

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Bedeutung des
Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) für Mikroorganismen
des Magen-Darm-Traktes von BALB/c-LBP ^{+/+} - und
BALB/c-LBP ^{-/-} (Knock-out)-Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Nadine Werth, geb. Haberland
aus Leipzig

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber
Betreuer: Prof. Dr. Monika Krüger

Gutachter: Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie
und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig

Dr. Reinhard Straubinger, Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Christine Schütt, Institut für Immunologie und
Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät,
Universität Greifswald

Tag der Verteidigung: 19. Dezember 2005

Diese Arbeit ist all den bemerkenswerten Menschen gewidmet, welche meinen Lebensweg in den letzten 30 Jahren mitgestaltet haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	<u>Magen-Darm-Flora von Mäusen</u>	2
2.1.1	Begriffsbestimmungen zur gastrointestinalen Mikroflora	2
2.1.2	Zusammensetzung der Normalflora des Magen-Darm-Traktes (MDT)	3
2.1.2.1	Überblick	3
2.1.2.2	Zeitliche Abfolge der Besiedlung	6
2.1.2.3	Anaerobier/Sporenbildner	7
2.1.2.4	<i>Lactobacillus</i> spp.	11
2.1.2.5	<i>Enterobacteriaceae</i>	12
2.2	<u>Bedeutung der MDT-Flora für den Wirt</u>	15
2.3	<u>Abwehrmechanismen im MDT</u>	18
2.3.1	Resistenzen	18
2.3.2	Anatomische, physiologische und chemisch-physikalische Barrieren	19
2.3.2.1	Anatomische Barrieren	19
2.3.2.2	Physiologische Barrieren	23
2.3.2.3	Chemisch-physikalische Barrieren	23
2.3.3	Schleimhautflora	25
2.3.3.1	Indirekter Antagonismus	25
2.3.3.2	Direkter Antagonismus	26
2.3.4	Immunologische Abwehr im MDT	28
2.4	<u>LPS-bindendes Protein (LBP)</u>	34
2.4.1	Charakterisierung des LBP	34
2.4.2	Bedeutung und Funktion des LBP	35
3	Material und Methoden	40
3.1	<u>Tiermaterial</u>	40
3.2	<u>Materialentnahme, Transport und Lagerung</u>	40
3.3	<u>Mikrobiologische Untersuchungen</u>	41

II

3.3.1	Qualitative Voruntersuchung auf <i>E. coli</i>	41
3.3.2	Quantitative Bestimmung der aeroben Keimzahlen	41
3.3.2.1	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ)	41
3.3.2.2	Bestimmung der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl (GNKZ)	42
3.3.3	Quantitative Bestimmung anaerober Keimzahlen	42
3.3.3.1	Bestimmung der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl (GNKZ _{an})	42
3.3.3.2	Bestimmung der Keimzahl auf MRS-Agar	43
3.3.4	Quantitative Bestimmung der Keimzahl an Hefen	43
3.3.5	Quantitative Bestimmung von <i>Clostridium perfringens</i>	43
3.4	<u>Bestimmung der relativen Antikörperspiegel im Serum</u>	44
3.4.1	Material	44
3.4.2	Grundlegende methodische Arbeitsschritte	44
3.4.3	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti-LPS-Rc-Form (<i>E. coli</i> , J5)	45
3.4.4	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti-LPS-Ra-Form (<i>E. coli</i> , EH 100)	45
3.4.5	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti-LPS-S-Form (<i>E. coli</i> , O111:B4)	46
3.4.6	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti-Peptidoglykan (<i>Staph. aureus</i>)	46
3.4.7	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM gegen Extraktantigen von zwei isolierten <i>Bacillus</i> - Stämmen (I und II)	46
3.4.7.1	Herstellung des Extraktantigens	46
3.4.7.2	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus</i> -Stamm I	47
3.4.7.3	Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus</i> -Stamm II	48
3.5	<u>Verfahren der Datenanalyse und Auswertung</u>	48
4	Ergebnisse	49
4.1	<u>Mikrobiologische Untersuchungen</u>	49
4.1.1	Vergleich der Nachweishäufigkeit von <i>E. coli</i> bei der LBP ^{-/-} -Gruppe bzw. der LBP ^{+/+} -Gruppe	49
4.1.2	Keimzahlen nach aerober Inkubation	50
4.1.2.1	Aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ)	50
4.1.2.2	Aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl (GNKZ)	54
4.1.3.	Keimzahl nach anaerober Inkubation	55
4.1.3.1	Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl (GNKZ _{an})	55
4.1.3.2	Gesamtkeimzahl auf MRS-Agar wachsender Keime	57
4.1.4	Keimzahl <i>Clostridium perfringens</i>	59
4.1.5.	Keimzahl Hefen	59

4.2	<u>Antigenspezifische Antikörperspiegel im Serum</u>	60
4.2.1	Relative IgG- und IgM-anti-LPS-Konzentrationen	60
4.2.2	Relative IgG- und IgM-anti-Peptidoglykan-Konzentration	62
4.2.3	Relative IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus-coagulans</i> -Stamm I - Konzentration	62
4.2.4	Relative IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus-coagulans</i> -Stamm II - Konzentration	63
5	Diskussion	65
5.1	<u>Material</u>	65
5.1.1	Tiere	65
5.1.2	Probenmaterial	65
5.2	<u>Methoden</u>	66
5.2.1	Transport und Lagerung	66
5.2.2	Nährböden/Differenzierung	67
5.3	<u>Mikrobiologische Untersuchungen</u>	67
5.3.1	Aerobe Gesamtkeimzahl	67
5.3.2	Aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl	69
5.3.3	Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl	71
5.3.4	Keimzahl auf MRS-Agar	74
5.4	<u>Serologische Untersuchungen</u>	78
5.5	<u>Schlußfolgerung</u>	83
6	Zusammenfassung	86
7	Summary	88
8	Literaturverzeichnis	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Begriffsbestimmungen zur gastrointestinalen Mikroflora (zusammengestellt durch BERG, 1996)	2
Tabelle 2	Übersicht über die bei Mäusen aus dem Magen-Darm-Trakt bzw. aus Fäzes isolierten Bakteriengruppen	5
Tabelle 3	Übersicht zu ermittelten Keimzahlen in Untersuchungen der Magen-Darm-Flora von Mäusen	14
Tabelle 4	Aerobe Gesamtkeimzahl (lg[KBE/g]) von LBP ^{-/-} - und LBP ^{+/+} -Gruppe, ermittelt auf Einfach-Agar (siehe Material und Methoden)	50
Tabelle 5	Aerobe Gesamtkeimzahl (lg[KBE/g]) von LBP ^{-/-} -und LBP ^{+/+} -Gruppe , ermittelt auf Blut-Agar (siehe Material und Methoden)	51
Tabelle 6	<i>Bacillus-coagulans</i> -Stamm II (lg[KBE/g]) von LBP ^{-/-} -und LBP ^{+/+} -Gruppe, ermittelt auf Blut-Agar (siehe Material und Methoden)	52
Tabelle 7	Auf Gassner-Agar und MacConkey-Agar ermittelte aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahlen (Einzeltierdarstellungen) in Darminhaltsproben aus verschiedenen Darmabschnitten in lg KBE/g	55
Tabelle 8	Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl auf Columbia-Blut-Agar (lg KBE/g) im Zäkum (siehe Material und Methoden)	56
Tabelle 9	Gesamtkeimzahl der auf MRS-Agar wachsenden Keime (lg[KBE/g]) von LBP ^{-/-} - und LBP ^{+/+} -Gruppe, ermittelt auf MRS-Agar (siehe Material und Methoden)	57
Tabelle 10	<i>Lactobacillus-fermentum</i> -Keimzahl (orange-farbene Kolonien in lg[KBE/g]) von LBP ^{-/-} - und LBP ^{+/+} -Gruppe (KG), ermittelt auf MRS-Agar (siehe Material und Methoden)	58
Tabelle 11	IgG- und IgM-anti-LPS-Rc-Form (<i>E. coli</i> J5; Sigma) Probenverdünnung = 1/20; Konjugatverdünnung = 1/2000	61
Tabelle 12	IgG- und IgM-anti-LPS-Ra-Form (<i>E. coli</i> EH 100; Sigma) Probenverdünnung = 1/100; Konjugatverdünnung = 1/5000	61
Tabelle 13	IgG- und IgM-anti-LPS-S-Form (<i>E. coli</i> O 111:B 4; Sigma) Probenverdünnung = 1/100; Konjugatverdünnung = 1/5000	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>Bacillus-coagulans</i> -Stamm I, Blut-Agar	52
Abb. 2	<i>Bacillus-coagulans</i> -Stamm II, Blut-Agar	53
Abb. 3	Sporenbildner, Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)	53
Abb. 4	Fusiforme Bakterien, Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)	56
Abb. 5	von einem Makrophagen umschlossenes Bakterium, Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)	56
Abb. 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> , MRS-Agar	59

Grafikverzeichnis

Grafik 1	Relative IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus</i> -Stamm I-Konzentrationen (angegeben als Extinktionswert bei 450nm)	63
Grafik 2	Relative IgG- und IgM-anti- <i>Bacillus</i> -Stamm II-Konzentrationen (angegeben als Extinktionswert bei 450nm)	64

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-presenting-cells (engl.), Antigen präsentierende Zellen
CV	conventionell (engl.), konventionell
GALT	Gut-associated lymphatic tissue (engl.), darm-assoziiertes Lymphgewebe
GF	Germ-free (engl.), keimfrei
ggr.	geringgradig
GIT	gastrointestinal tract (engl.), Magen-Darm-Trakt
HDL	High-density lipids (engl.), Lipide mit hoher Dichte
IBD	Inflammatory bowel disease (engl.), Entzündliche Darmerkrankung
IEL	intraepithelial lymphocytes (engl.), intraepitheliale Lymphozyten
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mCD14	membranständiges Differenzierungscluster 14 (engl. cluster of differentiation)
MDF	Magen-Darm-Flora
MDT	Magen-Darm-Trakt
MMC	migrating motor complex (engl.),
m-RNA	messenger-ribonuclei acid (engl.)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (engl.)
PRR	pattern recognition receptor (engl.)
sCD14	lösliches Differenzierungscluster 14 (engl. soluble cluster of differentiation)
SPF	spezifisch pathogen-frei
TGF	Tumor-Growth-Factor (engl.)
TLR	Toll-like receptor (engl.)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 Einleitung

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass der Magen-Darm-Flora eine multifaktorielle Bedeutung zukommt.

Dabei wird nicht nur der eigentlichen Verdauung Bedeutung zugemessen, sondern auch der Immunabwehr und -stimulation, welche im wesentlichen durch die Magen-Darm-Flora beeinflusst wird.

Die Erforschung der Zusammenhänge, insbesondere die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Wirt sind Gegenstand der Forschungsbemühungen der letzten 20 Jahre.

Der Darm stellt die größte Berührungsfläche des Körpers mit seiner Außenwelt dar. Dementsprechend ausgefeilt sind die unspezifischen und spezifischen Strategien, um ein Überleben des Organismus zu sichern.

Dabei müssen diese physiologischen "täglichen Auseinandersetzungen" nicht unbedingt als negativ bewertet werden. Im Gegenteil, gerade diese "Kleinkriege" bereiten den Organismus auf die eigentlichen lebensbedrohlichen Situationen vor.

Neben mechanischen und physikalischen Abwehrmechanismen, bedient sich der Körper mannigfaltiger Reaktionskaskaden und verschiedenster Proteine, welche den Organismus vor ernsteren Schäden bewahren sollen.

Eines dieser Proteine ist das sogenannte Lipopolysaccharid-bindende-Protein, kurz LBP genannt. Inzwischen ist bekannt, dass dieses Protein bei der Einleitung einer unspezifischen Immunreaktion, insbesondere gegenüber Gram-negativen Bakterien, eine wesentliche Rolle spielt.

Welche Aufgabe jedoch erfüllt das Protein zu Zeitpunkten, in denen keine unmittelbare Gefahr für den Organismus droht und die physiologische Magen-Darm-Flora sich im Gleichgewicht befindet?

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Magen-Darm-Flora von BALB/c-Mäusen, welche physiologischerweise in der Lage sind, LBP zu produzieren und BALB/c-Mäusen, welche aufgrund einer Gendeletion kein LBP produzieren können.

2 Literaturübersicht

2.1 Magen-Darm-Flora von Mäusen

2.1.1 Begriffsbestimmungen zur gastrointestinalen Mikroflora

Die Erforschung der Magen-Darm-Flora (MDF) begann bereits vor mehr als 100 Jahren, wobei im Laufe der Zeit immer wieder neue Fragen aufgeworfen wurden, welche teilweise bis heute ungeklärt geblieben sind.

Mehrere Autoren haben im Zuge ihrer Forschungsarbeiten häufig verwendete Begriffe, welche im Zusammenhang mit der Untersuchung der MDF stehen, näher definiert.

BERG (1996) fasste diese zusammen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Begriffsbestimmungen zur gastrointestinalen Mikroflora (zusammengestellt durch BERG, 1996)

Einheimische Flora (definiert durch DUBOS et al. 1965)	
1. Autochthone Flora	Mikroorganismen, welche während der Evolution des Tieres vorhanden sind und somit in allen Populationen einer bestimmten Tierspezies vorkommen
2. Normalflora	Mikroorganismen, welche sich in allen Mitgliedern einer bestimmten Population einer Tierspezies etabliert haben, aber nicht unbedingt in allen Populationen dieser bestimmten Tierspezies vorhanden sein müssen
3. Echte Pathogene	Mikroorganismen, welche zufällig aufgenommen wurden und somit nicht normalerweise in allen Mitgliedern einer Population einer bestimmten Tierspezies vorkommen
Normalflora (definiert durch SAVAGE 1977)	
1. Autochthone Flora (Einheimische Flora)	ständig vorhandene Mikroorganismen, welche in allen Populationen einer bestimmten Tierspezies vorkommen, mit folgenden Eigenschaften: <ol style="list-style-type: none"> 1. kann unter anaeroben Bedingungen im Gastrointestinaltrakt (GIT) wachsen 2. immer vorhanden im GIT eines normalen ausgewachsenen Tieres 3. kolonisiert spezielle Abschnitte oder Nischen des GIT 4. halten stabile Höchstpopulationsgrößen aufrecht 5. oftmals eng mit der Epithelschicht des GIT assoziiert
2. Allochthone Flora (Transiente Flora)	Mikroorganismen, welche kurzzeitig aufgenommen werden und somit nicht unbedingt in allen Gemeinschaften einer Spezies oder nicht einmal in allen Mitgliedern einer Tiergemeinschaft vorkommen

2.1.2 Zusammensetzung der Normalflora des Magen-Darm-Traktes (MDT)

2.1.2.1 Überblick

Die Forschungen bezüglich der Zusammensetzung der MDF von Mensch und Tier begannen bereits in der Mitte des letzten Jahrhunderts. Zu diesem Zeitpunkt intensivierte man auch die Nutzung der Maus als Versuchstier.

Mitte der 60-iger Jahre wurde festgestellt, dass die Komposition der MDF von Mausstamm zu Mausstamm mehr oder weniger stark variiert (SCHAEDLER und DUBOS 1962; MAEJIMA 1966).

Viele Autoren (SCHAEDLER et al. 1965; MAEJIMA et al. 1967; LEE et al. 1970; DAVIES et al. 1973) gingen dabei davon aus, dass die Zusammensetzung der Mikroflora der Nachkommen wesentlich durch die Zusammensetzung der Mikroflora der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt bestimmt wird bzw. durch Kontamination mit fäkalen Mikroorganismen der Mutter und der unmittelbaren Umgebung zum Zeitpunkt des Absetzens.

ITOH et al. (1983) führten vergleichende Studien der Fäkalflora verschiedener Mausstämme durch. Es fielen Unterschiede in der Zusammensetzung der intestinalen Flora auf, obwohl alle Tiere bzw. die Muttertiere unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden.

Spätere Untersuchungen der gleichen Autoren (ITOH et al. 1985) ergaben eindeutige Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der MDF auch von genetischen Faktoren beeinflusst wird.

Dabei wurden sog. Fosterversuche durchgeführt.

Obwohl unter sterilen Bedingungen per Kaiserschnitt entwickelte Mäuse von Ammen anderer Mausstämme, mit nachgewiesener abweichender MDF, gesäugt und versorgt wurden, konnte bei den Tieren eine ähnliche MDF identifiziert werden, wie sie bei den eigentlichen Elterntieren vorherrscht.

Auch in neueren Studien konnte klar eine genetische Komponente bei der Komposition der gastrointestinalen Mikroflora von Mäusen festgestellt werden (VAAHTOVUO et al. 2001). In der gleichen Studie wurde geäußert, dass das Geschlecht scheinbar keine Rolle bei der Zusammensetzung der MDF spielt.

Da die Maus eines der bedeutendsten Versuchstiere der gegenwärtigen Forschung darstellt, hat sich ein vielfältiges Angebot an Züchtungen und Zuchtbedingungen entwickelt. In Bezug auf die gastrointestinale Mikroflora ist dabei zu beachten, dass die Herkunft der untersuchten Tiere von entscheidender Bedeutung ist. So stellten O'ROURKE et al. (1988) Unterschiede in der Anzahl fakultativer Anaerobier bei spezifisch-pathogenfreien-Mäusen (SPF-Mäusen) unterschiedlicher Züchter in Australien fest. Auch HIRAYAMA et al. (1990) kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei Untersuchungen von BALB/c- Mäusen von drei unterschiedlichen Züchtern in Japan. Enorme Unterschiede mit hoher Signifikanz wurden hier in der Anzahl der *Enterobacteriaceae* festgestellt.

Es muss davon ausgegangen werden, dass nur wenn Kontakt zu Mikroorganismen besteht oder bestanden hat, eine Besiedlung des MDT mit diesen Bakterien stattfinden kann. Somit spielt auch die Zufuhr über die Nahrung eine wesentliche Rolle bei der Zusammensetzung der Flora.

BOUHNİK et al. (1992) registrierten Schwankungen in der Zusammensetzung der MDF aufgrund ständiger Zufuhr von neuen Bakterien über die Nahrung und durch ständige Zufuhr von Energiequellen, welche die Kolonisierung bestimmter Keime fördern (BOUHNİK et al. 1999).

Aufgrund der verschiedenen Entwicklungsphasen im Leben eines Säugetiers ist auch der Einfluss des Alters des Tieres bedeutend für die natürliche Komposition der Flora. Der genaue zeitliche Ablauf der Besiedlung wird im Kapitel 2.1.2.2 ausführlicher beschrieben.

Bei der Untersuchung des Darminhaltes von Mäusen konnten DUBOS et al. (1965) folgende Ergebnisse zur Zusammensetzung der MDF erzielen. Der gesamte MDT ist von Mikroorganismen besiedelt.

Dabei ist die Zusammensetzung der Flora für jeden Teilabschnitt typisch. Einige der Mikroorganismen sind sehr stark mit der Mukosa des Magens bzw. des Darmes verbunden.

SMITH (1965), RAIBAUD (1966) und DRASAR et al. (1970) postulierten, dass bei Mäusen die Zahl der Mikroorganismen vom Magen bis zum Zäkum konstant bei $10^7 - 10^9$ /g Darminhalt liegt. Im Rektum und im Kot liegt die Gesamtkeimzahl bei etwa $10^9 - 10^{10}$ /g Probe.

Obwohl die damaligen Isolationsmöglichkeiten noch eingeschränkt waren, wurde deutlich, dass die MDF zu 99 % aus anaerob lebenden Bakterien besteht (MOORE und HOLDMAN 1974). Diese Ergebnisse aus der Humanmedizin wurden auch in Studien zur MDF von Säugetieren immer wieder erzielt (DRASAR et al. 1969; GORDON und DUBOS 1970; LEE et al. 1970; HARRIS et al. 1976; ITOH und MITSUOKA 1985). Die Zusammensetzung und Eigenschaften der anaerob lebenden Mikroorganismen werden im Kapitel 2.1.2.3 detaillierter beschrieben.

Bei den Untersuchungen konnten nachfolgend genannte Bakteriengruppen aus Darminhaltsproben, gesamten Darmabschnitten und Fäzes isoliert werden.

Tabelle 2: Übersicht über die bei Mäusen aus dem Magen-Darm-Trakt bzw. aus Fäzes isolierten Bakteriengruppen

Gram-positive Mikroorganismen	Gram-negative Mikroorganismen
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Eubacterium</i> spp.	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	
<i>Propionibacterium</i> spp.	
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	
<i>Enterococcus</i> spp.	
<i>Staphylococcus</i> spp.	
<i>Streptococcus</i> spp.	

2.1.2.2 Zeitliche Abfolge der Besiedlung

Die Kolonisierung des MDT durch verschiedene Spezies der Flora erfolgt in definierten Zeiträumen und immer nach streng anatomischen Lokalisationen (SCHAEDLER et al. 1965; DUBOS et al. 1965; SAVAGE et al. 1968; SAVAGE und DUBOS 1967,1968).

Dabei ist das Prinzip des Ablaufs der Besiedlung und Etablierung der MDF bei Maus und Mensch ähnlich, aber jede Säugetierspezies hat dabei ihren eigenen Zeitplan (SAVAGE 1977).

Bevor zum Beispiel Anaerobier den MDT besiedeln können, muss das Oxidations-Reduktions-Potential durch Aerobier herabgesetzt werden, so dass ideale Lebensbedingungen für die Anaerobier geschaffen werden.

Deutlich wurde dies bei Rekolonisationsversuchen mit keimfreien (engl. germ-free) Mäusen (GF-Mäusen). Bedeutende Anaerobiergruppen waren nicht in der Lage, bestimmte Abschnitte des Darmes zu kolonisieren, da das Redox-Potential des Darmes nicht durch die Stoffwechselfvorgänge der Aerobier zuvor abgesenkt worden war (TANNOCK und SAVAGE 1974).

Um den zeitlichen Ablauf der Besiedlung des MDT nachvollziehen zu können, führten LEE et al. (1970) einen Versuch mit SPF-Mäusen durch. Dabei wurde die Besiedlung des MDT vom Tag der Geburt an über ausgewählte Bakteriengruppen verfolgt. Die Tiere wurden am 21. Tag von der Mutter abgesetzt und am 32. Tag endete das Experiment.

Eine der untersuchten Bakteriengruppen war der Genus *Lactobacillus*.

Ab dem 2. Tag steigt die Anzahl der *Lactobacillus* spp. auf bis zu 10^9 KbE/g Zäkum-Homogenat, um auf diesem Niveau bis zum Ende des Experiments zu bleiben.

Die *Enterococcus* spp. steigen ab dem 2. Tag bis Tag 10 auf 10^8 KbE/g Zäkum-Homogenat an, um dann bis zum Ende des Experiments auf 10^4 KbE/g Zäkum-Homogenat zu fallen.

Coliforme Keime steigen ab dem 10. Tag innerhalb von 6 Tagen auf Keimzahlen bis zu 10^8 KbE/g Zäkum-Homogenat an, um bis zum Ende des Experiments wieder auf Werte um 10^5 KbE/g Zäkum-Homogenat herabzusinken.

Die *Bacteroides* spp. vermehren sich erst ab dem 14. Tag, wobei die Anzahl schnell auf 10^{10} KbE/g Zäkum-Homogenat zunimmt. Dieses Niveau wird bis zum Ende des Experiments gehalten.

