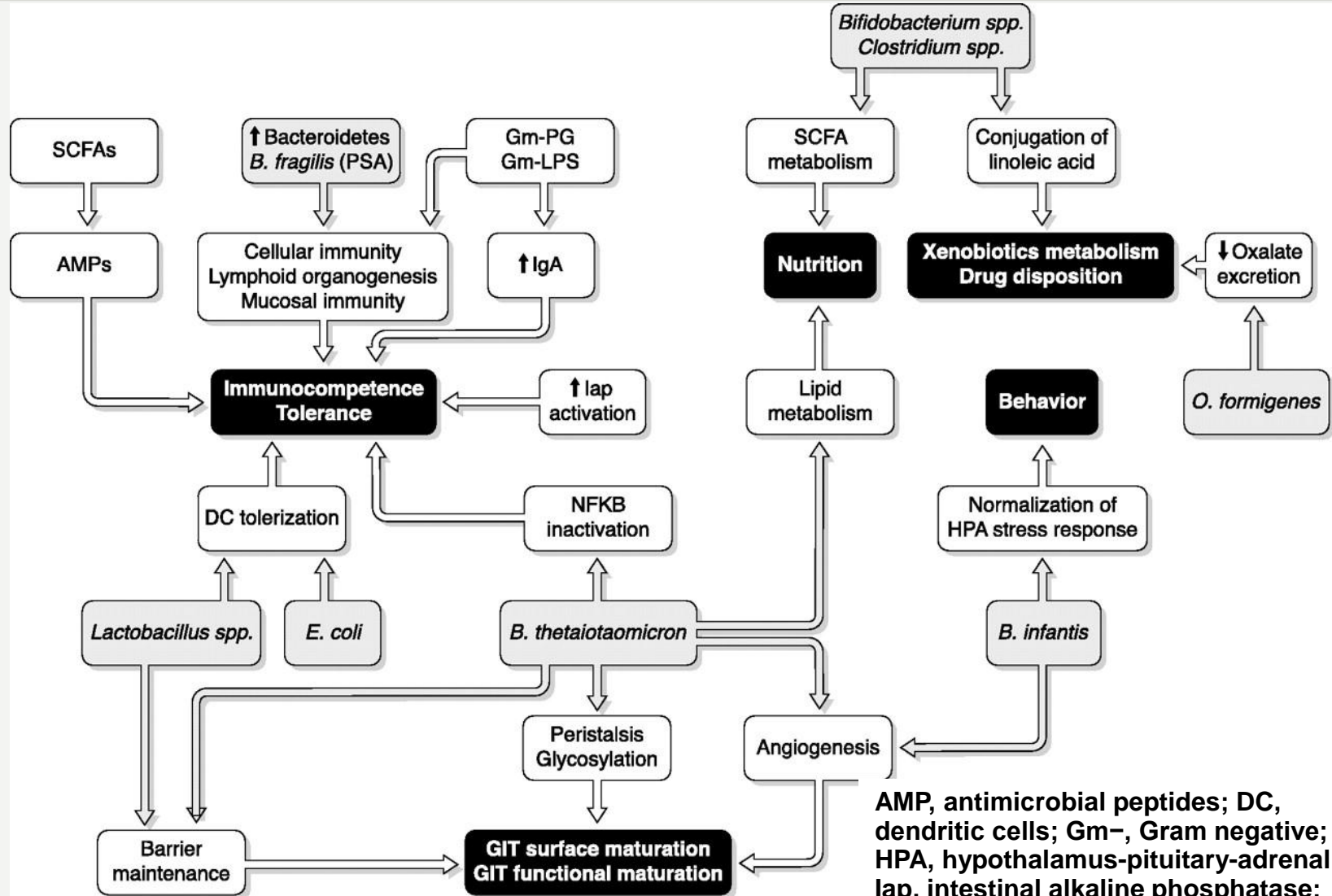
## LETTER

doi:10.1038/nature10554

**Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination**Kerstin Berer<sup>1</sup>, Marsilius Mues<sup>1</sup>, Michail Koutrolos<sup>1</sup>, Zakeya Al Rasbi<sup>1</sup>, Marina Boziki<sup>1</sup>, Caroline Johner<sup>2</sup>, Hartmut Wekerle<sup>1</sup> & Gurumoorthy Krishnamoorthy<sup>1</sup>