Ähnlich verhält es sich mit den später als fusiforme Bakterien identifizierten Mikroorganismen. Auch die Anzahl dieser Mikroorganismen steigt erst ab dem 14. Tag an, um auf sehr hohem Keimzahlniveau bis zum Ende zu verbleiben.

Resultat dieser Untersuchungen ist die Tatsache, dass Anaerobier die dominante Bakteriengruppe beim adulten Tier darstellen. Dabei wird deutlich, dass die Populationen von Coliformen und Enterokokken zu dem Zeitpunkt rapide abfallen, wenn die Anaerobier ihr höchstes Niveau erreichen.

2.1.2.3 Anaerobier / Sporenbildner

Die MDF von Mäusen beinhaltet eine Vielzahl von Mikroorganismen, wobei sich der größte Teil, ca. 99 %, an anaerobe Lebensbedingungen angepasst hat. Es wird zwischen obligat bzw. strikt anaerob und den fakultativ anaerob lebenden Bakterien unterschieden. Teile der fakultativ anaeroben Flora werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben (siehe 2.1.2.4 - 5).

Die Bedeutung der strikt anaerob lebenden Mikroorganismen wurde in vivo unter anderem nicht nur bei den Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Besiedlung deutlich (LEE 1970), sondern auch bei zahlreichen Rekolonisierungsversuchen von GF-Mäusen (TANNOCK und SAVAGE 1974).

Mehrere Autoren gehen von ca. 10^{10} bis 10^{11} anaerob lebenden Organismen /g Darminhalt aus (MOORE et al. 1969; SAVAGE et al. 1971). In anderen Untersuchungen konnten, $\lg 9,3 \pm 0,3$ /g Fäzes (MARCOTTE und LAVOIE 1996) und $\lg 7,7 \pm 0,3$ /g Zäkumwand (MARCOTTE und LAVOIE 1996), $\lg 9,7 \pm 0,7$ /g Fäzes (KLEEBEN und JACOBASCH 2002) isoliert werden.

HARRIS et al. (1976) zählten $4,4 \times 10^{10}$ ($\lg 10,6$) Organismen/g Koloninhalt in nach Gram gefärbten mikroskopischen Präparaten, konnten aber nur $3,2 \times 10^{10}$ ($\lg 10,5$) anaerob lebende Organismen/g Koloninhalt ex vivo anzüchten.

Dies entspricht ca. 73 % der gezählten Gesamtkeimzahl aus der mikroskopischen Untersuchung.

Die Unterschiede in den ermittelten Keimzahlen ließen sich einerseits durch die Verwendung verschiedener Ausgangsmaterialien (Darmwand, Darminhalt und Fäzes) erklären. So weisen HARRIS et al. (1976) ausdrücklich daraufhin, dass die von ihnen ermittelten Werte sich nur auf Darminhaltsproben beziehen und Mikroorganismen, welche mit der Mukusschicht bzw. den darunterliegenden Epithelschichten assoziiert sind, nicht berücksichtigt werden.

Andererseits wurden die Isolierungsraten sehr stark durch die Empfindlichkeit dieser Mikroorganismen gegenüber Luftsauerstoff beeinflusst.

In den Anfängen der Anaerobierforschung wurde die Hungate-Role-Methode zur Isolation verwendet (HUNGATE 1950). Aufgrund der nachweisbaren Unterschiede zwischen mikroskopischen Präparaten und den niedrigen Isolationsraten in vitro wurde deutlich, dass ein großer Teil der Mikroorganismen die Kultivierungsvorgänge in dieser Form jedoch nicht überlebte.

Die oben genannte Methode wurde deshalb immer wieder optimiert und weiterentwickelt, um die Isolationsraten zu steigern (MOORE 1966; HOLDEMAN et al. 1977).

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dann ein Verfahren entwickelt, bei dem beimpfte Agarplatten in sogenannte Anaerobiertöpfe zusammen mit luftsauerstoffreduzierenden Stoffgemischen eingebracht wurden (SPEARS und FRETER 1967). Durch die Anwendung dieser Methode stieg der Anteil der kultivierbaren, strikt anaerob lebenden Mikroorganismen stark an. Dieses zuletzt genannte Verfahren wurde dann in späteren Arbeiten als Methode der Wahl angesehen (ITOH et al. 1983, 1983a; ROSKOWSKI et al. 1988).

Andere Autoren (DRASAR 1967; LEE 1968, ARANKI et al. 1969) benutzten bereits in den Anfängen der Anaerobierforschung eine sog. Glove Box. In der Glove Box wird ein anerobes Milieu geschaffen, indem die sauerstoffhaltige Luft mit Hilfe einer Pumpe entfernt wird und durch ein Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch ersetzt wird.

Der Zugang zur Box wird über enganliegende Armüberzüge aus Gummi gewährleistet. Durch die Evisceration der Maus innerhalb der Glove-Box konnte der Kontakt der MDF mit Luftsauerstoff so gut wie eliminiert werden. Die In-vitro-Bedingungen wurden somit immer mehr den In-vivo-Bedingungen angepaßt. Dass die Benutzung der Glove Box vorteilhaft für die Isolierung strikter Anaerobier ist, wird durch Arbeiten mehrerer Autoren deutlich (LEE et al. 1968; GORDON und DUBOS 1970; KOOPMAN und KENNIS 1977,1979).

Heute wird die Glove Box neben der Anzuchtung in Anaerobiertöpfen zur Routinediagnostik von pathogenen Anaerobiern in den meisten labordiagnostisch tätigen Instituten benutzt.

Zu den am häufigsten aus dem MDT der Maus isolierten anaerob lebenden Mikroorganismen gehören Bakterien der Genera *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* und *Eubacterium* (GORDON und DUBOS 1970; LEE et al. 1968,1970).

Eubacterium spp. und *Bifidobacterium* spp. gehören wie *Lactobacillus* spp. zu den Gram-positiven Mikroorganismen. Diesen in großer Zahl im MDT lebenden Mikroorganismen wurde im Zuge der Probiotikaforschung in den letzten 20 Jahren erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet.

Der Genus *Lactobacillus* wird im Kapitel 2.1.2.4 näher erläutert.

In den oben erwähnten, als Kontrolle mitgeführten mikroskopischen Präparaten, waren häufig Bakterien zu erkennen, welche spitz zulaufende Enden besaßen, die sogenannten „tapered rods“. Die Anzuchtung dieser Mikroorganismen wurde mit Optimierung der Kultivierungsbedingungen wesentlich erfolgreicher.

Sie sind eng mit dem Mukus und der Epithelschicht des MDT assoziiert (SAVAGE et al. 1968; SAVAGE und DUBOS 1968; GORDON und DUBOS 1970). GORDON und DUBOS (1970) widmeten sich der Untersuchung dieser Mikroorganismen.

In weiterführenden Untersuchungen konnte unterschieden werden zwischen „tapered rods“ ohne und mit Sporenbildung (sog. Sporenbildner) und bei den Bakterien ohne Sporenbildung zwischen spindelförmigen Mikroorganismen (*Fusobacterium* spp.) und anderen Erscheinungsformen (*Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp.). Die „tapered rods“ ohne Sporenbildung zeigen sowohl Gram-positives als auch Gram-negatives Verhalten in der Färbung.

Fusobacterium spp. und *Bacteroides* spp., die Gram-negativen Vertreter der „tapered rods“, gehören nicht nur zur Normalflora, sondern haben auch Bedeutung als Krankheitserreger bei fast allen Säugetierspezies (HIRSH et al. 1979; BERG et al. 1979; JANG und HIRSH 1994; EVEN et al. 1998).

In neuerer Zeit wurden aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselleistungen einige der Mikroorganismen aus dem Genus *Bacteroides* ausgegliedert und in eigenständige Genera eingeordnet. Dazu gehören z. B. *Prevotella* spp. und *Porphyromonas* spp. (SHAH und COLLINS 1990).

Die wichtigsten Vertreter der aus dem MDT isolierten Sporenbildner werden den Genera *Clostridium* (strikt anaerob) und *Bacillus* (fakultativ anaerob) zugeordnet. GORDON und DUBOS (1970) konnten sporenbildende Bakterien in der Größenordnung von 10^7 - 10^8 /g Zäkumhomogenat isolieren und gehen davon aus, dass Sporenbildner im MDT von Mäusen zur Normalflora gehören.

Auch Vertreter dieser Genera zeigen pathogene Wirkung in Säugetieren (BERG et al. 1979; ROWAN et al. 2003) und einige sind bedeutende Lebensmittelvergifter (FOSTER 1978; MCKILLIP 2000). Mitglieder des Genus *Bacillus* sind auch als Probiotika im Gespräch (NICHOLSON 2002).

Bei der Isolation von *Clostridium* spp. aus dem MDT von Mäusen wurden sehr gegensätzliche Ergebnisse erzielt. In den Untersuchungen von MARCOTTE und LAVOIE (1996) und KLEEßEN und JACOBASCH (2001) konnten nur geringe Mengen Clostridien isoliert werden. HARRIS et al. (1976) fanden gar keine Clostridien. ITOH et al. (1983) konnten dagegen sehr große Mengen *Clostridium* spp. aus Fäzes verschiedener Mausstämme kultivieren (Ergebnisse siehe Tabelle 3).

2.1.2.4 *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. können im gesamten MDT der Maus nachgewiesen werden.

Diese Bakterienspezies wurden bei den meisten Untersuchungen in hoher Zahl aus Mausfäzes, unabhängig vom Mausstamm und den Haltungsbedingungen, isoliert (SCHAEDLER und DUBOS 1962; MAEJIMA et al. 1966,1968; ITOH et al. 1983).

Besonders eng sind sie mit der Magenwand von Mäusen assoziiert (DUBOS et al. 1965; MAEJIMA et al. 1968; SAVAGE et al. 1968; SAVAGE und BLUMERSHINE 1974). Neuere Studien von VAN DER WAAIJ et al. (2003) mit Proben aus dem Kolon und Ileum vom Menschen deuten darauf hin, dass die Normalflora, zu welcher auch die Laktobazillen gehören, nicht direkt mit der Wand assoziiert vorliegen, sondern eher im Lumen zu finden sind.

Die Gesamtzahl der Laktobazillen, welche im Magen und Fäzes von Mäusen nachgewiesen wurden, ist von der Futterzusammensetzung (DUBOS und SCHAEDLER 1962; TANNOCK und SAVAGE 1974) und vom Umweltstress abhängig (TANNOCK und SAVAGE 1974). Desweiteren spielen die Aufzuchtbedingungen bei der Besiedlung mit Laktobazillen eine wesentliche Rolle (SCHAEDLER und DUBOS 1962).

Bei Vergleichsuntersuchungen zwischen SPF-Mausstämmen und konventionell (engl. conventionell) gehaltenen Mausstämmen (CV) wurde erkannt, dass bei den CV-Mäusen eine größere Varianz in Subspezies und Biovaren der Laktobazillen vorliegen. Dabei konnten extreme Unterschiede zwischen den Mausstämmen festgestellt werden.

Einige Biovare konnten jedoch bei allen Stämmen der CV-Mäuse isoliert werden. Dabei spielten der Mausstamm, das Alter oder unterschiedliche Haltungsbedingungen keine Rolle (ITOH et al. 1983a).

In diesen Untersuchungen konnten als Spezies *L. acidophilus*, *L. murinus*, *L. intestinalis* und *L. fermentum* mit den jeweils untergeordneten Biovaren identifiziert werden.

Auch in neueren Studien konnten die o.g. *Lactobacillus*-Stämme isoliert werden. Zusätzlich fanden MARCOTTE und LAVOIE (1996) *L. delbrueckii* in Fäzes von Mäusen.

2.1.2.5 *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* beinhaltet gerade stäbchenförmige Gram-negative, fakultativ anaerob lebende Bakterien, welche teilweise zur Normalflora des MDT gehören, jedoch auch als Krankheitserreger eine Rolle spielen.

Ein wesentlicher Virulenzfaktor der Gram-negativen Bakterien ist das sogenannte Endotoxin. Das Endotoxin ist als Lipopolysaccharid integraler Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien.

Obwohl die Struktur des Endotoxins insgesamt variiert, gilt das Grundgerüst, der Lipid A-Anteil, als wesentlicher Reaktionspartner des im Kapitel 2.4 erläuterten Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP).

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass *Enterobacteriaceae* nur ungefähr 0,1 % der Flora im MDT von Mäusen ausmachen. Dementsprechend niedrig sind die bei verschiedenen Experimenten ermittelten Keimzahlen (siehe Tabelle 3).

Mehrere Autoren konnten extreme Unterschiede in der Zahl der *Enterobacteriaceae* zwischen verschiedenen Züchtern feststellen (DUBOS et al. 1965; HIRAYAMA et al. 1990). DUBOS et al. (1965) unterschieden dabei zwischen *E. coli* und Coliformen. Von einem der untersuchten Stämme konnten gar keine *E. coli* isoliert werden. Bei anderen konnten Keimzahlen von bis zu 10^8 KbE/g Fäzes ermittelt werden. In Untersuchungen von HIRAYAMA et al. (1990) konnten Unterschiede von bis zu einer Zehnerpotenz ermittelt werden.

ITOH et al. (1983) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass die Zahl der *Enterobacteriaceae* in SPF-Mäusen höher als in CV-Mäusen liegt.

Die ermittelte Gesamtkeimzahl korrelierte mit der Zahl der *Enterobacteriaceae* umgekehrt proportional.

Die Zahl der *Enterobacteriaceae* bei Mäusen scheint auch wesentlich von der Anzahl der strikten Anaerobier abzuhängen. ROSZKOWSKI et al. (1988) stellten einen Anstieg der *E. coli* bei einem Abfall der Zahl strikter Anaerobier nach Behandlung der Mäuse mit Mezlocillin fest. Die Anaerobierzahl stabilisierte sich nach Beendigung der Behandlung wieder, jedoch leicht verzögert.

DUBOS et al. (1965) untersuchten die Verteilung der *Enterobacteriaceae* im MDT von Mäusen. Dabei liessen sich aus dem Magen und dem Jejunum keine Keime dieser Familie isolieren. Nur im Kolon konnten Mikroorganismen dieser Gruppe gefunden werden. Über Fütterungsversuche wurde die Unabhängigkeit dieser Ergebnisse von der Zusammensetzung der Diät bestätigt.

Tabelle 3: Übersicht zu ermittelten Keimzahlen in Untersuchungen der Magen-Darm-Flora von Mäusen

Autor	Fäzes	Darm homogenisiert	Darminhalt	Gesamt-aerobier	Gesamt-anaerobier	<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Clostridien gesamt	CV	SPF	BALB/c
LEE et al. (1968) ¹	/	x	/	n.u.	n.u.	10	9	4	n.u.	9	n.u.	n.u.	/	/	/
MARCOTTE und LAVOIE (1996) ²	/	x	/	n.u.	7,5	7,0	n.u.	n.u.	6,4	4,7	3,3	4,8	/	x	/
HARRIS et al. (1976) ³	/	/	x	n.u.	10,5	9 - 11	9 - 11	n.u.	9 - 11	9	n.u.	n.i.	x	/	/
HIRAYAMA et al. (1990) ⁴	/	/	x	n.u.	n.u.	10,1 / 9,5 / 9,2	n.u.	5,6 / 4,4 / 4,7	n.i. / 7,8 / n.i.	9,1 / 8,6 / 8,8	n.i.	n.u.	/	x	x
ITOH et al. (1983) ⁵	x	/	/	n.u.	n.u.	10,4	9,9	3,3	8,5	9,3	8	9,0	x	/	x
ITOH et al. (1983) ⁵	x	/	/	n.u.	n.u.	9,7	9,7	5,9	8,7	8,8	7,2	8,1	/	x	x
ROSZKOWSKI et al. (1988) ⁵	x	/	/	6,9	9,6	8,6	n.u.	6,4	9	8,3	9,2	8,3	x	/	x
TERAGUCHI et al. (1995) ⁶	x	/	/	n.u.	n.u.	9,4	n.u.	6,1	n.u.	9,4	7,6	n.u.	/	x	x
MARCOTTE und LAVOIE (1996) ⁵	x	/	/	n.u.	9,3	8,6	n.u.	n.u.	8,2	5,5	8,9	1,5	/	x	/
FUKUSHIMA et al. (1999) ⁵	x	/	/	n.u.	n.u.	8,9	n.u.	7,3	n.u.	9,8	<3	n.u.	/	x	x
KLEEBEN und JACOBASCH (2002) ⁵	x	/	/	8,6	9,7	8,2		7,5	7,5	7,9	9,3	<6,3	x	/	x

¹ Angaben in log₁₀ Bakterien/g Zäkumhomogenat; ² Angaben in log₁₀ Bakterien/g Zäkumwandhomogenat; ³ Angaben in log₁₀ Bakterien/g Koloninhalt; ⁴ Angaben in log₁₀ Bakterien/g Zäkuminhalt; ⁵ Angaben in log₁₀ Bakterien/g Fäzes; ⁶ Angaben in log₁₀ Kbe/g Fäzes; n.u. = nicht untersucht; n.i. = nicht isoliert; CV= conventionell; SPF= Spezifisch Pathogenfrei

2.2 Bedeutung der Magen-Darm-Flora für den Wirt

In vergleichenden Untersuchungen der Anatomie, der Physiologie und der Immunologie von GF-Mäusen und CV-Mäusen konnten mehrere wesentliche Unterschiede festgestellt werden.

Die GF- Mäuse zeigten eine reduzierte Herz- und Lebergröße und ein reduziertes Blutvolumen (PLEASANTS 1968; WOSTMAN 1968).

Das Gewicht des Darmes war geringer, jedoch das Volumen, z. B. des Zäkums, war größer (PLEASANTS 1968; WOSTMAN 1968; THOMPSON und TREXLER 1971).

Im Gegensatz zu den CV-Mäusen hatten GF-Mäuse eine dünnere Mucosa (GORDON und BRUCKNER-KARDOSS 1961; ABRAMS et al. 1963) und eine dünnere Lamina propria im gesamten MDT (GORDON und BRUCKNER-KARDOSS 1961; ABRAMS et al. 1963; PLEASANTS 1968; WOSTMAN 1968).

Aus dem Darm von GF-Mäusen konnte wesentlich mehr extrahierbares Protein isoliert werden (WHITT und SAVAGE 1980,1981).

TENNANT et al. (1971), KAWAI und MOROTOMI (1978), WHITT und SAVAGE (1981) stellten außerdem eine durch die Normalflora veränderte Aktivität von einigen Enzymen, z. B. ALKP (Alkalische Phosphatase), Disaccharidasen und α -Glucosidasen, im MDT fest. So war die Enzym-Aktivität im MDT von GF-Mäusen wesentlich höher als bei CV-Mäusen.

Die von der Normalflora wesentlich beeinflusste Modifizierung der Gallensäuren konnte in GF-Mäusen nicht stattfinden und dadurch war die Wirkung der Gallensäuren bei der Fettverdauung herabgesetzt (DRASAR und HILL 1974).

Bei Absorptionsversuchen stellten TENNANT et al. (1971) eine erhöhte Absorptionsrate von Kalzium, Magnesium, Glucose und verschiedenen Vitaminen im MDT von GF-Mäusen fest.

Es wurde jedoch auch schon sehr früh erkannt, dass die intestinale Produktion von Folat, Pantothenat, Riboflavin, Biotin und Vitamin K durch Bakterien des MDT in GF-Mäusen fehlt und somit diese wichtigen Vitamine extern zugeführt werden müssen (MICKELSEN 1956; ROSEBURY 1962).

Die Anwesenheit der intestinalen Mikroflora stimuliert die Peristaltik im MDT (DRASAR und HILL 1974). Dadurch wird die Kolonisierung des Darmes mit potentiell pathogenen Keimen wesentlich beeinflusst (FRETER 1974a). Bei GF-Mäusen ist die Stimulation der Peristaltik aufgrund der fehlenden Normalflora herabgesetzt. Die Ansiedlung potenziell pathogener Keime wird möglicherweise dadurch begünstigt.

Die in der letzten Dekade durchgeführten gnotobiotischen Studien haben klar gemacht, dass die intestinale Flora äußerst wichtig für die Entwicklung des Immunsystems des MDT ist. Die intestinale Flora stellt für den Wirt eine Belastung dar, welche das Immunsystem aktiviert.

Zum Einen ist die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten, Plasmazellen und Peyerschen Platten in GF-Mäusen niedriger (FRETER 1974).

Assoziiert man nachträglich GF-Mäuse mit fäkaler Flora von CV-Mäusen steigt die Anzahl der intestinalen epithelialen Lymphozyten (IEL) signifikant an (UMESAKI et al. 1993) und die IgA-Produktion wird gesteigert (MOREAU et al. 1982).

Desweiteren stimuliert die Präsenz der intestinalen Flora die Neutrophilenaktivität (OHKUBO et al. 1990) und die Makrophagenaktivität (MITSUYAMA et al. 1986; STARLIN und BALISH 1981) im MDT und im Blut.

Gerade im Mausmodell konnte bewiesen werden, dass die intestinale Flora wesentlich die Entwicklung des Darm-assoziierten Immunsystems bestimmt (UMESAKI und SETOYAMA 2000).

Die normale MDF beeinflusst nicht nur das Immunsystem des MDT, sondern bestimmt auch teilweise die Aktivität des Immunsystems des gesamten Organismus. BEALMEAR (1981) und BERG (1983) stellten eine verzögerte Immunantwort bei Stimulierung mit Antigenen, z. B. bei einer Vakzinierung, von GF-Mäusen fest.

Bei der Stimulation des systemischen Immunsystems scheinen Sporenbildner, welche eine Chloroformbehandlung überstehen, eine herausragende Rolle zu spielen. So konnten sporenbildende Bakterien aus Mausfäzes bei ehemaligen GF-Mäusen eine immunologische Reaktion hervorrufen (OKADA et al. 1994). Diese immunologische Reaktion konnte nicht bei der experimentellen Besiedlung von Ex-GF-Mäusen mit Flora aus Menschen- oder Rattenfäzes ausgelöst werden. Möglicherweise kann die Stimulation nur durch artspezifische bzw. rassespezifische Normalflora erfolgen (OKADA et al. 1994).

VERDU et al. (2000) führten einen Versuch durch, bei dem geklärt werden sollte, ob durch die Verabreichung von Antigen, welches von der Normalflora des MDT stammt, GF-Mäuse vor einer künstlich induzierten Kolitis geschützt werden können. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Spiegel der entscheidenden Entzündungsparameter im Blut herabgesetzt waren und die klinischen Erscheinungen weniger stark auftraten. Die Antigenmischung musste jedoch Antigenstrukturen von im MDT lebenden Anaerobiern enthalten.

2.3 Abwehrmechanismen im Magen-Darm-Trakt

2.3.1 Resistenzen

Als Resistenz wird die unspezifische, genetisch fixierte Unempfindlichkeit von Organismen gegenüber Infektionen und Toxinen bezeichnet. Dabei wird diese Unempfindlichkeit auf die Nachkommen vererbt.

Schon in sehr frühen Studien ergaben sich Hinweise, dass die natürliche Zusammensetzung der intestinalen Flora von Mausstamm zu Mausstamm variiert (SCHAEDLER und DUBOS 1962; MAEJIMA 1966).

ITOH et al. (1983) konnten bei vergleichenden Studien der Fäkalflora verschiedener Mausstämmen einige Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung feststellen, jedoch konnte dabei keine Resistenz gegenüber bestimmten Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Erst spätere Untersuchungen der gleichen Autoren (ITOH et al. 1985) ergaben eindeutige Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora von genetisch fixierten Faktoren beeinflusst wird. Die Einzelheiten des Versuches wurden bereits unter 2.1.2 näher erläutert.

Neben der genetisch fixierten Resistenz existiert eine besondere Form der Unempfindlichkeit, die sog. Altersresistenz.

Durch Verlust spezifischer Rezeptoren, hormoneller Dysbalancen und veränderter Stoffwechselfvorgänge reagieren Zellen und Gewebe im Laufe eines Lebens gegenüber bestimmten Infektionserregern und Toxinen in veränderter Form. Dies beeinflusst maßgeblich die Möglichkeiten der Anheftung, Vermehrung und Ausbreitung von Infektionserregern.

2.3.2 Anatomische, physiologische und chemisch-physikalische Barrieren

2.3.2.1 Anatomische Barrieren

Einen wichtigen Bestandteil des Abwehrmechanismus im Magen-Darm-Trakt stellen die anatomischen Strukturen und physiologischen Vorgänge dar, welche verhindern, dass inokulierte bzw. stationär lebende Mikroorganismen den gesamten Organismus besiedeln können.

Zu den anatomischen Barrieren gehören die drei Schichten der Schleimhaut (Mukusschicht, Mukosa und Lamina propria) und die sich daraus ergebende Integrität des Epithelsaums. Außerdem ist die Schleimhaut in der Lage, auf molekularer Ebene auf exogene Reize zu reagieren (siehe auch 2.3.4).

Die Mukosa des MDT formt eine bedeutende Kontaktstelle zwischen der systemischen Zirkulation und der auf den Organismus einwirkenden Umwelt.

Zusätzlich zu seiner digestiven und absorptiven Kapazität bildet diese sehr große Oberfläche eine strukturelle und immunologische Barriere. Sie schützt den Organismus vor dem Eindringen infektiöser Pathogene und Toxine.

Die gastrointestinale Mukosa ist eine einschichtige Epithelschicht und enthält verschiedene Zelltypen. Dazu gehören Enterozyten, enteroendokrine Zellen, Paneth-Zellen, intraepitheliale Lymphozyten, M-Zellen und Becherzellen.

Diese Epithelzellschicht wird von Mukus bedeckt, welcher einen schützenden Belag für die Zellen bildet. Durch ihn wird ein direkter Kontakt zwischen den Zellen und der Umwelt verhindert (GIBBONS 1981).

Unter der Mukosa befindet sich die Lamina propria, welche zahlreiche immunologisch wirksame Zellen wie z. B. Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen enthält. Diese Zellen sind äußerst wichtig für die immunologische Abwehr im Magen-Darm-Trakt und im gesamten Körper.

Der größte Anteil der Mukosa wird durch die Enterozyten gebildet, welche durch sog. Tight Junctions im apikalen Bereich der Zellen miteinander verbunden sind (POWELL 1981; GUMBINER 1987). Lateral werden die Zellen durch zahlreiche Desmosomen verknüpft. Dadurch entsteht eine selektive Barriere, welche die Integrität des Epithelsaums im Wesentlichen mitbestimmt (BOYER und THIERY 1989).

Einen weiteren Bestandteil der Mukosa stellen die enteroendokrinen Zellen dar. Sie produzieren u.a. Neuropeptide, welche in Richtung der Lamina propria sezerniert werden. Diese Substanzen fördern nicht nur den Verdauungsprozess, sondern sind auch ein wesentlicher Bestandteil der Barrierefunktion der Mukosa, da sie die Produktion von Muzinen und IgA stimulieren können (FREIER et al. 1987; STANISZ et al. 1986) bzw. das Darm-assoziierte Lymphgewebe (engl. Gut-associated lymphoid tissue, GALT) in ihrer Funktion anregen können (LI et al. 1995).

Die bereits erwähnten Paneth-Zellen sind in den Krypten des Jejunum lokalisiert. Sie setzen verschiedene Faktoren, wie Lysozym, Defensine und Phospholipase A in Granula frei. Bei In-vitro-Studien konnten für diese Bestandteile antimikrobielle Aktivitäten festgestellt werden (PEETERS und VANTRAPPEN 1975; HARWIG et al. 1995a; PORTER et al. 1997). RODNING et al. (1976) äußerten die Möglichkeit, dass diese Zellen auch phagozytische Funktionen erfüllen und Antikörper-markierte Bakterien umschließen können.

Auf ca. 100 Enterozyten kommen ca. 30 intraepitheliale Lymphozyten (IEL), welche in der Mukosa des Darmes lokalisiert sind (FERGUSON 1977).

Bis jetzt ist die Funktion der IEL noch nicht erforscht, es wird jedoch vermutet, dass sie direkt zytotoxisch wirken können, Zytokine freisetzen, eine immunologische Toleranz gegenüber intraluminalen Proteinen miterzeugen können und die Permeabilität der Mukosa beeinflussen (DEWITT und KUDSK 1999).

Die spezielle Funktion der in der Mukosa lokalisierten sog. M-Zellen wird unter 2.3.4 beschrieben.

Der auf der Mukosa befindliche Mukus wird von den Becherzellen (Syn. Gobletzellen) produziert. Diese Zellen sezernieren von Geburt an eine im Dünndarm ca. 30-50 µm, im Rektum bis zu 285 µm dicke (MATSUO et al. 1997) Schicht, welche schützt, schmiert und ein Gleit- bzw. Transportmedium für Darminhalt sowie aus der Schleimhaut sezernierter Stoffe darstellt (FORSTNER et al. 1995).

Der Dünndarm ist von einer wesentlich dünneren Mukusschicht bedeckt. Im Bereich der Peyerschen Platten ist der Mukus kaum vorhanden, um diesem immunologischen Reaktionsareal einen direkten Kontakt mit antigenwirksamen Substanzen zu ermöglichen (FORSTNER et al. 1995). Die viskoelastischen und polymerähnlichen Eigenschaften des Mukus werden im Wesentlichen durch die Hauptkomponente des Gels, die Glycoproteine - Muzine, mitbestimmt. Dabei wird zwischen neutralen und sauren Subtypen, sowie zwischen mit Schwefelgruppen assoziierten Muzinen (Sulfomuzine) und nicht mit Schwefelgruppen assoziierten Muzinen (Sialomuzine) unterschieden (SHEAHAN und JERVIS 1976). Der Anteil der jeweiligen Untergruppen an der Gesamtzusammensetzung bestimmt im wesentlichen die Barrierefunktion des Mukus gegenüber heimischer Flora und pathogenen Mikroorganismen.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Mukusschicht mechanisch verursachte Abrasionen und die Anheftung von Bakterien an die Epithelzellen verhindern soll (ROZEE et al. 1982; KATAYAMA et al. 1997).

Die Schleimhaut ist nicht nur ein anatomisch-physikalisches Hindernis gegen die bakterielle Invasion des Wirtes, sondern stellt auch ein reaktives Kompartiment dar, welches die Kapazität besitzt, Veränderungen in der Umwelt zu registrieren und darauf zu reagieren (MEDZHITOV und KOPP 1999).

Um dies realisieren zu können, gibt es auf molekularer Ebene ein Erkennungssystem für Bakterien. Dieses Erkennungssystem basiert entweder auf einem weitgefächerten Repertoire an spezifischen Molekülen, z. B. Immunglobulinen und T-Zellrezeptoren, und einigen, weniger spezifischen Molekülen, z. B. germ-line-encoded Glykoproteine, welche sich ähnelnde Bakterienstrukturen erkennen. Diese Glykoproteine sind auf Makrophagen lokalisiert, welche sich in der Lamina propria unterhalb der Epithelschicht im MDT befinden.

Die sich ähnelnden Bakterienstrukturen sind typisch für verschiedene Genera und Spezies. Aufgründessen werden diese weniger spezifischen Moleküle als „pattern recognition receptors“ (PRR) bezeichnet (MEDZHITOV und KOPP 1999).

Beispiele für PRR sind LBP (KIM et al. 2000), CD14 und die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR). Inzwischen konnte bewiesen werden, dass CD14 mit TLR4 reagiert, um Signale zu eukaryotischen Zellen zu transferieren (ZHANG und GHOSH 2001).

Verschiedene Toll-like-Rezeptoren reagieren mit verschiedenen Bakterienkomponenten, so z. B. erkennt TLR4 Bestandteile von Gram-negativen Bakterien (Lipopolysaccharid, LPS). TLR2 hingegen erkennt Bestandteile Gram-positiver Bakterien, wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykan (ZHANG und GHOSH 2001).

Hinweise auf ein Vorhandensein dieser speziellen Mechanismen konnten schon HALLER et al. (2000) bei In-vitro-Versuchen finden, wobei intestinale Epithelzellen und Leukozyten ko-kultiviert wurden. Dabei stellten sie fest, dass die Epithelzellen pathogene und normale Flora erkennen können und dementsprechend in der Lage sind, darauf zu reagieren. Es konnten zwei Reaktionswege ausgemacht werden. Einige Gram-negative Bakterien und Gram-positive Laktobazillen lösen eine Entzündungsreaktion aus, welche durch Makrophagen in der Lamina propria in ihrem Ausmaß begrenzt wird. Andere Gram-positive Bakterien aktivieren beim Zusammentreffen mit den Epithelzellen die Genexpression für das regulierende Zytokin, Transforming-Growth-Faktor β (TGF- β). Dadurch kommt es nicht zu einer Entzündungsreaktion, sondern zur Induktion einer Toleranz.

Die Zusammenhänge zu den Funktionen dieser eben beschriebenen Strukturen werden im Abschnitt 2.3.4 weiter beschrieben.

2.3.2.2 Physiologische Barrieren

Als wichtigste physiologische Barriere ist der Interdigestive Motor Complex zu nennen.

Der auch als „intestinal housekeeper“ bezeichnete Interdigestive bzw. Migrating Motor Complex (MMC) sorgt über die Kontraktion des Darmes für den Weitertransport des Chymus in Richtung Dickdarm bzw. Rektum. Dadurch wird die Proliferation von Mikroorganismen im Dünndarm limitiert (SZURZEWSKI 1969; CODE 1987). Der Aufenthalt von Bakterien im Dünndarm, die den Einfluss der Magensäure bei der Passage durch den Magen überlebt haben, wird somit verkürzt und eine Überwucherung mit passagieren Bakterien verhindert (SZURZEWSKI 1969). Außerdem wird für eine normale Verbreitung der endogenen Flora gesorgt und die retrograde Migration von Mikroorganismen aus dem Kolon verhindert (SZURZEWSKI 1969; VANTRAPPEN et al. 1977, 1981).

2.3.2.3 Chemisch-physikalische Barrieren

Einen Teil der chemisch-physikalischen Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen im Magen-Darm-Trakt stellt die bakterizide Wirkung der Magensäure dar. Durch den niedrigen pH-Wert der Magensäure (<3,0 - 4,0) werden exogene Bakterien, die in den Magen-Darm-Trakt gelangen, innerhalb von 15 Minuten größtenteils zerstört (GIANELLA 1972). Somit wird eine Kolonisierung des proximalen Darmes mit oropharyngealer und fäkaler Flora verhindert (DRASAR et al. 1969; COOK 1985; HOWDEN und HUNT 1987). Mehrere Versuche von MILTON-THOMPSON et al. (1982) zeigen, dass nach einer Herabsetzung der Azidität durch Einsatz von H₂-Blockern (in diesem Fall Cimitidin) es zu einer stärkeren Besiedlung des proximalen Darmes kommt. Außerdem konnten HORNICK et al. (1971) und CASH et al. (1974) feststellen, dass nach Erhöhung des pH-Wertes im Magen, z. B. durch Gaben von Na₂CO₃, wesentlich niedrigere infektiöse Dosen pathogener Keime zum Ausbruch der Erkrankung führen können.

Es ist jedoch in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass es auch Mikroorganismen gibt, welche trotz des niedrigen pH-Wertes im Magen in der Lage sind, zu überleben und eine Infektion auszulösen.

Zu diesen Mikroorganismen gehören u.a. auch Mycobakterien, insbesondere *Mycobacterium avium* (BODMER et al. 2000).

Auch der während den Verdauungsvorgängen ausgeschiedene Pankreassaft zeigt bakterizide Eigenschaften (BASSI et al. 1991). Bei In-vitro-Versuchen mit caninem Pankreassaft konnten bakterizide Wirkungen gegen *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. und *Klebsiella pneumoniae* festgestellt werden (RUBINSTEIN et al. 1985). PALMER (1967) und CHANDRA (1983) stellten in klinischen Studien fest, dass bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz die Durchfallepisoden nach bakterieller Infektion wesentlich schwerer verliefen und länger andauerten.

Ein durch Hydrolisierung des Peptidoglykans in der Zellwand von Bakterien und zur Lyse führender Bestandteil des Pankreassaftes ist das Lysozym (PEETERS und VANTRAPPEN 1975; WAKER 1976; WANG und CLOBEN 1985).

Lysozym konnte außerdem aus den Zellen der Ausführungsgänge von Speicheldrüsen und aus dem absorbierenden Epithel des Gastrointestinaltraktes isoliert werden (WANG und CLOBEN 1985). Somit gehört das Lysozym nicht nur im Dünndarm, sondern im gesamten MDT zu einem wesentlichen Bestandteil der chemisch-physikalischen Abwehr gegenüber Bakterien.

Als ein weiterer Bestandteil der chemisch-physikalischen Abwehr wird das Laktoferrin angesehen. Dieses Protein wird in verschiedenen Körperzellen produziert, z. B. in neutrophilen Granulozyten, in Zellen des Uterus, im Pankreas und in den Milchdrüsen (wobei hier die Regulation der Expression hormonabhängig ist) sowie in Zellen des MDT.

Die Funktion des Laktoferrins wurde im Wesentlichen in Zusammenhang mit dessen hohen Anteilen im Kolostrum und bzgl. der Abwehrmechanismen bei Kleinkindern untersucht. Dabei wurde anfänglich vermutet, dass die protektive Wirkung des Laktoferrins in der Fähigkeit, in Konkurrenz zu Bakterien Chelate mit Eisen zu bilden, liegen könnte (BALMER et al. 1989; ROBERTS et al. 1992).

Durch verschiedene Versuche konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die protektive Wirkung des Laktoferrins auch eisenunabhängig ist (ZAGULSKI et al. 1989; BELLAMY et al. 1992; WAKABAYASHI et al. 1992).

Bei unterschiedlichen Experimenten wurde inzwischen eine direkte bakterizide Wirkung bestimmter Peptidsequenzen des Laktoferrins nachgewiesen (BELLAMY et al. 1992).

Studien von ELLISON und GIEHL (1991) und SOUKKA et al. (1991) weisen auf einen synergistischen Effekt bei Kombination von Laktoferrin und Lysozym hin.

Außerdem existieren mittlerweile Beweise für eine direkte Beteiligung des Laktoferrins an der Modulation der Entzündungsreaktion in der akuten Phase (KRUZEL et al. 1998).

Die potenzielle inhibitorische Wirkung von Gallensalzen auf Mikroorganismen konnte bisher nur durch In-vitro-Studien belegt werden. Dabei zeigten insbesondere die dekonjugierten Salze bakterizide Wirkung (DIXON 1968). Bei In-vivo-Experimenten konnte keine Wirkung auf intestinale anaerob lebende Bakterien festgestellt werden (WILLIAMS et al. 1975).

2.3.3 Schleimhautflora

Bezüglich der Abwehrmechanismen durch die physiologische Schleimhautflora muss zwischen dem indirekten und direkten Antagonismus unterschieden werden.

2.3.3.1 Indirekter Antagonismus

Indirekter Antagonismus ist ein Ergebnis der Modifizierung der physiologischen Antwort des Wirtes durch die normale Mikroflora, welche ihrerseits wiederum diese beeinflusst (SAVAGE 1977).

Dazu gehört die Stimulation der Peristaltik der MDT durch die intestinale Flora, welche wesentlich die Kolonisierung des Darmes beeinflusst (FRETER 1962, 1974; DRASAR und HILL 1974).

2.3.3.2 Direkter Antagonismus

Nahrungskonkurrenz

Die ersten Hinweise für das Vorhandensein einer direkten Nahrungskonkurrenz konnten bei In-vitro-Studien mit *E. coli* bzw. *Shigella flexneri* gefunden werden (FRETER 1962).

Nach den so erlangten Ergebnissen geht FRETER (1974) davon aus, dass die normale „protektive“ Flora aus verschiedenen in diesem Bereich des Darmes heimischen Bakteriengruppen besteht, welche in der Lage sind, alle potenziellen Kohlenstoffquellen zu nutzen, die in der jeweiligen Nische vorhanden sind. Dadurch steht den von außen hinzukommenden Bakterien keine Energiequelle mehr zur Verfügung.

Habitatkonkurrenz

Am Beispiel von *E. coli* K88 konnte festgestellt werden, dass bestimmte Anheftungsstellen an Epithelzellen durch normale Mikroflora besetzt wird, so dass eine Kolonisierung durch potenziell pathogene Mikroorganismen erschwert ist (DAVIDSON und HIRSH 1976).

In Versuchen, bei denen die obligat anaerob im MDT lebenden Bakterien durch Metronidazol abgetötet wurden, konnte eine wesentlich höhere Kolonisierungs- und Translokationsrate von *E. coli* registriert werden (WELLS et al. 1987).

Milieuveränderungen

Auch die durch Stoffwechselprodukte der normalen Magen-Darm-Flora ausgelösten Milieuveränderungen tragen dazu bei, ein für von außen hinzukommende Mikroorganismen restriktives Milieu im MDT zu schaffen. Als Beispiele für diese Stoffwechselprodukte können Hydroniumionen, reduzierende Substanzen, H₂S, organische Säuren und Alkohole genannt werden (HENTGES 1970; FRETER 1974).

Auch ein erniedrigter pH-Wert durch die Stoffwechselprodukte von Laktobazillen stellt eine Milieuveränderung dar.

CALLAHAN und RICHARDSON (1973) konnten nach einer pH-Wert-Absenkung durch kolostrale Laktobazillen im MDT eine Veränderung der Enterotoxinproduktion von *V. cholerae* feststellen.

Ähnliche Ergebnisse erzielten ALDARETE und ROBERTSON (1977) bei Untersuchungen zur Enterotoxinproduktion von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen.

Auch die Produktion von leichtflüchtigen, kurzkettigen Fettsäuren, zum Beispiel durch *Bacteroides* spp., konnte nachweislich in vivo und in vitro zusammen mit einem niedrigen pH-Wert das Wachstum von *Shigella flexneri* verhindern (HENTGES und MAIER 1972).

Freisetzung von bakteriziden Substanzen durch Bakterien

KELSTRUP und GIBBONS (1969) entdeckten schon früh, dass Bakterien bestimmte Substanzen freisetzen, welche eine antibakterielle Wirkung haben können. Jedoch wurde ihre In-vivo-Wirksamkeit in Frage gestellt, da diese Substanzen durch intestinale Endotoxine oder proteolytische Enzyme schnell inaktiviert werden.

In späteren Studien konnte eindeutig festgestellt werden, dass Mikroorganismen der physiologischen MDF nachweislich mehrere Substanzen freisetzen, die eine antimikrobielle Wirkung haben.

Als Beispiele können hier NH_3 , H_2O_2 , Hämolytine, Lysostaphine, Enzyme und Bactericine genannt werden (TAGG et al. 1976).

Auch die Produktion von antibakteriell wirksamen Colicinen durch aus dem MDT isolierte Bakterien bestätigt die oben genannten Ergebnisse (IGLEWSKI und GARHARDT 1978).

2.3.4 Immunologische Abwehr im Magen-Darm-Trakt

Dem Organismus stehen zur Abwehr von potenziell pathogenen Mikroorganismen mehrere sich einander ergänzende Systeme zur Verfügung.

Dabei findet bei den Abwehrvorgängen keine isolierte Reaktion einzelner Strukturen statt, sondern alle Vorgänge greifen ineinander über, um so eine höchstmögliche Effektivität zu erreichen.

Aufgrund der täglichen Exposition mit potenziellen Pathogenen ist das Überleben eines jeden Organismus von der schnellstmöglichen Reaktion auf diese Pathogene essentiell. Da jedoch das spezifische Immunsystem einer gewissen Anlaufzeit bedarf, spielen unspezifische humorale bzw. zelluläre Systeme in der sogenannten akuten Phase eine sehr große Rolle.

Zu den zellulären Abwehrsystemen der akuten Phase gehören die in der Lamina propria des MDT lokalisierten Gewebsmakrophagen. Diese zur Phagozytose fähigen, sich aus Monozyten entwickelnden Zellen besitzen spezielle Oberflächenmoleküle, welche für Bakteriengruppen spezifisch sind. Diese Strukturen und die nachfolgenden Reaktionen wurden bereits im Abschnitt 2.3.2.1 genannt.

Neben der Phagozytose und der damit möglichen sofortigen Zerstörung der eingedrungenen Mikroorganismen lösen diese Zellen durch Sezernierung von Zytokinen (Syn. Monokine, Chemokine, Interleukine) drei weitere wichtige Schritte zur sofortigen lokalen und systemischen Immunabwehr aus. Zum Einen werden durch Absonderung von Chemokinen weitere phagozytierende Zellen angelockt. Desweiteren werden durch freigesetzte Interleukine und Tumornekrosefaktoren (α und β) Leukozyten (Effektorzellen) angelockt, die Gefäßpermeabilität verändert und Lymphozyten zur Antikörperproduktion angeregt (DINARELLO 1992; DOWNEY 1994). Als dritte wichtige Funktion der Zytokine, insbesondere von IL-6, ist die Anregung der Produktion der Akut-Phase-Proteine in der Leber zu nennen (VAN SNIK 1993). Dadurch wird die Verbindung von der unspezifischen lokalen zur systemischen Abwehr hergestellt.

Zu diesen Akut-Phase-Proteinen gehören das C-reaktive Protein, das Mannose-bindende Protein, das Serumamyloidprotein, Fibrinogen, das Lipopolysaccharid-bindende Protein, das Bakterizidie/Permeabilitätssteigernde Protein und viele andere (WEISS 1992; EMSLEY 1994).

Die ausführliche Besprechung des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins erfolgt im Abschnitt 2.4.

In Untersuchungen der letzten 10 Jahre wurde immer deutlicher, welche Bedeutung bei der initialen Abwehr den kationischen Peptiden zukommt (HANCOCK und LEHRER 1998). Zu diesen Peptiden gehören neben einigen oben genannten Proteinen unter anderem α - und β -Defensine. Diese Defensine werden in verschiedenen Bereichen und Zellen des Körpers produziert.

So konnten beispielsweise α - und β -Defensine aus Granulozyten isoliert werden (SELSTED et al. 1983, 1985; GANZ et al. 1985). β -Defensine werden außerdem in den Epithelzellen verschiedener Organe gebildet, z. B. der Haut, der Niere, des Pankreas, des Zahnfleisches etc. (DIAMOND und BEVINS 1998).

Im MDT wirken ebenfalls spezielle α -Defensine, sog. Cryptidine (Maus). Diese werden in den Paneth-Zellen (Granula-haltige Epithelzellen, welche an der Basis der Lieberkühnschen Krypten des Jejunums lokalisiert sind) produziert (SELSTED et al. 1992; HARWIG et al. 1995).