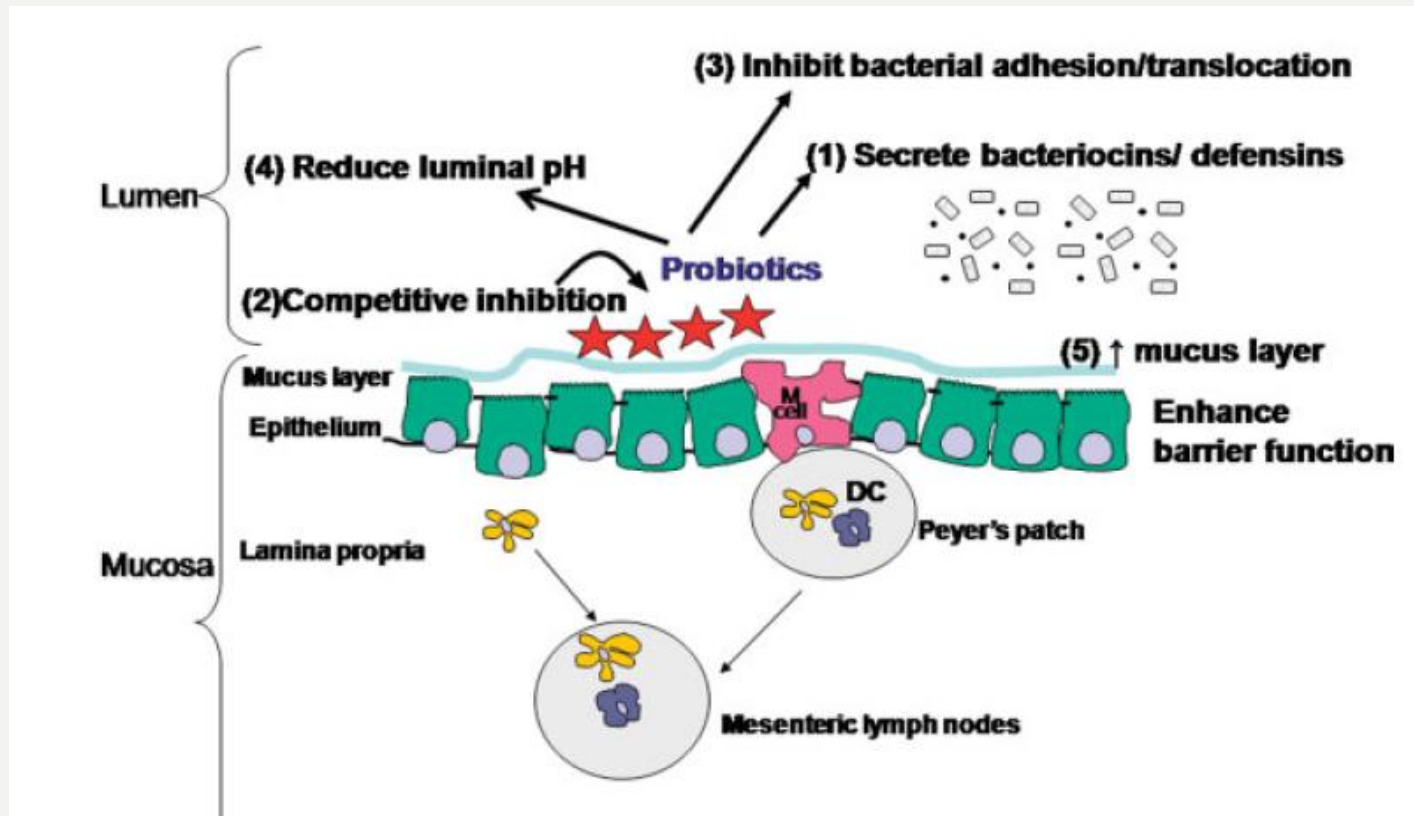
- Mausmodell zur MS (EAE): normale Darmflora (ohne Pathogene) ist essenziell, damit eine autoreaktive Immunreaktion entwickelt wird
- Keimfrei gehaltene Mäuse produzieren dagegen keine aktivierten autoaggressiven T-Zellen und keine Autoantikörper gegen MOG

# Verschiedene Darm-Mikrobiota beeinflussen verschiedene Pfade



AMP, antimicrobial peptides; DC, dendritic cells; Gm-, Gram negative; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; lap, intestinal alkaline phosphatase; PG, peptidoglycan; PSA, polysaccharide A.

- Probiotika modulieren das Darm-assoziierte Immunsystem



- Erheblicher weiterer Forschungsbedarf zum Zusammenspiel von Probiotika und Immunsystem bei Mensch und Tier