Von diesen Cryptidinen existieren verschiedene Isoformen, wobei durch nur sehr geringe Strukturunterschiede dieser Isoformen eine Spezifität gegenüber bestimmten Mikroorganismen entsteht (OUELLETTE et al. 1994; ALEY et al. 1994).

Die Defensine wirken jedoch nicht nur direkt antimikrobiell, sondern sie beeinflussen auch die sie umgebenden Zellen. So konnte z. B. eine Erhöhung der Chloridsekretion bestimmter Zellen durch den Einfluss einiger Defensine festgestellt werden (LENCER et al. 1997). Andere Defensine zeigen chemotaktische Aktivitäten zu T-Lymphozyten (CHERTOV et al. 1996).

Inzwischen wird vermutet, dass die Defensine, neben ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung, eine wichtige Verbindung zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem darstellen (LILLARD et al. 1999).

Als ein weiterer wichtiger Bestandteil der initialen Abwehr ist die Produktion von Interferon α und β durch Leukozyten zur Bekämpfung von Viren zu nennen (FRIEDMANN 1988).

Die Bekämpfung von intrazellulär gelegenen Erregern erfolgt sowohl im Initialstadium, als auch später durch sog. natürliche Killerzellen, welche zusätzlich durch IL-12 in ihrer Aktivität angeregt werden können (TRINCHIERI 1989).

Darm-assoziiertes Lymphgewebe (Gut-associated lymphoid tissue – GALT)

Das Darm-assoziierte Lymphgewebe beinhaltet den größten Teil des lymphatischen Gewebes, welches die Schleimhautoberflächen des Körpers auskleidet (LANKAMP-HENKEN et al. 1992). Der Magen-Darm-Trakt enthält ca. 70-80 % der Antikörperproduzierenden Zellen und stellt somit das Gewebe mit den höchsten lymphatischen Anteilen am Gesamtgewebe im ganzen Körper dar (VAN DER HEIJDEN et al. 1987; BRANDTZAEG et al. 1989).

Das Darm-assoziierte Lymphgewebe wird durch CEBRA und SHROFF (1994) und CEBRA et al. (1998) in drei Teile unterteilt. Der größte Teil besteht aus den sog. Peyerschen Platten. Es handelt sich hierbei um Ansammlungen von Lymphfollikeln in der Wand des Jejunums und des Ileums, welche jeweils von Bindegewebe umgeben sind. Diese Follikel stehen über einen Lymphsinus miteinander in Verbindung. Der Sinus mündet in Lymphgefäße und die Lymphflüssigkeit wird von dort aus den zugeordneten mesenterialen Lymphknoten zugeführt (LOWDEN und HEATH 1992).

Es bestehen tierartige Unterschiede bezüglich der Anatomie und dem zeitlichen Ablauf der Entwicklung und den daraus resultierenden Verteilungsmustern im Dünndarm.

GRIEBEL und HEIN (1996) haben folgende Einteilung vorgenommen. Wiederkäuer, Schwein, Hund, Mensch und Pferd zeigen große zusammenhängende Areale mit Lymphfollikeln im Ileum, welche pränatal entstanden sind, sowie vereinzelte Follikel im Jejunum, wobei die Mehrzahl der Follikel im Ileum lokalisiert sind.

Kaninchen, Nager und Vögel haben sowohl im Ileum als auch im Jejunum gleichmäßig verteilte, vereinzelt lokalisierte Lymphfollikel.

Bei allen Tierarten erreicht die Aktivität der Lymphfollikel im Ileum kurz nach der Geburt ihren Höhepunkt und sinkt dann mit der Alterung des Organismus ab. Die Aktivität im Jejunum bleibt während der gesamten Lebensdauer hoch (REYNOLDS und MORRIS 1983).

Im Ileum bestehen die Peyerschen Platten zu 95% aus sIgM-produzierenden B-Zellen, und beinhalten nur geringgradig (ggr.) $CD4^+$ -T-Zellen und Makrophagen. Im Jejunum enthalten die Platten nur 45% sIgM-B-Zellen, dafür 30% B-Zellen mit bereits modifizierter Isotyp-Produktion und 10% $CD4^+$ -T-Zellen (LARSEN und LANDSVERK 1986; HEIN et al. 1989)

Im Ileum zeigt das Epithel über den Follikeln eine homogene Struktur, wohingegen im Jejunum zusätzlich die in einem späteren Abschnitt beschriebenen M-Zellen im darüberliegenden Epithel lokalisiert sind (LANDSVERK et al. 1991).

Dabei ist die Hauptaufgabe der Peyerschen Platten im Ileum die Produktion von sIgM durch B-Zellen und die Generierung noch nicht sensibilisierter Immunglobuline. Im Jejunum stellen die Peyerschen Platten den Hauptbestandteil des Schleimhaut-assoziierte Immunsystems dar und dienen der Sensibilisierung (REYNOLDS und MORRIS 1983; REYNAUD et al. 1995).

Ein weiterer Bestandteil des Darm-assoziierten Lymphgewebes ist die Lamina propria des Darmes.

Die Bindegewebsschicht unterhalb des Darmepithels enthält eine weitgefächerte Mischung aus myeloiden und lymphoiden Zellen, z. B. IgA-produzierende Plasmazellen, $CD4^+$ -T-Zellen, dendritischen Zellen und Mastzellen.

Den dritten Bestandteil stellen die intraepithelialen Leukozytenräume dar, welche mit kleinen runden Zellen, wie z. B. natürlichen Killerzellen und verschiedenen CD8⁺ und CD3⁺-T-Zelltypen, gefüllt sind. Eine ähnliche Gliederung beschrieben bereits zu einem früheren Zeitpunkt BRANDTZAEG et al. (1989), DOBBINS (1986) und BRANDTZAEG et al. (1991). Funktionell besteht das GALT aus zwei immunologischen Komponenten, dem erfassenden (affektorischen) und dem ausführenden (effektorischen) Teil (OWEN 1977; OTTOWAY 1991).

Der erfassende Teil beginnt in den Peyerschen Platten. Hier werden naive T- und B-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (Antigen-presenting cells, APC) mit zahlreichen aus dem Lumen des MDT stammenden Antigenen sensibilisiert.

Das Antigen wird durch Endozytose von den auf der Oberfläche der Peyerschen Platten lokalisierten M-Zellen aufgenommen, transportiert und an dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen weitergegeben (OWEN 1977; WOLF et al. 1981; KUCHARZIK et al. 2000). Diese zuletzt genannten Zellen fungieren als die bereits oben erwähnten Antigen-präsentierenden Zellen (PANJA und MEYER 1994).

Die APC verarbeiten und präsentieren diese Antigene den CD4⁺-T-Helferzellen. Sobald diese Zellen sensibilisiert sind, induzieren sie die Entwicklung und Änderung des Isotyps bestimmter B-Lymphozyten von IgM-Plasma-Zellen zu IgA-sezernierenden Zellen.

Zytokine, wie TGF- β und IL-5, spielen eine wesentliche Rolle bei dieser Form der Isotypveränderung und B-Zellentwicklung (SONODA et al. 1992).

Die so aktivierten T- und B-Zellen wandern zu den Mesenteriallymphknoten, vermehren sich und gelangen über den Ductus thoracicus in die systemische Zirkulation.

Einige dieser Zellen gelangen über die Zirkulation zurück in die Lamina propria des Darmes, in den respiratorischen Trakt, die Speicheldrüsen und in die Drüsen der Mamma (RUDZIK et al. 1975; JACKSON et al. 1981; SALMI und JALKANEN 1991).

Durch die Produktion des spezifisch wirkenden sekretorischen IgA fungieren sie jetzt als der ausführende Teil des GALT.

Diese spezifischen sekretorischen Antikörper verhindern die Anheftung von Bakterien und Viren an das Darmepithel und verhindern somit eine systemische Invasion durch diese Mikroorganismen (SVANBORG und SVENNERHOLM 1978; RENEGAR und SMALL 1991; WINNER et al. 1991; SVANBORG 1994).

KROESE et al. (1996) konnten 2 Klassen dieser in der Lamina propria lokalisierten IgA-produzierenden Plasmazellen, konventionelle B-Zellen und B1-Zellen, bei der Maus identifizieren. Dabei produzieren die B1-Zellen ein sIgA, welches nur an normale intestinale Bakterien bindet und somit scheinbar teilweise verantwortlich für die Erhaltung der normalen intestinalen Flora ist.

In Bezug auf die Anzahl und die Aktivitätsstadien der damit im Zusammenhang stehenden zellulären Elemente scheint der Zustand der drei Teile des GALT von der Stimulation durch mikrobielles Antigen im Darm abzuhängen (CEBRA 1999).

Einige Autoren, so z. B. DUCHMANN et al. (1995) sind der Meinung, dass das Immunsystem nicht auf die Normalflora reagiert, sozusagen tolerant ist. Ein Zusammenbrechen dieser Toleranz könnte z. B. zur Ausbildung einer Chronic inflammatory bowel disease (IBD) führen.

Jedoch stellten KIMURA et al. (1997) fest, dass einige Bestandteile der Normalflora unter bestimmten Voraussetzungen eine Reaktion des systemischen Immunsystems hervorrufen können, ohne dass diese Reaktion eine Beeinträchtigung für den Wirt nach sich zieht. Die Reaktion kann z. B. in Form einer gezielten Antikörperbildung gegen Bestandteile der Normalflora in Erscheinung treten. Die regulative Komponente des Darm-assoziierten Immunsystems trägt durch Herabsetzung der systemischen Immunantwort zur Erhaltung der Homöostase des gesamten Immunsystems bei (NAGURA und SUMI 1988).

2.4 Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP)

2.4.1. Charakterisierung des LBP

In den letzten 30 Jahren wurde die Bedeutung der sogenannten Akut-Phase-Proteine bei der unspezifischen Immunantwort genauer erforscht.

Im Zuge dieser Forschungsarbeiten wurde ein ca. 60 kDa schweres Protein aus dem Serum von Kaninchen isoliert (TOBIAS et al. 1986). Aufgrund der bei dieser Arbeit schon festgestellten Bindungsfähigkeit des Proteins an Lipopolysaccharid (LPS), wurde es als Lipopolysaccharid – bindendes Protein, kurz LBP, bezeichnet.

Schon früh wurden die Hepatozyten als Produzenten des LBP erkannt (RAMADORI et al. 1990, SU et al. 1994; USUI et al. 1998). Interessanterweise wird die dort gefundene RNA erst während eines Akute-Phase-Geschehens im Körper translationsfähig (RAMADORI et al. 1990). In späteren Arbeiten konnte auch in der Lunge (SU et al. 1994; USUI et al. 1998; DENTENER et al. 2000), in der Niere (USUI et al. 1998) und im Darmepithel (MOLMENTI et al. 1993; VREUGDENHIL et al. 1999) die Produktion von LBP-mRNA nachgewiesen werden. Mehrere Autoren konnten in Peritonealflüssigkeit LBP nachweisen (HEINRICH et al. 2001, KNAPP et al. 2003). Alle Autoren sind sich einig, dass dies der Beweis auch für ein lokal stattfindendes Akute-Phase-Geschehen ist.

In der Leber wird ein 50 kDa schweres Einzelstrang-Polypeptid produziert (RAMADORI et al. 1990), im Serum liegt es jedoch als ca. 60 kDa schweres (Kaninchen: TOBIAS et al. 1989; Maus: GALLAY et al. 1993; Pavian: HAUDEK et al. 2000) bzw. als 58 kDa schweres Protein vor (Rind: HORADAGODA et al. 1995; Hund: USUI et al. 1998).

Zwischen den Lipopolysaccharid-bindenden Proteinen der einzelnen Tierarten bzw. des Menschen bestehen starke Homologien von mind. 80 bis 90 % Aminosäureidentität (SCHUMANN et al. 1990; GALLAY et al. 1993). Außerdem wurden Strukturhomologien mit anderen Serumproteinen, wie z. B. dem Cholesterolester-Transportprotein oder dem in Granulozyten vorkommenden BPI, erkannt (TOBIAS und SOLDAU 1988; SCHUMANN et al. 1990).

Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass Antikörper gegen rekombinantes humanes LBP bzw. Kaninchen-LBP keine Kreuzreaktivität zum Beispiel mit bovinem LBP zeigen (HORADAGODA et al. 1995).

GALLAY et al. (1994) konnten bei ihren Experimenten LBP - Serumkonzentrationen von $18,1 \mu\text{g/ml} \pm 4,0 \mu\text{g/ml}$ in gesunden Individuen (Mensch) und Serumkonzentrationen von bis zu $54,1 \mu\text{g/ml} \pm 10,2 \mu\text{g/ml}$ bei Sepsispatienten messen. Ähnliche Resultate wurden bei anderen Spezies erzielt (TOBIAS et al. 1986). Beim Rind wurde ein vierfacher Anstieg der Serumkonzentrationen des LBP 36 h nach einer Infektion mit *Pasteurella haemolytica* Typ A (umbenannt in *Mannheimia haemolytica*) festgestellt (HORADAGODA et al. 1995). Ähnliche Ergebnisse erzielten SCHRÖDL et al. (2001), wobei sie jedoch feststellten, dass Kälber im Gegensatz zu erwachsenen Tieren einen weniger starken Anstieg der Serumkonzentrationen zeigen.

Bei Mäusen wurden $1,5 \mu\text{g/ml}$ als Normalkonzentration gemessen. Nach einer Injektion von $350 \mu\text{g}$ LPS stieg der Serumspiegel auf $8,9 \mu\text{g/ml}$ (LAMPING et al. 1998). LE ROY et al. (2001) stellten bei BALB/c-Mäusen einen normalen Serumspiegel von 20nM (ca. $1,2 \mu\text{g/ml}$) fest.

Im Serum von gendeletierten Mäusen, sog. LBP-Knock-out-Mäusen, konnte im Serum kein LBP nachgewiesen werden, jedoch waren minimale Konzentrationen in der Leber meßbar (WURFEL et al. 1997).

Die Produktion von LBP wird durch IL-1 β und IL-6 beschleunigt (SCHUMANN et al. 1996).

2.4.2 Bedeutung und Funktion des LBP

Kurz nach der Entdeckung des LBP wurde die Lipid A-Struktur des LPS als Bindungsstelle verifiziert (TOBIAS et al. 1989). Zwischenzeitlich haben spätere Untersuchungen anderer Autoren gezeigt, das LBP auch bei der Erkennung von Strukturen Gram-positiver Mikroorganismen, z.B. Lipoteichonsäure, zusammen mit CD14 eine wesentliche Rolle spielt (FAN et al. 1999; SCHRÖDER et al. 2003).

LBP zeigt bei vielen Experimenten die Funktion eines Opsonins (WRIGHT et al. 1989), da nach einer Bindung von LBP an z. B. Oberflächenstrukturen von Salmonellen bzw. LPS-beschichteten Erythrozyten verstärkt eine Bindung an Makrophagen stattfindet.

Es wird eine Konformationsänderung im LPS-LBP-Komplex vermutet, da die Makrophagen bei den Einzelkomponenten keine verstärkte Aktivität zeigen (WRIGHT et al. 1989).

Der auf den Makrophagen lokalisierte LPS-Rezeptor-Komplex, welcher essentiell ist für die Erkennung von LPS auf zellulärer Basis, besteht aus CD14, TLR4 und MD-2 (WRIGHT et al. 1990; HAZIOT et al. 1996; HOSHINO et al. 1999; SCHROMM et al. 2001).

LBP erhöht dabei die Erkennung von LPS durch einen Transfer von den Zellwänden Gram-negativer Bakterien (SCHUMANN und LATZ 2000) zu mCD14 und sCD14 (SCHUMANN et al. 1990; WRIGHT et al. 1990). Dabei präsentiert CD14 das LPS zu TLR4, indem es das LPS an MD-2, ein akzessorisches Protein, welches mit dem extrazellulär gelegenen Teil von TLR4 verbunden ist, transferiert (SHIMAZU et al. 1999). MD-2 bindet LPS mit hoher Affinität (VIRIYAKOSOL et al. 2001) und ist essentiell für die Signalweiterleitung in die Zelle (NAGAI et al. 2002).

Bei In-vitro- und In-vivo-Experimenten wurde eine Erhöhung der Tumornekrose-Faktor (TNF) – Produktion durch Makrophagen nach Stimulation mit LPS und Zugabe von LBP beobachtet (SCHUMANN et al. 1990; DENTENER et al. 1993; GALLAY et al. 1994; LE ROY et al. 2001).

Jedoch wurde auch immer wieder aufgrund anderer Untersuchungsergebnisse ein LBP- unabhängiger Stimulationsweg vermutet (COUTURIER et al. 1992; WURFEL et al. 1997).

Fasst man alle Forschungsarbeiten der letzten 20 Jahre zusammen, so lassen sich folgende Funktionen des LBP festhalten:

1. Transport von LPS-Monomeren zu löslichem CD14 (PUGIN et al. 1993; VON ASMUTH et al. 1993; TOBIAS et al. 1995; YU und WRIGHT 1996; SCHUMANN und LATZ 2000),
2. Transport von LPS-Monomeren zu membranständigem CD14 (WRIGHT et al. 1990; TOBIAS et al. 1993; SCHUMANN und LATZ 2000),

3. LBP beschleunigt (katalysiert) die LPS-CD14-Bindung, ohne selbst in den Komplex eingebunden zu sein (HAILMAN et al. 1994),
4. Induktion der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren durch LBP im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr (HEINRICH et al. 2001),
5. Transfer von LPS zu HDL (High density lipoproteins), wobei LBP physiologisch mit Lipoproteinen im Serum assoziiert vorliegt (WURFEL et al. 1994, WURFEL und WRIGHT 1997a),
6. LBP katalysiert die Neutralisation von Lipoteichonsäure über Lipoproteine (FROON et al. 1995) und die Detoxifizierung von LPS durch Chylomikronen (VREUGDENHIL et al. 2003),
7. LBP kann andererseits verhindern, dass an membranständiges CD14 gebundenes LPS zu TLR4 transferiert werden kann (THOMPSON et al. 2003).

Die unter 1. – 4. genannten Funktionen resultieren in einer Stimulation von Zellen myeloischen Ursprungs, einer Erhöhung der TNF-, IL1- und IL-6-Produktion und Einleitung einer Abwehrreaktion des Körpers (DENTENER et al. 1993; GALLAY et al. 1994a).

Die unter 5. – 6. aufgeführten Funktionen führen zur Neutralisation von LPS und es erfolgt keine Abwehrreaktion, im Sinne eines Entzündungsgeschehens (WURFEL et al. 1994, WURFEL und WRIGHT 1997a; VREUGDENHIL et al. 2001).

Welche Funktion erfüllt wird oder ob die Abwehrkaskade unabhängig von LBP anläuft, hängt erstens davon ab, ob die Bakterien lebend oder abgetötet sind (LENGACHER et al. 1995-96), zweitens von der Dosis des applizierten LPS (LENGACHER et al. 1995-96; LAMPING et al. 1998) und drittens von der Virulenz des Erregers (LE ROY et al. 2001).

Bei der Untersuchung der Funktionsweisen des LBP wurden neben In-vitro-Versuchen auch In-vivo-Untersuchungen durchgeführt.

Hierbei wurden sowohl gendeletrierte Mäuse verwendet (WURFEL et al. 1997; JACK et al. 1997; Heinrich et al. 2001; KNAPP et al. 2003), als auch über die Blockierung des LBP durch Antikörper (LE ROY et al. 2001; GALLAY et al. 1994) versucht, genauere Erkenntnisse über die Funktion des LBP zu erhalten.

Bei den Versuchen mit gendeletrierten Tieren sind gegensätzliche Ergebnisse erzielt worden. JACK et al. (1997) fanden bei den Knock-out-Tieren nach LPS-Applikation keine erhöhten TNF- α - Spiegel und die Tiere waren vor den Auswirkungen der LPS-Injektion geschützt. WURFEL et al. (1997) hingegen fanden vergleichbare TNF- α -Konzentrationen in den Seren der gendeletrierten Tiere und bei den Wildstämmen nach Applikation von LPS. Sie sehen dabei die Gendelektion als Chance zur Erforschung des LBP-unabhängigen Reaktionsweges auf Infektionen mit Gram-negativen Erregern.

Warum es zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen gekommen ist, ist nach wie vor unklar. HEINRICH et al. (2001) vermuten, dass unterschiedliche LPS-Präparationen bei den Versuchen verwandt wurden bzw. dass die verschiedene Form der Gendelektion ein Grund sein könnte.

Bei experimentellen Infektionen mit *Salmonella* spp. intraperitoneal konnte zum einen festgestellt werden, dass hohe Dosen parenteral verabreichten LBP vor den Auswirkungen dieser Infektionen schützen (LAMPING et al. 1998) bzw. dass LBP-Knock-out-Tiere nicht in der Lage sind o.g. Infektionen in der Bauchhöhle abzuwehren (JACK et al. 1997). Außerdem konnten LBP-Knock-out-Mäuse, welche intraperitoneal mit *Salmonella typhimurium* infiziert wurden, mit rekombinantem TNF vor den Auswirkungen der Infektionen geschützt werden (HEINRICH et al. 2001).

Aufgrund der bereits erzielten Forschungsergebnisse lässt sich die Bivalenz der Funktionen des LBP erkennen. Zum einen ist es an der Induktion einer möglicherweise schweren Entzündungsreaktion beteiligt, andererseits wird durch das LBP die Entstehung einer Entzündung verhindert. Die bis jetzt erzielten Ergebnisse konzentrieren sich auf die Funktionen des LBP während einer Akute-Phase-Reaktion, da zu diesem Zeitpunkt der Serumspiegel stark ansteigt.

Obwohl verschiedene Autoren LBP im Serum gesunder Individuen feststellen konnten, existieren kaum Untersuchungen zur Funktion des LBP im Zustand der Homöostase von Mikroorganismen und ihrem Wirt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

Zur Durchführung des Versuches wurden 20 Tiere eines BALB/c-Mausstammes, LBP^{+/+} und 20 Tiere eines BALB/c-LBP-knock-out-Mausstammes, LBP^{-/-} (Züchtung und Gendelektion erfolgte nach JACK et al. 1997) vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden unter konventionellen Haltungsbedingungen gehalten.

3.2 Materialentnahme, Transport und Lagerung

Die Materialentnahme erfolgte im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald.

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Unmittelbar nach der Tötung wurde der Darm unter semisterilen Bedingungen entnommen.

Anschließend wurde Darminhalt aus den Abschnitten Jejunum, Zäkum und Kolon in ein vordefiniertes Volumen eines Einfriermediums (Nährbouillon I (SIFIN, Berlin, Deutschland), mit 50 % Glycerin, abgefüllt in Eppendorfröhrchen) verbracht. Zur Erfassung strikt anaerob wachsender Bakterien wurde zusätzlich Zäkuminhalt in Einfriermedium gegeben und mit Paraffin überschichtet. Jedes Eppendorfröhrchen wurde vor und nach Einbringen des Darminhaltes gewogen und das Gewicht dokumentiert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Desweiteren wurde Koloninhalt in Eppendorfröhrchen mit Nährbouillon I gegeben. Diese Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden außerdem Abklatschpräparate der Darmmukosa aller Darmabschnitte angefertigt, luftgetrocknet und bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.3 Mikrobiologische Untersuchungen

3.3.1 Qualitative Voruntersuchungen auf *E. coli*

Der in Nährbouillon I eingebrachte Koloninhalt wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer geeichten Öse 10 µl der jeweiligen Probe auf Gassner-Agar (Sifin) ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C aerob inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden anhand ihrer Makro- und Mikromorphologie und biochemischen Stoffwechsellleistungen mittels HIB- und Kligler-Agar (SIFIN) identifiziert.

Die als *E. coli* identifizierten Bakterien wurden durch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin auf diverse virulenzassoziierte Gene untersucht.

3.3.2 Quantitative Bestimmung der aeroben Keimzahlen

Zur quantitativen Bestimmung der Keimzahlen wurden Verdünnungsreihen der Proben in steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) angefertigt, wobei ein Verdünnungsmodus von 1:10 bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} zu Grunde gelegt wurde.

Jeweils 10 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf die jeweiligen Nährboden aufgetropft.

3.3.2.1 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ)

Zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl wurde Rinderblut-Agar (Nähragar I (SIFIN), mit 10 % Rinderblut) und Nähragar I verwendet. Die Bebrütung erfolgte unter aeroben Bedingungen für 24 h bei 37 °C.

Nach 24 h wurden die bei geeigneter Verdünnungsstufe gewachsenen Einzelkolonien (1-20 Kolonien) gezählt und zusätzlich mit dem zuvor ermittelten Verdünnungsfaktor aus der Einwaage verrechnet. Daraus ergibt sich die Zahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Darminhalt (KbE/g).

Die Differenzierung der einzelnen auf Rinderblut-Agar kultivierten Bakterienspezies erfolgte mittels Gramfärbung und über biochemische StoffwechsellLeistungen. Dabei fand das API CH50 (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) mit dem CHB-Medium (bioMérieux) Anwendung (NGO et al. 2000).

3.3.2.2 Bestimmung der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl (GNKZ)

Zur Bestimmung der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl wurde Gassner-Agar und MacConkey-Agar (SIFIN) verwendet. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 24 h. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben.

3.3.3 Quantitative Bestimmung anaerober Keimzahlen

3.3.3.1 Bestimmung der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl (GNKZ_{an})

Zur Bestimmung der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl in Zäkuminhalt wurde nach Entfernung der Paraffinüberschichtung unter streng anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox bzw. Glove-Box [Heraeus], Standort im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig), wie bereits beschrieben, eine Verdünnungsreihe angelegt.

Als Nährboden wurde Columbia-Schafblut-Agar (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien), versetzt mit 7,5 mg/l Vancomycin (Sigma, St. Louis, USA) und 40 mg/l Gentamycin (Sigma), zur selektiven Anzüchtung Gram-negativer Anaerobier, verwendet. Die Inkubation erfolgte unter streng anaeroben Bedingungen bei 37 °C für 3-7 d.

Als Kontrolle wurde ein Ansatz der Verdünnungsreihe unter mikroaeroben Bedingungen auf Schafblut-Agar (Oxoid) parallel mitgeführt.

Es wurden alle gewachsenen Kolonien getrennt nach Koloniemorphologie gezählt. Die weitere Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

Danach erfolgte eine Differenzierung der strikt anaerob gewachsenen Gram-negativen Kolonien mit Hilfe des API Rapid 32A (bioMérieux).

3.3.3.2 Bestimmung der Keimzahl auf MRS-Agar

Die erstellten Verdünnungsstufen wurden auf MRS-Agar (Oxoid) getropft und die Bebrütung der Platten erfolgte anaerob bei 37 °C für 48 h.

Es wurden alle gewachsenen Kolonien getrennt nach Koloniemorphologie gezählt.

Eine Identifizierung der *Lactobacillus* spp. erfolgte durch Gram-Färbung und biochemische Stoffwechsellleistungen, unter Verwendung des CHL-Medium (bioMérieux) und API CH50 (bioMérieux).

Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.4 Quantitative Bestimmung der Hefen - Keimzahl

Zur Bestimmung der Hefen - Keimzahl wurde Sabouraud - 4 % Glucose-Agar (SIFIN) verwendet. Die Bebrütung erfolgte aerob bei 37 °C für 5 d.

3.3.5 Quantitative Bestimmung von *Clostridium perfringens*

Die *Clostridium perfringens*-Keimzahl wurde auf Schafblut-Agar, (Nähragar I, SIFIN, 10 % Schafblut) versetzt mit 200 mg/l Neomycin (Fluka, St. Gallen, Schweiz) und 100 mg/l Polymyxin B (Fluka), bestimmt. Die Bebrütung erfolgte unter anaeroben Bedingungen für 24 h bei 37 °C.

3.4 Bestimmung der Antikörperspiegel im Serum

3.4.1 Material

Es wurden Seren von 15 Tieren des unter 3.1 genannten LBP^{+/+}-Mausstammes und von 17 Tieren des LBP^{-/-}-Mausstammes untersucht, die vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt wurden. Diese Seren stammten nicht von den Tieren, welche im Rahmen dieser Arbeit mikrobiologisch untersucht wurden, aber von Tieren derselben Mausstämme.

Die relative Konzentration der Antikörper wurde in den Seren mittels ELISA bestimmt.

3.4.2 Grundlegende methodische Arbeitsschritte

Bei der Durchführung der immunologischen Untersuchungen kamen hochaffine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten (Greiner, F-Form) zur Anwendung.

Die Platten wurden mit der unter dem jeweiligen Unterpunkt angegebenen Menge des jeweiligen Antigens beschichtet.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte danach eine einstündige Inkubation auf einem Mikrotiterplattenschüttler (MPS, MTS 2, IKA, 500 Drehungen pro Minute) bei Raumtemperatur.

Anschließend folgten zwei Waschvorgänge mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 0,1 % Tween 20 (PBST).

Daraufhin wurden die in Probenpuffer verdünnten Seren (100 µl/Kavität; Konzentrationen siehe jeweiliger Unterpunkt) zugegeben.

An eine erneute einstündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem MPS schlossen sich drei Waschvorgänge mit PBST an.

Anschließend wurden die gebundenen IgG- bzw. IgM-Antikörper mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD bzw. Ziege-anti-Maus-IgM-POD nachgewiesen. Die jeweils verwendeten Verdünnungen sind in den nachfolgenden Unterpunkten spezifiziert.

Es erfolgte danach ein dreimaliger Waschvorgang der Platten mit PBST.

Als Substrat zur Detektion der Peroxidase wurde Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet.

Nach Stoppen der Substratreaktion mit 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 450 nm mit dem ELISA-Reader (Anthos htIII).

Die Angabe der relativen Antikörper-Konzentration erfolgt als Extinktionswert bei 450 nm.

3.4.3 Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- bzw. IgM-anti- LPS-Rc-Form (*E. coli*, J5, Fluka)

Die Platten wurden mit LPS-Rc-Form (*E. coli*, J5, Sigma) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet.

Nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Platten mit PBST zweimal gewaschen. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % Casein (Sigma) in 0,9 %iger NaCl-Lösung (150 µl/ Kavität, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur) erfolgte die Zugabe von 50 µl/Kavität 1/20 in Probenpuffer verdünnter Serumproben. Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/2000, Dianova, Hamburg, Deutschland) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/2000, Dianova) bestimmt.

3.4.4 Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- bzw. IgM-anti- LPS-Ra-Form (*E. coli*, EH 100, Sigma)

Die Platten wurden mit LPS-Ra-Form (*E. coli*, EH 100, Sigma) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet.

Das Verdünnungsverhältnis der in Probenpuffer verdünnten Serumproben betrug 1/100.

Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/5000, Dianova) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/5000, Dianova) detektiert.

3.4.5 Bestimmung der relativen Konzentration der IgG- bzw. IgM-anti-LPS-S-Form (*E. coli*, O111:B4, Sigma)

Die Platten wurden mit LPS-S-Form (*E. coli*, O111:B4, Sigma) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet.

Das Verdünnungsverhältnis der in Probenpuffer verdünnten Serumproben betrug 1/100.

Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/5000, Dianova) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/5000, Dianova) konjugiert.

3.4.6 Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- bzw. IgM-anti-Peptidoglykan (*Staph. aureus*, Fluka)

Die Platten wurden mit Peptidoglykan (*Staph. aureus*, Fluka) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet.

Das Verdünnungsverhältnis der in Probenpuffer verdünnten Serumproben betrug 1/100.

Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/5000, Dianova) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/5000, Dianova) konjugiert.

3.4.7 Bestimmung der relativen Konzentration der IgG- bzw. IgM gegen Extraktantigen von zwei isolierten *Bacillus*-Stämmen (I und II)

3.4.7.1 Herstellung des Extraktantigens

Die bei der Differenzierung (siehe Ergebnisse) isolierten *Bacillus*-Stämme I und II wurden bei 37 °C aerob auf jeweils 5 Platten mit Rinderblut-Agar (Nähragar I, SIFIN, 10 % Rinderblut) kultiviert.

Die Bakterien wurden von den Platten gewonnen und jeweils getrennt nach Stamm in sterilem PBS (pH 7,35) aufgenommen. Es folgte ein zweimaliger Waschvorgang, um eventuelle Mediumreste zu entfernen.

Nach einer Zentrifugation bei 6500g (Labofuge 400, Heraeus) für 15 min wurde das Pellet anschließend in 50 mM Tris/HCl-Lösung (pH 7,5, mit 1 % Dithiothreitol (DTT), 2 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)) aufgenommen. Danach wurden zu gleichem Volumenanteil Glassbeads (\varnothing 0,1 mm, Roth, Karlsruhe) zugegeben. Darauf folgend wurde in zweiminütigen Intervallen dreimal intensiv gevortext. In den zweiminütigen Intervallpausen wurden die Eppendorfröhrchen in einem Wasserbad (65 °C) inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zugabe von Jodacetamid (Endkonzentration 20 mM).

Nach einer Zentrifugation bei 6500g für 15 min wurde der Überstand abgenommen und mit absolutem Ethanol (zu einer Endkonzentration von 80 %) versetzt. Die nach 30-minütiger Inkubation bei -20 °C ausgefällten Bakterienbestandteile wurden bei 1400g über 30 min abzentrifugiert. Das abzentrifugierte Fällungsprodukt wurde danach in PBS aufgenommen.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem Spektralphotometer (Typ MBA 2000, Perkin Elmer).

3.4.7.2 Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- bzw. IgM-anti-*Bacillus*-Stamm I (siehe Antigenherstellung)

Die Platten wurden mit gefällten Bakterienbestandteilen (*Bacillus*-Stamm I) in einer Konzentration von 5 μ g/ml beschichtet.

Das Verdünnungsverhältnis der in Probenpuffer verdünnten Serumproben betrug zur Bestimmung der relativen IgM-Konzentration 1/100 bzw. zur Bestimmung der relativen IgG-Konzentration 1/200.

Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/2000, Dianova) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/2000, Dianova) bestimmt.

3.4.7.3 Bestimmung der relativen Konzentration von IgG- bzw. IgM-anti-*Bacillus*-Stamm II (siehe Antigenherstellung)

Die Platten wurden mit gefällten Bakterienbestandteilen (*Bacillus*-Stamm II) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet.

Das Verdünnungsverhältnis der in Probenpuffer verdünnten Serumproben betrug zur Bestimmung der relativen IgM-Konzentration 1/100 bzw. zur Bestimmung der relativen IgG-Konzentration 1/200.

Die gebundenen IgG- bzw. IgM- Antikörper wurden mit Ziege-anti-IgG-Maus-POD (1/5000, Dianova) bzw. Ziege anti-IgM-Maus-POD (1/2000, Dianova) detektiert.

3.5 Verfahren der Datenanalyse und Auswertung

Die statistisch-mathematische Auswertung der Einzelwerte für die Keimzählungen und ELISA-Extinktionswerte wurde mit der Software "SigmaPlot" und "SigmaStat" (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Vor der statistischen Signifikanzanalyse, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde, erfolgte eine Prüfung der Normalverteilung. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der ungepaarte parametrische t-Test verwendet. Bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung wurde durch das Programm der ungepaarte, nicht parametrische Test nach Mann-Whitney zum statistischen Vergleich zweier Stichproben angewandt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrobiologische Untersuchungen

4.1.1 Vergleich der Nachweishäufigkeit von *E. coli* bei der LBP^{-/-}-Gruppe bzw. der LBP^{+/+}-Gruppe

Um das prinzipielle Vorhandensein aerober Gram-negativer Bakterien zu prüfen, wurde ein qualitativer Vorversuch, wie unter 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Dieser Vorversuch sollte auch der späteren Differenzierung, der bei diesen Mausstämmen vorkommenden aerob wachsenden Gram-negativen Bakterien, dienen.

Nach Ansatz der Koloninhaltsproben auf dem Differenzierungsnährboden nach Gassner (siehe Material und Methoden) war auffällig, dass nur aus 4/20 Proben [20 %] der LBP^{-/-}-Gruppe, dagegen aus 14/20 Proben [70 %] der LBP^{+/+}-Gruppe aerob wachsende Gram-negative Bakterien isoliert werden konnten.

Alle Kolonien, der bei der LBP^{-/-}-Gruppe isolierten Bakterien wurden biochemisch als *E. coli* identifiziert und zeigten ein gelb-grünliches, feucht-glänzendes, zum Teil ineinanderlaufendes Wachstum auf Gassner-Agar mit nicht exakt begrenzten Kolonierändern.

Diese Form des Wachstums konnte auch bei zwei Isolaten (*E. coli*) der LBP^{+/+}-Gruppe auf Gassner-Agar festgestellt werden. Die restlichen zwölf Isolate (*E. coli*) der LBP^{+/+}-Gruppe zeigten auf Gassner-Agar eine blaue, leicht feucht schimmernde Kulturmorphologie mit exakt begrenzten Kolonierändern.

Bei der Untersuchung von drei isolierten *E. coli*-Stämmen der LBP^{-/-}-Gruppe und von vierzehn isolierten *E. coli*-Stämmen der LBP^{+/+}-Gruppe auf virulenzassoziierte Gene gab es Unterschiede im Vorhandensein eines Genes, welches für eine enteroaggregative Komponente (*astA*) steht. Die gelb-grünlichen, feucht-glänzenden, zum Teil ineinanderlaufenden Kolonien, ohne scharf begrenzte Kolonieränder beider Gruppen besaßen dieses Gen nicht.

Die zwölf blauen, leicht feucht schimmernden Kolonien der LBP^{+/+}-Gruppe mit exakt begrenzten Kolonierändern besitzen dieses Gen.

4.1.2 Keimzahlen nach aerober Inkubation

4.1.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ)

Die aerobe Gesamtkeimzahl wurde auf zwei unterschiedlichen Nährböden erfasst, wobei der Rinderblut-Agar verwendet wurde, um eventuell anspruchsvollere Keime in die Keimzählung mit einzubeziehen.

Bei der statistischen Auswertung der Koloniezahlen auf dem Einfach-Agar konnten nur bei den Proben aus dem Jejunum ein signifikanter Unterschied in der aeroben Gesamtkeimzahl festgestellt werden. Dabei war die aerobe Gesamtkeimzahl in der LBP^{-/-}-Gruppe gegenüber der LBP^{+/+}-Gruppe erhöht. In den Darmabschnitten Zäkum und Kolon waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Aerobe Gesamtkeimzahl (lg[KbE/g]) von LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe, ermittelt auf Einfach-Agar (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	Jejunum		Zäkum		Kolon	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	6,25	5,69	6,96	6,56	7,05	7,09
s	0,55	0,83	0,44	1,21	0,53	1,47
s _f	0,12	0,19	0,097	0,27	0,12	0,33
x _m	6,24	5,86	6,98	6,75	7,21	7,38
n	20	20	20	20	20	20
p	< 0,05		>0,05		> 0,05	

x = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung ; s_f = Standardfehler des Mittelwertes ;
x_m = Median ; n = Gruppengröße ; p = Signifikanzniveau

Die statistische Auswertung der aeroben Gesamtkeimzahl auf Rinderblut-Agar ergab signifikant höhere Koloniezahlen in allen drei Darmabschnitten der LBP^{-/-}-Gruppe im Vergleich zur LBP^{+/+}-Gruppe. Im Zäkum und im Kolon betrug der Unterschied mehr als eine Zehnerpotenz (Median, siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Aerobe Gesamtkeimzahl (lg[KbE/g]) von LBP^{-/-}-und LBP^{+/+}-Gruppe , ermittelt auf Blut-Agar (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	Jejunum		Zäkum		Kolon	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	5,85	5,11	6,47	5,29	6,63	5,29
s	0,51	1,13	0,82	1,06	0,65	1,76
s _f	0,11	0,25	0,18	0,24	0,14	0,39
x _m	5,77	4,88	6,62	5,21	6,78	5,31
n	20	20	20	20	20	20
p	< 0,05		< 0,001		< 0,005	

ξ = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung ; s_f = Standardfehler des Mittelwertes ; x_m = Median; n = Gruppengröße ; p = Signifikanzniveau

Die Untersuchung der aeroben Gesamtkeimzahl auf Rinderblut-Agar und die bakterielle Feindifferenzierung ergab weitere Unterschiede, welche insbesondere zwei Bakterienpopulationen betrafen.

Beide Bakterienspezies wurden aufgrund der Gram-Färbung, der Sporenbildung (Abb. 3), ihrem Wachstumsverhalten unter anaeroben Verhältnissen und den biochemischen Stoffwechsellleistungen als *Bacillus coagulans* identifiziert.

Bacillus coagulans-Stamm I zeigte sich mit kleinen weißen Kolonien mit Hämolyse auf Rinderblut-Agar (Abb. 1). In der statistischen Auswertung konnten nur im Jejunum signifikante Unterschiede zwischen der LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe festgestellt werden. Dabei wurde bei der LBP^{-/-}-Gruppe eine höhere Keimzahl ermittelt.



Abb. 1:
Bacillus coagulans-Stamm I, Blut-Agar

Bacillus coagulans-Stamm II, welcher nur bei zwei Tieren aus der LBP^{+/+}-Gruppe, und dann jeweils nur in einem Darmabschnitt gefunden werden konnte, wächst mit kleinen grauen Kolonien und partieller Hämolyse (Abb. 2). Demgegenüber konnte in der statistischen Auswertung in allen Darmabschnitten der LBP^{-/-}-Gruppe diese Bakterienspezies signifikant häufiger festgestellt werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: *Bacillus-coagulans*-Stamm II (lg[KbE/g]) von LBP^{-/-}-und LBP^{+/+}-Gruppe, ermittelt auf Blut-Agar (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	Jejunum		Zäkum		Kolon	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	2,26	0	6,13	0,20	6,01	0,30
s	2,59	0	1,50	0,89	0,55	1,33
s _f	0,58	0	0,34	0,20	0,35	0,30
x _m	0	0	6,54	0	6,30	0
n	20	20	20	20	20	20
p	< 0,05		< 0,001		< 0,005	

ξ = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung ; s_f = Standardfehler des Mittelwertes ;
x_m = Median ; n = Gruppengröße ; p = Signifikanzniveau

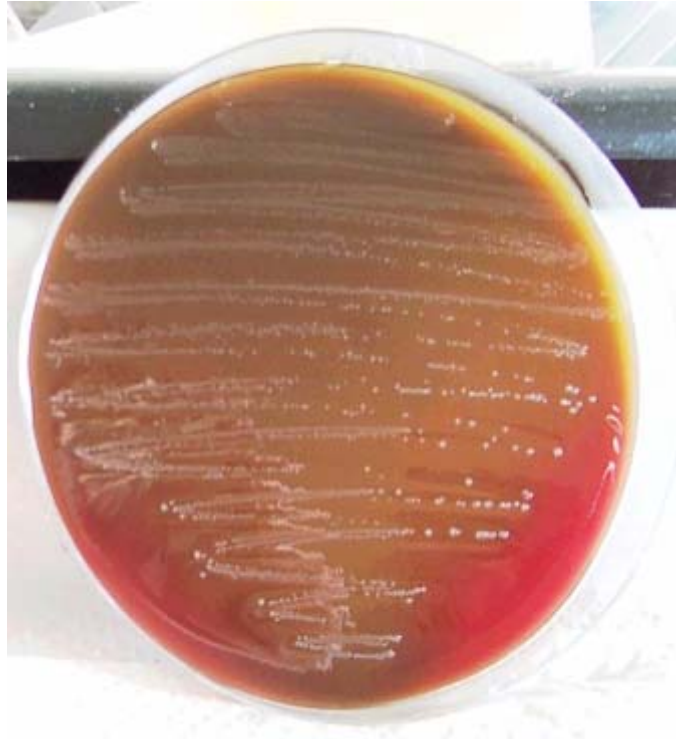


Abb. 2:

Bacillus coagulans-Stamm II, Blut-Agar

Beide Stämme zeigten auf Einfach-Agar auch bei mehrtägiger Bebrütung nur ein minimales Wachstum, mit sehr kleinen Kolonien, so dass bei der Zählung zur aeroben Gesamtkeimzahl diese Bakterien nicht im vollen Umfang erfasst werden konnten.

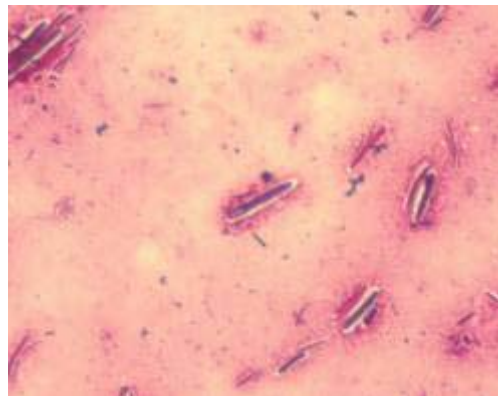


Abb. 3:

Sporenbildner, Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)

4.1.2.2 Aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl (GNKZ)

Zur besseren Absicherung der Ergebnisse wurden bei der Erfassung der Gram-negativen Gesamtkeimzahl verschiedene Nährböden parallel verwendet, da aus Vorversuchen bekannt war, dass bei der Maus die Gram-negative aerobe Flora nur geringgradig vorhanden ist.

Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auch in diesen Untersuchungen die geringe aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl sowohl in der LBP^{-/-}- als auch in der LBP^{+/+}-Gruppe auf.

In beiden Gruppen konnten keine Gram-negativen aerob wachsenden Keime im Jejunum gefunden werden.

In den Zäkumproben wuchsen in der LBP^{+/+}-Gruppe bei 8/20 Tieren (40 %) auf Gassner-Agar bzw. bei 7/20 Tieren (35 %) auf MacConkey-Agar nachweislich aerobe Gram-negative Keime. In der LBP^{-/-}-Gruppe waren es nur 1/20 Tieren (5 %) auf Gassner-Agar bzw. 2/20 Tieren (10 %) auf MacConkey-Agar, bei denen aerobe Gram-negative Keime isoliert werden konnten.

Im Kolon der LBP^{-/-}-Gruppe konnten keine aerob wachsenden Gram-negativen Keime nachgewiesen werden. In der LBP^{+/+}-Gruppe zeigten 6/20 Tieren (30 %) auf Gassner-Agar bzw. 4/20 Tieren (20 %) auf MacConkey-Agar in den Kolonproben ein Wachstum aerober Gram-negativer Keime (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7:

Auf Gassner-Agar und MacConkey-Agar ermittelte aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahlen (Einzeltierdarstellungen) in Darminhaltsproben aus verschiedenen Darmabschnitten (lg[KbE/g]), n=20 (LBP^{-/-}-Gruppe); n=20 (LBP^{+/+}-Gruppe)

a) Zäkum

LBP ^{+/+} -Gruppe	
Gassner-Agar	MacConkey-Agar
2,7	/
/	1,7
1,7	1,7
3,7	3,0
3,1	2,5
4,1	3,5
1,7	/
2,4	2,4
2	2,4

LBP ^{-/-} -Gruppe	
Gassner-Agar	MacConkey-Agar
/	1,7
2,8	2,3

b) Kolon

LBP ^{+/+} -Gruppe	
Gassner-Agar	MacConkey-Agar
2,7	/
3,4	3,1
2,7	2,8
1,7	/
3,4	3,4
2,9	2,5

Nach der Differenzierung der gewachsenen Kolonien konnten diese zu 99 % als *E. coli* und zu 1 % als *Proteus rettgeri* identifiziert werden.

4.1.3 Keimzahl nach anaerober Inkubation**4.1.3.1 Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl (GNKZ_{an})**

Nach der Untersuchung der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl in den Zäkumproben läßt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der LBP^{-/-}-Gruppe und der LBP^{+/+}-Gruppe feststellen (siehe Tabelle 8). Dabei unterscheidet sich die Keimzahl zwischen den Gruppen um eine Zehnerpotenz (Median).

Tabelle 8: Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl auf Columbia-Blut-Agar (lg[KbE/g]) im Zäkum (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	LBP ^{-/-} -Gruppe	LBP ^{+/-} -Gruppe
ξ	3,89	6,05
s	2,43	0,73
s _f	0,54	0,16
x _m	5,08	6,12
n	20	20
p	< 0,0001	

ξ = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung; s_f = Standardfehler des Mittelwertes; x_m = Median; n = Gruppengröße; p = Signifikanzniveau

Alle in diesem Versuch isolierten anaerob wachsenden Gram-negativen Bakterien gehörten dem Genus *Prevotella* bzw. *Bacteroides* an.

Während der Untersuchungen wurde die Isolation durch Vancomycin-resistente Kokken erschwert, welche nach mehrmaliger kultureller Anzucht Wachstum auch unter mikroaeroben Bedingungen zeigten.

Sie waren während der Feststellung der Gesamtkeimzahl aufgrund ihrer Koloniemorphologie als separate Keimzahl festgehalten worden und konnten somit nach exakter Differenzierung aus der Berechnung der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl herausgenommen werden.

Kulturell konnten keine *Fusobacterium* spp. aus dem Darminhalt kultiviert werden. In gefärbten Abklatschpräparaten der Darmmukosa sind jedoch fusiforme Gram-negative und Gram-positive Bakterien zu erkennen (Abb. 4 und 5).

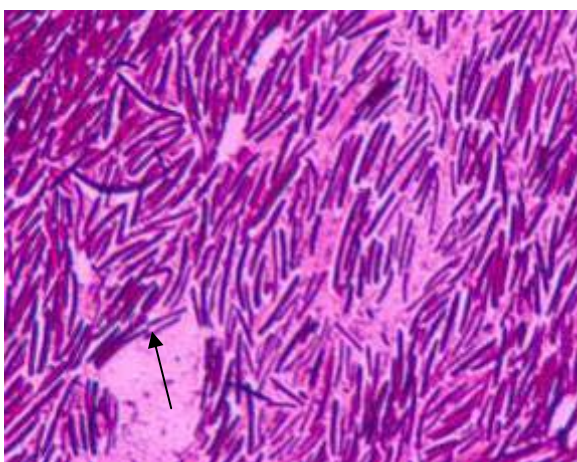


Abb. 4:
Fusiforme Bakterien,
Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)



Abb. 5:
von einem Makrophagen umschlossenes Bakterium,
Abklatschpräparat Zäkum (Gram-Färbung)

4.1.3.2 Gesamtkeimzahl auf MRS-Agar wachsender Keime

Nach zweitägiger Bebrütung unter anaeroben Kultivierungsbedingungen konnte bezüglich der Gesamtkeimzahl der auf MRS-Agar wachsenden Keime in zwei Darmabschnitten ein signifikanter Unterschied zwischen der LBP^{+/+}-Gruppe und der LBP^{-/-}-Gruppe festgestellt werden. Dabei konnten aus dem Darminhalt des Zäkums und des Kolons der LBP^{+/+}-Gruppe signifikant mehr, später als Laktobazillen identifizierte Mikroorganismen, isoliert werden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Gesamtkeimzahl der auf MRS-Agar wachsenden Keime (lg[KbE/g]) von LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe, ermittelt auf MRS-Agar (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	Jejunum		Zäkum		Kolon	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
\bar{x}	6,83	7,19	7,52	7,96	7,51	8,28
s	0,77	0,93	0,77	0,57	0,79	0,67
s _f	0,17	0,21	0,17	0,13	0,18	0,15
x _m	6,79	7,00	7,62	8,14	7,66	8,27
n	20	20	20	20	20	20
p	> 0,05		< 0,05		< 0,01	

x = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung; s_f = Standardfehler des Mittelwertes; x_m = Median ; n = Gruppengröße; p = Signifikanzniveau

Es konnten zwei unterschiedliche Kolonieförmigkeiten unterschieden und einzeln gezählt werden.

Zum einen waren orange-farbene, feuchte Kolonien mit scharfen Rändern gewachsen, zum anderen konnten hell-beige, trockenere Kolonien mit scharfen Rändern isoliert werden.

Nach Zählung der Kolonien unterschied sich die LBP^{-/-}-Gruppe und die LBP^{+/+}-Gruppe in Bezug auf das Vorkommen der orange-farbenen Kolonien. Bei der LBP^{+/+}-Gruppe konnten in den Kolonproben eine um eine Zehnerpotenz höhere Keimzahl festgestellt werden. Diese statistisch signifikanten Unterschiede waren in allen drei Darmabschnitten feststellbar (siehe Tabelle 10). In Bezug auf die hell-beigen Kulturen gab es keine Unterschiede zwischen der LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe .

Tabelle 10: *Lactobacillus-fermentum*-Keimzahl (orange-farbene Kolonien in lg[KbE/g]) von LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe (KG), ermittelt auf MRS-Agar (siehe Material und Methoden)

Statistische Kenngrößen	Jejunum		Zäkum		Kolon	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	4,70	6,45	4,90	7,29	4,79	7,24
s	2,86	1,80	3,33	0,76	3,29	1,86
s _f	0,64	0,40	0,74	0,17	0,74	0,42
x _m	5,99	6,64	6,58	7,45	6,21	7,60
n	20	20	20	20	20	20
p	< 0,05		< 0,01		< 0,001	

ξ = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung; s_f = Standardfehler des Mittelwertes;
x_m = Median; n = Gruppengröße; p = Signifikanzniveau

Durch die Benutzung des CHL-Mediums und des API 50 konnte eine exakte Differenzierung der Kulturen erfolgen.

Die hell-beigen Kolonien konnten als *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* identifiziert werden.

Die orange-farbenen Kolonien wurden als *Lactobacillus fermentum* identifiziert. Diese Kulturen zeigen die orange-farbene Pigmentierung nur unter anaeroben Kultivierungsbedingungen und können bei Kultivierungstemperaturen von 45 °C wachsen (Abb. 6).

Abb. 6:

Lactobacillus fermentum, MRS-Agar

**4.1.4 Keimzahl *Clostridium perfringens***

Aus den in diesem Versuch untersuchten Proben konnte *Cl. perfringens* nicht isoliert werden.

Bei den Untersuchungen zur anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl konnte bei der Anzucht in der Glove-Box mehrmals *Cl. clostridiiforme* isoliert werden.

4.1.5 Keimzahl Hefen

Aus den in diesem Versuch untersuchten Proben konnten keine Hefen isoliert werden.

4.2 Antigen-spezifische Antikörperspiegel im Serum

Aufgrund der festgestellten Unterschiede in Bezug auf die quantitative Zusammensetzung der Flora des Magen-Darm-Traktes der zwei Mauspopulationen wurden ergänzend immunologische Untersuchungen von Seren dieser Populationen durchgeführt.

Es wurde jeweils der IgG- und IgM-Antikörperspiegel bestimmt.

Der Antikörpergehalt im Serum wird in diesem Fall durch die Extinktion bei 450 nm als relative Größe wiedergegeben.

4.2.1 Relative IgG- und IgM-anti-LPS-Konzentrationen

Ein Schwerpunkt war die Untersuchung des relativen Antikörpergehalts gegen LPS (Endotoxin), der in direktem Zusammenhang zur Gram-negativen Keimflora steht.

Wie in den Ausführungen zu Material und Methoden bereits erwähnt, wurden drei verschiedene Formen der wichtigsten Zellwandstruktur Gram-negativer Keime, dem sog. Lipopolysaccharid (LPS), verwendet.

Gegen alle 3 Formen (Rc-;Ra-;S-Form) wurden bei der LBP^{+/+}-Gruppe signifikant höhere Extinktionswerte gemessen (siehe Tabelle 11 - 13).

Tabelle 11 - 13:

Relative IgG- und IgM-Konzentration gegen drei verschiedene LPS-Formen im Serum von LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe angegeben als Extinktion bei 450 nm

11: IgG- und IgM-anti-LPS-Rc-Form (*E. coli* J5; Sigma)

Probenverdünnung = 1/20; Konjugatverdünnung = 1/2000

Statistische Kenngrößen	IgG		IgM	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	0,16	0,31	0,25	0,44
s	0,068	0,36	0,12	0,54
s _f	0,016	0,092	0,03	0,14
x _m	0,15	0,21	0,20	0,27
n	17	15	17	15
p	< 0,05		< 0,05	

12: IgG- und IgM-anti-LPS-Ra-Form (*E. coli* EH 100; Sigma)

Probenverdünnung = 1/100; Konjugatverdünnung = 1/5000

Statistische Kenngrößen	IgG		IgM	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	0,15	0,24	0,26	0,45
s	0,075	0,16	0,15	0,28
s _f	0,018	0,04	0,036	0,073
x _m	0,12	0,20	0,18	0,33
n	17	15	17	15
p	< 0,01		< 0,01	

13: IgG- und IgM-anti-LPS-S-Form (*E. coli* O 111:B 4; Sigma)

Probenverdünnung = 1/100; Konjugatverdünnung = 1/5000

Statistische Kenngrößen	IgG		IgM	
	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}	LBP ^{-/-}	LBP ^{+/+}
ξ	0,12	0,16	0,26	0,36
s	0,043	0,044	0,12	0,11
s _f	0,011	0,011	0,030	0,027
x _m	0,12	0,15	0,22	0,32
n	17	15	17	15
p	< 0,05		< 0,05	

ξ = arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung; s_f = Standardfehler des Mittelwertes; x_m = Median; n = Gruppengröße; p = Signifikanzniveau

4.2.2 Relative IgG- und IgM-anti-Peptidoglykan-Konzentrationen

Im Vergleich zu den Anti-LPS-Antikörperspiegeln wurde der Antikörpergehalt im Serum gegen Peptidoglykan des Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* untersucht.

Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

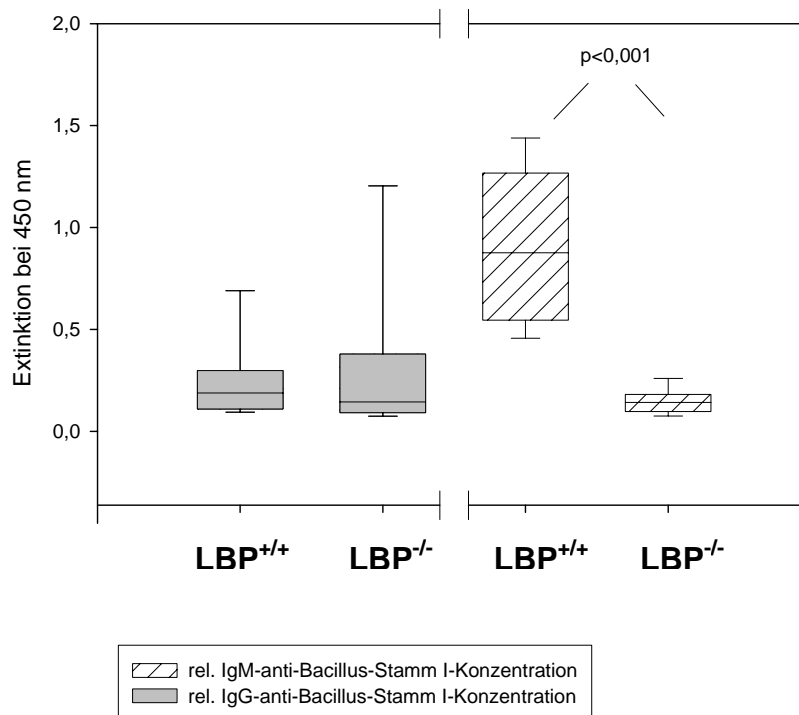
4.2.3 Relative IgG- und IgM-anti-*Bacillus-coagulans*-Stamm I – Konzentrationen

Nach Feststellung der Unterschiede im Vorkommen der isolierten *Bacillus coagulans*-Stämme I und II wurde auch der Antikörperspiegel gegen Bestandteile dieser beiden Stämme (Extraktantigen, siehe Material und Methoden) untersucht.

In Bezug auf die relative IgG-anti-*Bacillus-coagulans*-Stamm I-Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Populationen festgestellt werden. Jedoch besteht ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) bei der Auswertung der relativen IgM-Konzentrationen. Hier wurden höhere Extinktionswerte in der LBP^{+/+}-Gruppe gemessen (siehe Grafik 1).

Grafik 1:

Relative IgG- und IgM-anti-Bacillus-Stamm I-Konzentration
(angegeben als Extinktionswert bei 450 nm)

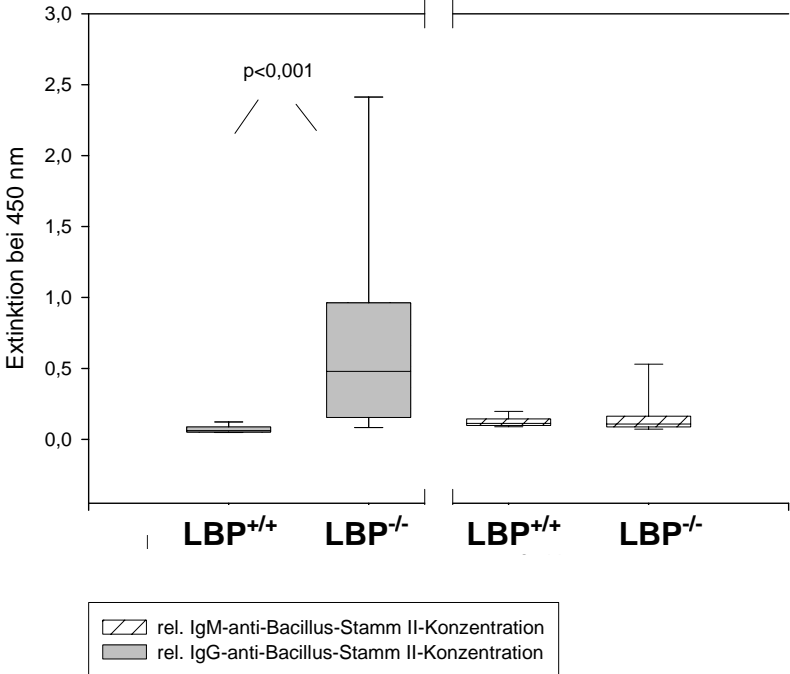


4.2.4 Relative IgG- und IgM-anti-*Bacillus-coagulans*-Stamm II – Konzentrationen

Bei der Untersuchung der relativen IgG-Konzentrationen gegenüber Bestandteilen des *Bacillus-coagulans*-Stammes II konnte ein signifikant höherer Extinktionswert bei der LBP^{-/-}-Gruppe festgestellt werden. Bei der Untersuchung der relativen IgM-Konzentrationen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Grafik 2).

Grafik 2:

Relative IgG - und IgM - anti - Bacillus - Stamm II - Konzentration
(angegeben als Extinktionswert bei 450 nm)



5 Diskussion

5.1 Material

5.2.3 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten gendeletierten Mäuse ($LBP^{-/-}$) wurden bisher nur bei In-vivo-Untersuchungen genutzt, um die Zusammenhänge zwischen LPS und der Akute-Phase-Reaktion des Organismus während einer Infektion zu analysieren.

In den Arbeiten verschiedener Autoren wurden dabei sehr kontroverse Ergebnisse erzielt (WURFEL et al., 1997; JACK et al., 1997).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wird der mögliche Einfluss der LBP-Deletion auf die Normalflora des MDT von klinisch gesunden Mäusen untersucht.

Es liegen bis dato keine ähnlichen veröffentlichten Daten über die Verwendung von $LBP^{-/-}$ -Mäusen zur Untersuchung des Einflusses des LBP auf die Normalflora vor.

5.2.4 Probenmaterial

Bei der Beurteilung der erzielten Ergebnisse bezüglich der ermittelten Gesamtkeimzahlen bzw. der Keimzahlen einzelner Bakteriengruppen, muss das verwendete Ausgangsmaterial eindeutig definiert werden.

Auf diese Zusammenhänge wiesen bereits HARRIS et al. (1976) in ihrer Arbeit hin.

Durch die Verwendung von Darminhaltsproben in den hier durchgeführten Untersuchungen werden Bakteriengruppen, welche stark mit der Darmwand bzw. der Mukusschicht des Darmes assoziiert sind, in den ermittelten Keimzahlen nur teilweise bzw. gar nicht berücksichtigt.

HARRIS et al. (1976) stellten außerdem Unterschiede zwischen über mikroskopische Zählungen in Ausstrichen ermittelten Keimzahlen und den tatsächlich durch Kultivierung ermittelten Keimzahlen fest. Es wurden mehrere Hypothesen (auch im Zusammenhang mit Ergebnissen anderer Autoren) für diese deutlichen Abweichungen aufgestellt.

1. Einige der mikroskopisch festzustellenden spiralförmigen Bakterien können selten unter In-vitro-Bedingungen kultiviert werden (GORDON und DUBOS 1970; SAVAGE et al. 1971).
2. Andere mikroskopisch sichtbare Bakterien sind wahrscheinlich nicht mehr in der Lage sich zu vermehren (engl. viable but nonculturable bacteria).
3. Das zur Anzüchtung verwendete Medium bietet für die jeweilige Bakteriengruppe nicht die nötigen speziellen Nährstoffe, z. B. Fettsäuren bei bestimmten Anaerobiern (CALDWELL und BRYANT 1966; HOLDEMAN und MOORE (eds.) 1972).
4. Aufgrund einer kurzzeitigen Sauerstoffexposition während der Kultivierungsvorgänge, sterben viele der hochempfindlichen strikten Anaerobier (LEE et al. 1968; KOOPMAN und KENNIS, 1977, 1979).

5.3 Methoden

5.3.3 Transport und Lagerung

LEE et al. (1968, 1970) und KOOPMAN und KENNIS (1979) nahmen in ihren Versuchen die Evisceration der Mäuse direkt in der Glove Box vor. Damit wurde zur optimalen In-vitro-Kultivierung der strikten Anaerobier ein kontinuierliches anaerobes Milieu geschaffen. Trotz Schaffung optimaler Bedingungen, ob durch Glove-Box oder Anaerobiertöpfe, ist es nicht möglich alle Keime zu kultivieren. Gründe dafür wurden bereits im vorgenannten Abschnitt erläutert.

Die Tötung der Mäuse und die Gewinnung der Proben in den hier vorgestellten Untersuchungen erfolgte in Greifswald unter aeroben Bedingungen, wobei zur Erhaltung eines anaeroben Milieus die ohne Zeitverzug in Einfriermedium eingebrachten Proben sofort mit Paraffin überschichtet, auf Trockeneis transportiert und bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren wurden (siehe Material und Methoden).

Durch diese Vorgehensweise wurde versucht, die unter Punkt 4 im vorhergehenden Abschnitt genannte Problematik zu berücksichtigen.

5.2.2 Nährböden/Differenzierung

Um eine möglichst genaue Untersuchung der MDF durchführen zu können, haben sich neben dem Kulturansatz, die Techniken der Molekularbiologie, der Fluoreszenzmessung und der Immunologie bewährt. Die zuerst genannte Variante wird jedoch noch häufig in den meisten Flora-Studien angewandt.

Da die Mikroflora des MDT eines der komplexesten Systeme in unserer Umwelt darstellt, treten bei der Isolierung einzelner Bakteriengruppen Probleme wie Kontamination, Schwärmen und damit Überwachsen anderer Kolonien, und bezüglich der DNA-Techniken, Kreuz-Hybridisierung auf.

Deshalb kommen immer wieder Selektivmedien zur Isolierung einzelner Bakteriengruppen zum Einsatz. Diese Selektivmedien wurden jedoch in den meisten Fällen nicht für die Kultivierung der Bakterien der Fäkalflora entwickelt (PACHER und KNEIFEL 1996). Dadurch sind inzwischen eine große Vielzahl verschiedener Selektivmedien in Studien zur Untersuchungen der Fäkalflora zum Einsatz gekommen. Beispiele dafür mit entsprechenden Literaturangaben, werden in den jeweils die Bakteriengruppe beschreibenden Absätzen gegeben.

5.3. Mikrobiologische Untersuchungen

5.3.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Die Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl bei der Untersuchung der MDF von Mäusen wird nur von wenigen Autoren vorgenommen und in der Literatur angegeben. In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte die aerobe Gesamtkeimzahl jedoch als wertvoller Summenparameter erkannt werden. Nur durch diese Form der Keimzahlbestimmung konnten morphologische Unterschiede und Besonderheiten, insbesondere bei dem später ausdifferenzierten *Bacillus coagulans*, festgestellt werden.

Konkrete Werte für die aerobe Gesamtkeimzahl können nur über die Untersuchungen von KLEEßEN und JACOBASCH (2002) und ROSZKOWSKI et al. (1988) angegeben werden.

Dabei sind die bei den erstgenannten Autoren verwendeten Nährböden unbekannt und ROSZKOWSKI et al. (1988) verwendeten Blut-Agar und Endo-Agar. Andere Autoren, wie DUBOS et al. (1965) und ITOH et al. (1983), geben getrennte Keimzahlen für aerob wachsende Keimgruppen, z. B. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp., an. Dabei kommen Selektivnährböden für die speziellen Bakterienspezies zum Einsatz.

Bei den hier vorgenommenen Untersuchungen zur aeroben Gesamtkeimzahl kam zum einen Nähr-Agar, zur Anzucht wenig anspruchsvoller Keime (LAPAGE et al. 1970), und zum anderen Blut-Agar, zur Anzucht auch anspruchsvoller aerober Keime (FACKLAM 1980), zum Einsatz.

Die Verwendung von Blut-Agar konnte in diesem Fall als vorteilhaft beurteilt werden. Die als *Bacillus coagulans* identifizierten Stämme zeigten nur auf Blut-Agar ihr typisches Wachstums- und Hämolyseverhalten. Die Identifizierung erfolgte mit dem bereits von HOA et al. (2000) verwendeten API 50 CH.

Die Untersuchung der ubiquitär vorkommenden aeroben Sporenbildner beschränkte sich bis dato, wie z. B. bei HARRIS und FIELDS (1972), auf die Isolation aus Bodenproben und Wasser. Zusätzlich existieren Untersuchungen zur pathogenen Wirkung von Vertretern dieser Genera bei Säugetieren (BERG et al. 1979; ROWAN et al. 2003) und zur Bedeutung als Lebensmittelvergifter (FOSTER 1978; MCKILLIP 2000). Da Mitglieder des Genus *Bacillus* auch als Probiotika im Gespräch sind (NICHOLSON 2002), werden regelmäßig Untersuchungen zur Wirkung bzw. Reisolation von *Bacillus* spp. durchgeführt (HOA et al. 2000).

Der Isolation und Untersuchung von Sporenbildnern aus der Normalflora des MDT wurde bis jetzt jedoch nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet. GORDON und DUBOS (1970) konnten sporenbildende Bakterien in der Größenordnung von 10^{7-8} Organismen/g Zäkumhomogenat isolieren und gehen davon aus, dass Sporenbildner im MDT von Mäusen zur Normalflora gehören.

Auffällig war bei den hier untersuchten Mäusen jedoch, dass zwei unterschiedliche Formen des als *Bacillus coagulans* identifizierten Mikroorganismus isoliert werden konnten.

Eine Form konnte fast ausschließlich nur bei der LBP^{-/-}-Gruppe gefunden werden. Inwieweit diese zwei Formen sich außer in der Koloniemorphologie und dem Hämolyseverhalten unterscheiden, ist hier nicht untersucht worden. Aufgrund der vielfältigen biochemischen Stoffwechselleistungen der *Bacillus* spp. (HOA et al. 2000) sind zwei unterschiedliche Biovare möglich. Ob diese aufgrund der Gendeletion und durch das Fehlen des Einflusses von LBP eine unterschiedliche Merkmalsausprägung ausgebildet haben und inwieweit dies Konsequenzen für den Organismus hat, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Bemerkenswert ist, dass bei Untersuchung zur Erkennung von Bakterienstrukturen unter der Verwendung von *Bacillus subtilis* eine LBP- abhängige Reaktion festgestellt werden konnte (FAN et al. 1999).

Aufgrund der hier genannten Ergebnisse läßt sich vermuten, dass die Gendeletion weitere Konsequenzen haben könnte, welche nicht nur das Immunsystem betreffen.

Die eigentlichen in der Literatur als sporenbildende Bakterien bezeichneten Mikroorganismen wurden meist im Zusammenhang von Untersuchungen der anaeroben MDF von Mäusen isoliert. Dabei war die Untersuchung des Genus *Clostridium* Hauptschwerpunkt, wie aus mehreren Arbeiten ersichtlich wird (ITOH et al. 1983; ROSKOWSKI et al. 1988; MARCOTTE und LAVOIE 1996). Wie bereits ITOH et al. (1983) feststellten, konnte auch in den hier vorgestellten Untersuchungen kein *Cl. perfringens* isoliert werden. Während der Untersuchungen zur Gram-negativen anaeroben Gesamtkeimzahl konnten vereinzelt *Cl. clostridiiforme* isoliert werden, welche jedoch nicht quantitativ erfasst wurden.

5.3.2 Aerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl

Zur Bestimmung der Gram-negativen Gesamtkeimzahl wurden in den hier vorliegenden Untersuchungen die Verdünnungen parallel auf zwei Nährböden angesetzt. Beide Nährböden sind speziell für die Anzucht coliformer Keime und Laktose-negativer Keime (MacConkey-Agar) und für die Anzucht von *Enterobacteriaceae* (Gassner-Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar) vorgesehen.

Für die Isolierung der zuletzt genannten Bakteriengruppen steht eine Vielzahl selektiver Nährböden zur Verfügung. So empfehlen BARON et al. (1992) und ADAMI und CAVAZZONI (1996) zur Isolierung fäkaler coliformer Keime MacConkey- und Eosin-Methylenblau-Agar.

Bei 17 Darminhaltsproben der in dieser Studie untersuchten 120 Darminhaltsproben konnten Gram-negative Aerobier isoliert werden. Dabei waren bei 11 von 120 Proben auf beiden Nährböden ein Wachstum sichtbar. Bei 4 Proben konnte nur auf dem Gassner-Agar und bei 2 Proben nur auf dem MacConkey-Agar Kolonien Gram-negativer Bakterien kultiviert werden. Damit konnten keine Unterschiede in der Selektivität beider Nährböden in diesem Versuch festgestellt werden.

Die Anzahl der aus der Mikroflora isolierten *Enterobacteriaceae*, welche den größten Teil der aeroben Gram-negativen Flora ausmachen, wird in unterschiedlichen Größenordnungen angegeben.

So fanden ITOH et al. (1983) in Fäzes von konventionell gehaltenen BALB/c-Mäusen lg 3,3 *Enterobacteriaceae*, bei SPF-Mäusen der gleichen Kolonie lag der Wert bei lg 5,9. KLEEBEN und JACOBASCH (2002) konnten lg 7,5 *Enterobacteriaceae* aus den Fäzes konventionell gehaltener BALB/c-Mäuse isolieren. Einen ähnlich hohen Wert (lg 7,3) aus Fäzes von SPF-BALB/c-Mäusen konnte FUKUSHIMA et al. (1999) erzielen. Entscheidend bei der Anzahl der *Enterobacteriaceae* ist außerdem die Herkunft der zu untersuchenden Tiere.

Mehrere Autoren konnten extreme Unterschiede in der Zahl der *Enterobacteriaceae* zwischen verschiedenen Züchtern feststellen (DUBOS et al. 1965; HIRAYAMA et al. 1990).

In den hier vorliegenden Untersuchung konnten Keimzahlen zwischen lg 1,7 und lg 4,1 bei Tieren der gleichen Zuchtkolonie ermittelt werden (siehe Tabelle 7, S. 55). Diese Ergebnisse stimmen mit den von HIRAYAMA (1990) für Darminhalt und mit den von ITOH et al. (1983) für Fäzes von BALB/c-Mäusen ermittelten Werten überein.

Das auffälligste Resultat dieser Untersuchungen ist das fast vollständige Fehlen der Gram-negativen aerob lebenden Mikroorganismen bei den gendeletierten (LBP^{-/-}) BALB/c-Mäusen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass LBP einen starken Einfluss auf die Besiedlung des MDT von Mäusen mit Gram-negativen Aerobiern besitzt.

Da in den qualitativen Voruntersuchungen bei der LBP^{-/-}-Gruppe nur *E. coli* mit einer feucht-glänzenden, auseinanderlaufenden Kulturmorphologie isoliert werden konnten, bei der LBP^{+/+}- Gruppe beide Varianten, also auch eine Form mit eng begrenzten Kolonierändern vorlag, kann hierbei ein selektierender Effekt der Gendeletion des LBP vermutet werden.

Dabei muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass eine Stammselektion auch ein Ergebnis der Einflüsse anderer Mitglieder des Ökosystems sein kann (siehe auch Kapitel 2.3.3). So wäre z. B. ein Einfluss der bei beiden Gruppen in unterschiedlicher Anzahl isolierten *B. coagulans*-Stämme möglich.

Die bei den qualitativen Voruntersuchungen erfassten Abweichungen der Genausstattung der *E. coli* betreffen das Gen *astA*, welches die DNA-Sequenz für eine enteroaggregative Komponente (EAST1-Toxin) beinhaltet. Dieses Gen konnte bei Untersuchungen von 358 *Enterobacteriaceae*-Stämmen in hoher Anzahl bei *E. coli* der EHEC-Gruppe und bei fünf von Lebensmitteln isolierten *Salmonella*-Stämmen isoliert werden. Dieses Gen wurde jedoch auch bei *E. coli*-Stämmen, welche keine bekannten Virulenzgene enthielten, gefunden (PAIVA DE SOUSA und DUBREUIL 2001).

Da dieses Gen bei den von der LBP^{-/-}-Gruppe isolierten *E. coli*-Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte, ist das Vorhandensein bzw. die Expression des Gens möglicherweise nicht zwingend erforderlich für die Besiedlung des MDT von LBP^{-/-}-Mäusen oder gerade das Vorhandensein/Expression würden eine Besiedlung des MDT der LBP-defizienten Tiere unmöglich machen. Ob diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den hier vorgenommenen Untersuchungen stehen, müsste über gesonderte, spezifizierte Studien herausgefunden werden.

5.3.3 Anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl

Auch zur Kultivierung strikt anaerober Bakterien findet eine Vielzahl unterschiedlicher Selektivnährböden Verwendung.

SUMMANEN et al. (1993) benutzten Brucella-Blut-(BB)-Agar, ROBERTS et al. (1992) verwendeten Brain-Heart-Infusion-Blood-Agar,

bei BARTRAM et al. (1994) kam Columbia-Blut-Agar zum Einsatz und MITSUOKA et al. (1973) setzten Eggert-Gagnon-Agar ein.

HARTEMINK und ROMBOUITS (1999) verglichen neun verschiedene Nährböden zur Kultivierung strikter Anaerobier aus Fäzes. Der auch im vorliegenden Versuch verwendete Columbia-Blut-Agar wurde als gut geeignet für die Kultivierung anaerober Bakterien aus Fäkalproben verschiedener Tierarten befunden.

Kriterien für die Beurteilung der Nährböden waren die Höhe der Koloniezahlen, die Größe der Kolonien und die auftretenden Morphologieabweichungen.

Wichtig für die Kultivierung strikter Anaerobier ist außerdem ein sauerstoffarmes Anzüchtungsmilieu sowie die Vorreduzierung der Platten, um das Oxidations-Potenzial im Agar niedrig zu halten (KOOPMAN und KENNIS 1979; LEE et al. 1968,1970).

Zur selektiven Kultivierung Gram-negativer Anaerobier wurde in diesem Fall, wie von HOLDEMAN et. al. (1977) beschrieben, Vancomycin und Gentamicin zugesetzt.

Zusätzlich zu diesen Maßnahmen, erwies sich die laborinterne Empfehlung des Mikrobiologischen Instituts der Universität Leipzig zur Mitführung einer parallel angesetzten Blutplatte, welche mikroaerob bebrütet wurde, als vorteilhaft. Durch eine Zählung nach Kulturmorphologie und über den Ausschluß der auf der mikroaerob bebrüteten Platte gewachsenen Kulturen, konnten multiresistente Kokken von der Zählung ausgeschlossen werden.

Über das Auftreten dieser Kokken, welche ihre Toleranz gegenüber Sauerstoff bei mehrmaliger Passage erhöhen können, berichten bereits DUBOS et al. (1965).

Aufgrund der in diesen Untersuchungen mit Hilfe des auch von MARCOTTE und LAVOIE (1996) verwendeten Rapid ID 32A (bioMérieux) vorgenommenen Differenzierung konnten die isolierten Gram-negativen Mikroorganismen den Genera *Bacteroides* und *Prevotella* zugeordnet werden.

Da die von SHAH und COLLINS (1990) beschriebene Neueinteilung des Genus *Bacteroides* mit Schaffung der Genera *Prevotella* und *Porphyromonas* im gleichen Jahr stattfand wie die Untersuchungen zur MDF von Mäusen durch HIRAYAMA et al. (1990), kann davon ausgegangen werden,

dass die von zuletzt genanntem Autor für *Bacteroides* spp. ermittelten Keimzahlen, die Keimzahlen für *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp. zusammengefasst darstellen.

Werden die in diesen Untersuchungen ermittelten Keimzahlen denen von HIRAYAMA et al. (1990) für von verschiedenen Züchtern stammenden BALB/c-Mausstämmen ermittelten *Bacteroides*-Keimzahlen (lg 9,2 – lg 10,1) gegenübergestellt, wird ein Unterschied von fast drei Zehnerpotenzen deutlich.

Es kommen mehrere Ursachen für diesen sehr großen Unterschied in den ermittelten Werten in Frage:

1. das zur Anzucht verwendete Medium enthielt nicht die für die jeweilige Bakteriengruppe speziellen Nährstoffe, z. B. Fettsäuren (CALDWELL und BRYANT 1966; HOLDEMAN und MOORE (eds.) 1972),
2. der Zusatz und die Art der verwendeten Antibiotika zur Hemmung der Begleitkeimflora kann das Wachstum des Zielorganismus beeinflussen,
3. die mögliche Beeinflussung der Keimzahl durch den Einfrierprozess.

Innerhalb der hier vorgenommenen Untersuchungen wurden die Proben sowohl der LBP^{+/+}- als auch der LBP^{-/-}-Gruppe zu jedem Zeitpunkt gleich behandelt und es wurden dieselben Nährböden und Reagenzien verwendet.

Es ist jedoch ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Gram-negativen anaeroben Gesamtkeimzahl beider Gruppen erkennbar. Ähnlich den Ergebnissen zur Gram-negativen aeroben Gesamtkeimzahl, konnten wesentlich weniger Gram-negative anaerob lebende Mikroorganismen bei der LBP^{-/-}-Gruppe, also den gendeletierten Mäusen, erfasst werden.

Bei den hier vorgenommenen Studien konnten keine *Fusobacterium* spp., welche die zweite große Gruppe der Gram-negativen anaerob lebenden Bakterien darstellt, isoliert werden. Ursache könnte die von OKADA et al. (1999) beschriebene erhöhte Affinität von *Fusobacterium* spp. an murine Epithelzellen sein. Diese Bakteriengruppe ist stark mit der Mukosa von Mäusen assoziiert.

Bei Untersuchungen homogener Darmabschnitte konnten Fusobakterien als Teil der Normalflora bis zu lg 9 KbE/g isoliert werden (LEE et al. 1968).

Das hier verwendete Probenmaterial besteht jedoch aus Darminhaltsproben. Die Mukusschicht bzw. das Epithel wurden nicht in die Untersuchungen miteinbezogen.

In Abklatschpräparaten einzelner Darmabschnitte sind Gram-negative und Grampositive bzw. Gram-labile fusiforme Bakterien sichtbar (Abbildung 4). Dabei könnten die Gram-negativen Bakterien der Spezies *Fusobacterium* spp. angehören. Bei den Gram-positiven und Gram-labilen Bakterien könnte es sich um die von DAVIES und SAVAGE (1974) beschriebenen segmentierten, fadenförmigen Mikroorganismen handeln. Diese eng mit der Darmwand assoziierten, in unterschiedlicher Besiedlungsdichte im gesamten Darm von Mäusen nachweisbaren Mikroorganismen (DAVIS und SAVAGE 1974; KOOPMAN et al. 1987), konnten bis jetzt nur über die lichtmikroskopische Untersuchung von Abklatschpräparaten und die elektronenmikroskopische Untersuchung von entnommenen Darmabschnitten nachgewiesen werden (DAVIS und SAVAGE 1974; KOOPMAN et al. 1987; KLAASEN et al. 1992). Eine Kultivierung ist bis jetzt nicht gelungen.

Durch Fosterversuche konnte nachgewiesen werden, dass, ähnlich wie bei anderen Bakteriengruppen (siehe Abschnitt 2.1.2.1), eine genetische Prädisposition zur Besiedlung mit diesen Mikroorganismen besteht (KLAASEN et al. 1992).

Wie schon bei der Gruppe der Gram-negativen Aerobier lässt sich bezüglich der Anzahl Gram-negativer Anaerobier ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Untersuchungsgruppen feststellen, wobei beide Bakteriengruppen bei der LBP^{-/-}-Gruppe in wesentlich geringerer Anzahl vorlagen. Dadurch lässt sich auch bezüglich der Gram-negativen Anaerobier eine wesentliche Beeinflussung der Ansiedlung dieser Keime durch das LBP vermuten.

5.3.4 Keimzahl auf MRS-Agar

Der hier verwendete MRS-Agar entspricht nach DIN 10109 und § 35 des LMBG den Kriterien zur Isolation von Laktobazillen aus Fleisch, Milch und Molkereiprodukten (Anonymus).

Zur Isolation von Laktobazillen aus Fäzes wurden von NORIN et al. (1991) LAB-Agar, von HARTEMINK et al. (1997) LAMVAB-Medium und von MITSUOKA et al. (1973) LBS-Agar, MRS-Agar und Rogosa-Agar verwendet.

Der MRS-Agar wird als nicht selektiv bezeichnet, da keine speziellen Kohlenhydratquellen und/oder bestimmte Bakteriengruppen ausschließende Substanzen sowie Antibiotika zugesetzt werden.

Auf diesem Nährboden wachsen neben *Lactobacillus* spp. auch Spezies der Genera *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* sowie *Bifidobacterium*. Über das Bebrütungsmilieu (mikroaerophil bzw. anaerob) und den pH-Wert kann die Selektivität gegenüber den oben genannten Bakteriengruppen erhöht werden.

Es konnten keine Bakterien der Gattung *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* bei diesen Untersuchungen nachgewiesen werden.

Die bei diesen Untersuchungen auf MRS-Agar isolierten Mikroorganismen gehören ausschließlich dem Genus *Lactobacillus* an. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe des API 50 CH (bioMérieux).

Zu beachten war dabei die Temperaturabhängigkeit der erfolgreichen Identifizierung, welche bei *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (die hier als weiße Kolonien beschrieben wurden) z. B. 37 °C beträgt (NIGATU et al., 2000).

Die in diesen Untersuchungen festgestellte Keimzahl der Laktobazillenspezies, welche zwischen lg 6,79 KbE/g Darminhalt im Jejunum und lg 8,27 KbE/g Darminhalt im Kolon schwankt (siehe Tabelle 9), entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten.

HIRAYAMA et al. (1990) isolierten abhängig vom Mausstamm lg 8,6 – lg 9,1 Bakterien/g Zäkuminhalt. Teilweise niedrigere bzw. ähnliche Werte erzielten ROSZKOWSKI et al. (1988) mit lg 8,3 /g Fäzes und MARCOTTE und LAVOIE (1996) mit lg 5,5/g Fäzes. Dabei muss beim Vergleich dieser Zahlen die unterschiedliche Herkunft der Proben (verschiedene Mausstämme) und die Verwendung von Fäzes bei den zwei zuletzt genannten Autoren beachtet werden.

Weitere Einflussfaktoren für die Anzahl der isolierten Laktobazillen sind die Diätzusammensetzung (DUBOS und SCHAEGLER 1962; TANNOCK und SAVAGE 1974;) und der Umweltstress (TANNOCK und SAVAGE 1974).

Desweiteren spielen die Aufzuchtbedingungen bei der Besiedlung mit Laktobazillen eine wesentliche Rolle (SCHAEGLER und DUBOS 1962).

Obwohl in diesen Untersuchungen beide Mausstämme, sowohl die LBP^{-/-}- als auch die LBP^{+/+}-Gruppe unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden, vom selben Stamm abstammen, dieselben Futtermittel erhielten und die Proben immer unter den gleichen Bedingungen untersucht wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die Keimzahl der hier isolierten Laktobazillen war bei der LBP^{+/+}-Gruppe im Zäkum und Kolon signifikant höher als in der LBP^{-/-}-Gruppe.

Dieses Ergebnis wurde auch beim direkten Vergleich der zwei isolierten Laktobazillen-Stämme innerhalb der Gruppen bei dem als *Lactobacillus fermentum* identifizierten Stamm erzielt. Bezüglich dieses Mikroorganismus ist dieser Unterschied auch im Jejunum sichtbar.

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen werden immer wieder signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Normalflora zwischen LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe deutlich. Bei der LBP^{-/-}-Gruppe sind sowohl Gram-negative Aerobier als auch Gram-negative Anaerobier in signifikant geringeren Zahlen als aus den Darminhaltsproben der LBP^{+/+}-Gruppe isoliert worden. Das gleiche gilt für die isolierten Laktobazillen, insbesondere *Lactobacillus fermentum*.

Der Gram-positive Sporenbildner *Bacillus coagulans*-Stamm II ist dagegen signifikant häufiger bei der LBP^{-/-}-Gruppe als bei der LBP^{+/+}-Gruppe zu finden.

Sowohl die Lebensbedingungen als auch die Untersuchungsbedingungen der Proben beider Gruppen waren aber identisch. Daten nicht veröffentlichter Voruntersuchungen zeigen ähnlich signifikante Zahlen.

Damit scheint die Gendeletion, und damit die Nichtexpression des Proteins LBP, als einziger Unterschied zwischen den Gruppen einen wesentlichen entweder direkten oder möglicherweise indirekten Einfluss auf die Zusammensetzung und die Höhe einiger Keimzahlen der Magen-Darm-Flora bei LBP^{-/-}- Mäusen zu haben. Dabei wäre eine indirekte Einflussnahme über veränderte Wechselwirkungen bestimmter Bakteriengruppen untereinander oder eventuell über eine Modifizierung anderer Proteine durch das Fehlen von LBP denkbar.

Auch die Mechanismen des zeitlichen Ablaufs der Besiedlung könnten durch die Gendeletion stark beeinträchtigt werden.

TANNOCK und SAVAGE (1974) bewiesen, dass bedeutende Anaerobiergruppen nicht in der Lage waren, bestimmte Abschnitte des Darmes zu kolonisieren, da das Redox-Potential des Darmes nicht durch die Stoffwechselfvorgänge der Aerobier abgesenkt worden war.

Ähnliche Ergebnisse erzielten LEE et al. (1970) bei Untersuchungen der zeitlichen Besiedlung des MDT von Mäusen.

Die aerob wachsenden coliformen Keime stiegen ab dem 10. Tag nach der Geburt innerhalb von 6 Tagen auf Werte bis zu 10^8 /g Zäkum-Homogenat an, um bis zum Ende des Experiments (Tag 32) wieder auf Werte um 10^5 /g Zäkum-Homogenat herabzusinken.

Die anaerob wachsenden *Bacteroides* spp. vermehrten sich erst ab dem 14. Tag, wobei die Anzahl schnell auf 10^{10} /g Zäkum-Homogenat zunahm. Dieses Niveau wurde bis zum Ende des Experiments gehalten.

Ähnlich verhält es sich mit den später als fusiforme Bakterien identifizierten Mikroorganismen.

Würde also die vorherige Herabsetzung des Oxidationspotenzials durch aerob wachsende Mikroorganismen wie z. B. *E. coli* im MDT nicht stattfinden, wäre die Ansiedlung sogenannter Anaerobier, wie z. B. *Bacteroides* spp., negativ beeinflusst.

Obwohl *Lactobacillus* spp. immer zu den anaerob lebenden Mikroorganismen des MDT gezählt werden, gibt es bezüglich des Besiedlungsverhaltens wesentliche Unterschiede zu anderen Anaerobiern des MDT. Ab dem 2. Tag nach der Geburt stieg die Anzahl der *Lactobacillus* spp. auf bis zu 10^9 /g Zäkum-Homogenat, um auf diesem Niveau bis zum Ende des Experiments zu bleiben (LEE et al. 1970).

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die fehlende Herabsetzung des Redoxpotentials als isoliertes Geschehen mit großer Wahrscheinlichkeit nur einen geringen Einflussfaktor für die Besiedlung des MDT darstellen würde. Nicht zu unterschätzende Einflussfaktoren sind auch die fehlenden Stoffwechselprodukte bestimmter Keimgruppen (z.B. von *E.coli*), wie z.B. Vitamin K oder antibakterielle Substanzen.

Dazu kommen noch mehrere andere Einflussfaktoren, welche im Zusammenhang mit den serologischen Untersuchungen erläutert werden.

5.4 Serologische Untersuchungen

Aufgrund der im Laufe dieser Untersuchungen festgestellten signifikanten Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der MDF, erfolgte eine Untersuchung von Sera, welche von Mäusen entnommen wurden, die unter gleichen Bedingungen und Örtlichkeiten gehalten wurden. Ziel war es festzustellen, ob sich die Unterschiede bezüglich der MDF auch in den relativen Konzentrationen der Immunglobulinfraktionen widerspiegeln würden. Dabei wurde als Schwerpunkt die systemische humorale Immunantwort mit den Immunglobulinklassen IgG und IgM untersucht.

Zu den ersten Immunglobulinen, welche im Zuge einer humoralen Immunantwort gebildet werden, gehört das IgM. Sie werden noch vor der somatischen Hypermutation der B-Zellen zur Plasmazelle gebildet. Die frühen Immunglobuline besitzen keine starke Affinität gegenüber dem Antigen. Dieser Mangel kann über die Bildung eines Pentamers ausgeglichen werden. Ziel der frühzeitigen Bindung an das Antigen ist die schnellstmögliche Aktivierung des Komplementsystems zur effektiven Erstabwehr von Pathogenen (JANEWAY et al., 1967; BURTON, 1990). Aufgrund der Größe des Moleküls ist der Hauptfunktionsort das Blut. Bei massiven Entzündungen, bei der die Permeabilität der Gefäße steigt, können auch diese großen Moleküle zum Ort der Infektion gelangen.

Die zweite untersuchte Immunglobulinklasse sind die als Immunglobulin G bezeichneten Proteine. Diese noch in Untergruppen aufgeteilte Gruppe der Immunglobuline ist hauptsächlich für die Opsonierung der Pathogene für die anschließende Aufnahme durch Phagozyten verantwortlich und aktivieren das Komplementsystem ebenfalls, wenn auch in abgeschwächter Form (JANEWAY et al. 1967; BURTON 1990).

Sie bilden die größte Fraktion der im Blut vorkommenden Immunglobuline und sind aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage, schnell zum Ort der Infektion zu gelangen. Da zu ihrer Bildung eine Hypermutation von B-Zellen zu Plasmazellen nötig ist, steigt die Menge an IgG im Blut erst in einer späteren Phase der Infektion.

Wie bereits im Abschnitt 2.3.4 beschrieben, findet eine ständige Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit seiner Umwelt und damit auch seiner Normalflora im Darm statt. Dabei unterscheiden sich die Mechanismen, welche gegenüber potenziellen Pathogenen wirken, nicht wesentlich von denen, welche die Normalflora des Darmes registrieren und kontrollieren.

Das Antigen wird durch Endozytose von den auf der Oberfläche der Peyerschen Platten lokalisierten M-Zellen aufgenommen, transportiert und an dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen weitergegeben (OWEN 1977; WOLF et al. 1981; KUCHARZIK et al. 2000). VAN DER WAAIJ et al. (2003) vermuten zwei eher indirekte Mechanismen der Interaktion zwischen Wirt und seiner Normalflora, zum Einen die Erkennung luminal lokalisierter Bakterien durch M-Zellen und zum anderen die Diffusion löslicher bakterieller Signalstoffe durch die gröÙenselektive Mukusschicht auf den Epithelzellen.

Über mehrere verschiedene Reaktionskaskaden entstehen dann unterschiedliche Immunglobulinklassen, welche im Blut oder beispielsweise lokal auf Schleimhäuten die humorale Immunabwehr darstellen (RUDZIK et al. 1975; JACKSON et al. 1981; SALMI und JALKANEN 1991).

Die daraus entstandenen spezifischen Antikörper verhindern die Anheftung von Bakterien und Viren an das Darmepithel und verhindern somit eine systemische Invasion durch diese Mikroorganismen (SVANBORG und SVENNERHOLM 1978; RENEGAR und SMALL 1991; WINNER et al. 1991; SVANBORG 1994).

Sie stellen jedoch auch ein Abwehrreservoir für spätere Invasionen dar. Mikroorganismen mit ähnlichen Strukturen werden bei erneutem Kontakt schneller erkannt und effektiv abgewehrt.

Aufgrund der in den vorhergehenden Teilen der Untersuchung erzielten Ergebnisse wurde gezielt nach Antikörpern gegenüber verschiedenen Varianten des Lipopolysaccharids Gram-negativer Bakterien gesucht.

Die Ergebnisse bestätigen die bei den mikrobiologischen Untersuchungen bezüglich der Gram-negativen Bakterien festgestellten signifikanten Unterschiede zwischen LBP^{-/-}- und LBP^{+/+}-Gruppe .

Dabei hat die LBP^{+/+}-Gruppe, welche signifikant höhere Keimzahlen Gram-negativer Mikroorganismen besitzt, auch einen signifikant höheren Antikörperspiegel (sowohl IgM als auch IgG) gegenüber dem LPS Gram-negativer Bakterien.

Das Lipopolysaccharid der sowohl aerob als auch anaerob lebenden Gram-negativen Bakterien besteht aus drei wesentlichen Bestandteilen: aus der in der äußeren Zellmembran lokalisierten Lipid A-Struktur, der Kernregion (engl. Core) und einer unterschiedlich langen Polysaccharidkette. Die Zusammensetzung und Länge dieser Kette und (damit die Größe des gesamten LPS) hängt von der jeweiligen Bakterienspezies und verschiedenen Einflussfaktoren wie z. B. Umweltstress ab. Je kürzer die Polysaccharidkette, desto stärker werden konservierte Bereiche des LPS (v.a. Lipid A) präsentiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den 3 benutzten *E. coli*-LPS-Formen jeweils das gleiche Ergebnis erzielt werden. So konnten bei der LBP^{-/-}-Gruppe signifikant weniger Antikörper gegenüber *E. coli*-LPS nachgewiesen werden.

Um eine grundlegende Veränderung (z.B. genetisch bedingt) auf der Makrophagen-Lymphozyten- Ebene (also der adaptiven Immunantwort) auszuschließen, wurden vergleichend dazu die Konzentrationen der Immunglobuline IgM und IgG gegen den Hauptbestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien, dem Peptidoglykan, bestimmt.

Beide, sowohl LPS als auch PG sind sog. Pathogen-associated molecular patterns (PAMP), welche über spezifische PRR (siehe auch Kapitel 2.3.2.1), die z. B. auf der Oberfläche von Makrophagen und Lymphozyten lokalisiert sein können, erkannt werden. Darauf folgend kann eine adaptive Immunantwort eingeleitet werden.

Wäre es aufgrund der Gendeletion zu einer grundlegenden Veränderung auf dieser adaptiven Ebene der Immunantwort gekommen, hätte die humorale Immunantwort auf PG zu ähnlich signifikanten Ergebnissen wie beim LPS führen müssen.

Obwohl ein signifikanter Unterschied zwischen der LBP^{+/+}- und LBP^{-/-}-Gruppe bezüglich der Anzahl der Laktobazillen vorliegt, konnten keine differierenden Immunglobulinspiegel gegenüber Peptidoglykan bei beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis lässt eine Universalität der Reaktion auf *E.coli*-LPS vermuten. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf das LPS anderer Gram-negativer Bakterien übertragen lassen, muss Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten werden. Weitere Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen (z.B. auch signifikant weniger Gram-negative Anaerobier bei der LBP^{-/-}-Gruppe) weisen auf evtl. ähnliche Zusammenhänge hin.

Bei der Auswertung der relativen Antikörperkonzentration gegenüber dem Extraktantigengemisch des *Bacillus-coagulans*-Stamm I, welcher in der MDF des Zäkum und Kolons beider Gruppen in etwa gleich stark vertreten ist, konnten erhöhte IgM-Titer bei der LBP^{+/+}-Gruppe ermittelt werden. Dies lässt auf eine akute, gerade erst stattgefundene, Auseinandersetzung mit dem Antigengemisch des *Bacillus-coagulans*-Stamm I bei der LBP^{+/+}-Gruppe schließen. Da bei der LBP^{-/-}-Gruppe weder das IgM noch das IgG eine relativ erhöhte Konzentration zeigt, ist zu vermuten, dass das Immunsystem der LBP^{-/-}-Gruppe entweder keine oder eine verzögerte Reaktion auf das Antigengemisch zeigt.

Gegenüber dem Extraktantigengemisch des *Bacillus-coagulans*-Stamm II, welcher in signifikant höheren Zahlen bei der LBP^{-/-}-Gruppe vorliegt, ist der Immunglobulinspiegel, konkret IgG, bei der LBP^{-/-}-Gruppe signifikant erhöht. Es hat also eine aktive Auseinandersetzung bereits stattgefunden und es wurden vermehrt IgG-Antikörper produziert.

Bei der Verwendung eines Extraktantigengemisches müssen verschiedene Bestandteile der Zellwand Gram-positiver Mikroorganismen als PAMP berücksichtigt werden.

Ein zweiter wesentlicher Bestandteil von Gram-positiven Mikroorganismen, Lipoteichonsäure, wird durch die katalysierende Wirkung von LBP neutralisiert (FROON et al. 1995). Würde dies einen selektierenden Einfluss haben, da diese Wirkung bei LBP^{-/-}-Mäusen wegfällt?

Würde eine Besiedlung mit Gram-positiven Bakterien, welche mehr Lipoteichonsäure produzieren, zu einer erhöhten Sterblichkeit führen?

Oder im Umkehrschluss, würden Bakterien mit geringer Lipoteichonsäureproduktion eine höhere Kolonisierungswahrscheinlichkeit bei LBP^{-/-}-Mäusen haben?

Da die Normalflora des MDT der LBP^{-/-}-Knock-out-Mäuse eine geringere Population an Gram-negativen Bakterien beinhaltet und der Organismus möglicherweise aufgrund des fehlenden Antigenreizes eine geringere Antikörperproduktion gegenüber den Antigenstrukturen der Gram-negativen Bakterien zeigt, sind diese Tiere theoretisch anfälliger gegenüber Infektionen durch Gram-negative Bakterien.

In Versuchen von JACK et al. (1997) konnte zum Einen festgestellt werden, dass der LBP^{+/-}-Mausstamm nach Gabe einer geringen Konzentration LPS und einer Vorsensibilisierung mit Galactosaminen relativ schnell aufgrund eines Endotoxämieschockes einging. LBP^{-/-}-Mäuse hingegen zeigten keine Schocksymptomatik und überlebten. Entscheidend dabei war das Stagnieren des TNF- α - Serumspiegels bei den LBP^{-/-}-Mäusen. Betrachtet man jedoch den zweiten Versuchsansatz, wobei eine Infektion mit vollständigen lebenden Bakterien vorgenommen wurde, zeigt sich, dass die LBP^{-/-}-Mäuse nicht in der Lage sind, diese Infektion abzuwehren und schnell versterben. Die Autoren haben keine Erklärung für die Abwehrschwäche gegenüber der Infektion. Es werden Vermutungen über Veränderung der Makrophagenaktivität bezüglich der Abgabe von Sauerstoffradikalen in der Abwesenheit von LBP geäußert.

Eine mögliche andere Ursache für diese Abwehrschwäche könnte die in den von mir hier vorgestellten Untersuchungen festgestellte veränderte Normalflora und der erniedrigte sowohl IgM- als auch IgG-Antikörperspiegel gegenüber Gram-negativen Bakterienstrukturen sein.

5.5 Schlussfolgerung

Die Magen-Darm-Flora von LBP^{-/-}-BALB/c-Knock-out-Mäusen zeigt signifikante Unterschiede bezüglich Zusammensetzung und Keimzahlen gegenüber der Magen-Darm-Flora von LBP^{+/+}-BALB/c-Mäusen.

Dabei sind Unterschiede nicht nur bezüglich der Gram-negativen Mikroflora deutlich geworden, sondern auch Differenzen bezogen auf Gram-positive Mikroorganismen aufgetreten.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist ein signifikanter Einfluss auf die Zusammensetzung der MDF durch die Gendeletion des LBP sichtbar geworden.

Dabei wären verschiedene Einflussebenen des normal sezernierten LBP möglich. Zum einen könnte LBP direkt die Besiedlung des MDT mit Mikroorganismen intraluminal beeinflussen. Bis jetzt ist die Produktion von LBP als Gesamtprotein durch Zellen des Darmes jedoch noch nicht nachgewiesen worden. MOLMENTI et al. (1993) und VREUGDENHIL et al. (1999) konnten lediglich eine Bildung von mRNA in isolierten Darmendothelzellen nachweisen. Der direkte Nachweis von LBP im Darmlumen könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

Zum anderen wäre eine Einflussnahme extraintestinal möglich. Es ist ein selektiver Transport von LPS durch LBP nicht nur zu CD14 wie von mehreren Autoren beschrieben (PUGIN et al. 1993; VON ASMUTH et al. 1993; TOBIAS et al. 1995; YU und WRIGHT 1996), sondern auch zu HDL und damit unter Umgehung des Akute-Phase-Geschehens zur Neutralisierung in die Leber möglich (WURFEL et al. 1994, WURFEL und WRIGHT 1997a).

Bei diesen Abläufen wäre LBP immer direkt beteiligt. Es ist jedoch auch eine indirekte Einflussnahme von LBP möglich.

So könnten durch die Abwesenheit von LBP andere Abwehrmechanismen des Körpers gegenüber Gram-negativen Bakterien, z.B. die Bildung von Laktoferrin und Defensinen, verstärkt werden. Dies würde eine geringere Besiedlung des MDT mit Gram-negativen Bakterien zur Folge haben.

Nicht zu vergessen ist dabei auch die herabgesetzte Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF, in Abwesenheit von LBP, die bereits durch HEINRICH et al. (2001) beschrieben wurde.

Auch die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen könnte durch die Abwesenheit von LBP qualitativ verändert werden, welches dann auch wieder Folgen für die systemische Immunantwort gegenüber Gram-negativen Bakterien hätte. Dies könnte über ähnliche Versuche mit gendeletierten LBP^{-/-}-Mäusen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden.

Eine weitere sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergebende Frage würde damit sein, ob LBP eine der Schlüsselfunktionen bei der Toleranzinduktion und Erhaltung gegenüber der normalen MDF zukommt.

Die direkte Untersuchung der Normalflora stellt einen wesentlichen Teil des Einblickes in die geheimnisvollen Wirkungsweisen vieler kleiner Bausteine im Organismus dar. Bei den weiteren Untersuchungen des Einflusses des LBP auf physiologische Vorgänge im Organismus sollten auch genetische Faktoren zur polymorphen Ausprägung des Genotyps von LBP mit berücksichtigt werden und durch gezielte Untersuchungen einbezogen werden.

So kann das Geschlecht beim Menschen im Zusammenhang mit genetischen Ausprägungen des LBP eine wesentliche Rolle bei der Prädisposition gegenüber Sepsis, ausgelöst durch Gram-negative Mikroorganismen, spielen (HUBACEK et al. 2001).

Die Maus ist das am meisten verwandte Versuchstier in der Grundlagenforschung. Dabei findet die Zusammensetzung der MDF dieses Organismus kaum Beachtung, obwohl immer wieder die Bedeutung der Normalflora für das Immunsystem und damit den Gesamtorganismus durch verschiedene Autoren betont wird (NAGURA und SUMI 1988; DUCHMANN et al. 1995; KIMURA et al. 1997).

Genetisch veränderte Mäuse sind wesentliche Bestandteile der heutigen Grundlagenforschung. Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Versuche werden häufig Rückschlüsse gezogen, ohne eventuelle Veränderungen der MDF und damit auch eventuelle Veränderungen des Immunstatus zu berücksichtigen.

Der Magen-Darm-Flora und ihrem Einfluss auf den Gesamtorganismus sollte aufgrund der hier erzielten Ergebnisse eine stärkere Gewichtung bei der Interpretation von Forschungsergebnissen mit gendeletierten Mäusen zugemessen werden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Bedeutung des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) für Mikroorganismen des Magen-Darm-Traktes von BALB/c-LBP^{+/+} - und BALB/c-LBP^{-/-} (Knock-out)-Mäusen

Nadine Werth, geb. Haberland

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig

eingereicht im April 2005

Schlüsselworte: LBP, Gendelektion, BALB/c-Mäuse, Magen-Darm-Flora,
Immunantwort

109 Seiten, 8 Abbildungen, 13 Tabellen, 265 Literaturstellen

Durch Forschungsarbeiten der neueren Zeit ist die Bedeutung der Akut-Phase-Proteine als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Abwehr im Organismus sichtbar geworden.

Die möglichen Wechselwirkungen zwischen der physiologischen Magen-Darm-Flora und diesen Proteinen sind jedoch weitestgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Magen-Darm-Flora von einem LBP^{-/-}-Knock-out-Maus-Stamm und dem Wildstamm (jeweils 20 Tiere) untersucht.

Dabei wurde die aerobe Gesamtkeimzahl, die aerobe und anaerobe Gram-negative Gesamtkeimzahl und die Gesamtkeimzahl der auf MRS-Agar gewachsenen Keime in Darminhaltsproben der Darmabschnitte Jejunum, Zäkum und Kolon von oben genannten Mäusen erfasst.

Zusätzlich wurden sieben serologische Untersuchungen bei 40 Tieren durchgeführt, um mögliche parallele immunologische Reaktionen des Körpers auf Bestandteile der physiologischen Magen-Darm-Flora zu erfassen und vergleichend zu betrachten.

Bei den Untersuchungen konnten hochsignifikante Unterschiede bezüglich der Höhe und Zusammensetzung der aeroben Gesamtkeimzahl, der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl, der anaeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl und der Laktobazillen-Gesamtkeimzahl festgestellt werden.

Dabei waren bei der LBP^{-/-}-Gruppe, den gendeletierten Mäusen, die aerobe Gesamtkeimzahl signifikant erhöht, die anderen Keimzahlen, insbesondere die Keimzahlen der aeroben und anaeroben Gram-negativen Bakterien und der Laktobazillen signifikant erniedrigt. Zusätzlich konnten Abweichungen verschiedener Koloniemerkmale wie Hämolyseverhalten, Koloniemorphologie und Genausprägung zwischen der LBP^{-/-}- und der LBP^{+/+}-Gruppe festgestellt werden.

Bei den serologischen Untersuchungen konnten die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen bestätigt werden.

Es wurden signifikante Erhöhungen der relativen Antikörperspiegel gegenüber ausgewählten bakteriellen Strukturen, von Mikroorganismen, welche auch signifikant häufiger von den jeweiligen Gruppen isoliert werden konnten, festgestellt.

Diese Ergebnisse lassen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gendeletion, also der Nichtexpression von LBP, und der Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora schließen.

Inwiefern dies auf direkten oder indirekten Einfluss des LBP auf die Magen-Darm-Flora zurückzuführen ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Dabei sollten noch andere Einflussfaktoren, wie z. B. die Varianz des LBP in seiner genotypischen Ausprägung, berücksichtigt werden.

7 Summary

Investigations about the significance of the Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) for the indigenous flora of the gastro-intestinal tract in BALB/c-LBP^{+/+} - und BALB/c-LBP^{-/-} (Knock-out)-mice

Nadine Werth, geb. Haberland

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig

Submitted in April 2005

Keywords: LBP, gendeletion, BALB/c-mice, gut flora, immune response

109 pages, 8 figures, 13 tables, 265 references

Through research in the last couple of years the meaning of the acute phase proteins as an important part of the unspecific immunological defense has been evaluated.

The possible interactions between the physiological flora of the gastro-intestinal tract (GIT) and these proteins are not known yet.

In this work the flora of the GIT of a LBP^{-/-}-knock-out-mouse-strain and the wild strain (each 20 animals) has been examined.

It has been recorded the total number of aerobe bacteria, the total number of aerobe and anaerobe Gram-negative bacteria, and the total number of bacteria growing on MRS-agar. Only the gut contents of the jejunum, cecum and colon of the above named mice have been used in this investigation.

Additionally seven serological examinations have been carried out in 40 mice, to record and compare the possible immunological reactions of the body towards parts of the physiological flora of the GIT.

Highly significant differences in point of the composition of the total number of aerobe growing bacteria, the total number of aerobe and anaerobe growing Gram-negative bacteria and in the total number of lactobacilli have been found.

In the LBP^{-/-} group (meaning the gendeleted mice) the total number of aerobe bacteria was significantly higher than in the LBP^{+/+} group.

All the other examined groups of bacteria, especially the total number of aerobe and anaerobe Gram-negative bacteria and the total number of lactobacilli were significantly decreased.

Besides this, differences between the LBP^{-/-} and LBP^{+/+} group of certain colony characteristics were noticeably, like hämolytic behaviour, morphology and genetic features.

The results of the microbiologic investigations were confirmed by the outcome of the serologic examinations. A significantly higher relative concentration of antibodies towards selected structures has been found from bacteria, which have been isolated significantly more often in one or the other group.

The results of this study show a possible connection between the deletion of the gen, followed by the nonexpression of LBP, and the composition of the physiological gut flora.

Whether these results are caused by a direct or indirect influence of LBP on the microflora of the GIT has to be reevaluated in further investigations.

In these follow-up studies other factors affecting the results have to be taken into account, as for instance the variance of LBP in its genetic features.

8 Literaturverzeichnis

- Abrams GD, Bauer H, Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal physiology and cellular renewal in the ileum. *Lab Invest.* 1963;12:355-64.
- Adami A, Cavazzoni V. A standard procedure for assessing the fecal microflora of swine. *Annali di Microbiologia e Enzimologia.* 1996;46:1-9.
- Alderete JF, Robertson DC. Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxygenic strains of *E. coli*: defined medium for production of heat stable enterotoxin. *Infect Immun.* 1977;15:781-8.
- Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun.* 1994;62:5397-403.
- Anonymus. DIN 10109: "Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Bestimmung von aerob wachsenden Milchsäurebakterien. Spatelverfahren (Referenzverfahren)."
- Aranki A, Syed SA, Kenney EB, Freter R. Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. *Appl Microbiol.* 1969;17:568-76.
- Balmer SE, Scott PH, Wharton BA. Diet and fecal flora in the newborn: lactoferrin. *Arch Dis Child.* 1989;64:1685-90.
- Baron EJ, Bennion R, Thompson J, Strong C, Summanen P, McTeague M et al. A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis. *Clin Infect Dis.* 1992;31:227-31.
- Bartram HP, Scheppach W, Gerlach S, Ruckdeschel G, Kelber E, Kasper H. Does yoghurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and metabolites in healthy subjects?. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:428-32.
- Bassi C, Fontana R, Vesentini S, Cavallini G, Marchiori L, Falconi M et al. Antibacterial and mezlocillin-enhancing activity of pure human pancreatic fluid. *Int J Pancreatol.* 1991;10(3-4):293-7.
- Bealmear PM (1981): In: Gershwin ME, Merchant B. eds., *Immunological Defects in Laboratory animals*, pp.261-350, Plenum.
- Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antimicrobial spectrum of lactoferrin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol.* 1992;73:472-79.
- Berg JN, Fales WH, Scanlan CM. Occurrence of anaerobic bacteria in diseases of the dog and the cat. *Am J Vet Res.* 1979;40:876-81.

- Berg RD. In: Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Hentges, D.J. ed., Academic Press 1983, 101-26.
- Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1996; 4(11):430-5.
- Bodmer T, Miltner E, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;182(1):45-9.
- Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attae A, Salfati J, Pochart P et al. Short-chain fructooligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr.* 1999;129(1):113-6.
- Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Goderel I, Rambaud JC. Fecal recovery of viable *Bifidobacterium* spp. ingested in fermented milk. *Gastroenterol.* 1992; 102:875-8.
- Boyer B, Thiery JP. Epithelial cell adhesion mechanisms. *J Membr Biol.* 1989; 112:97-108.
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO et al. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol.* 1989;97:1562-84.
- Brandtzaeg P, Nilssen DE, Rognum TO, Thrane PS. Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991; 20:397-439.
- Burton DR. The Conformation of Antibodies. In: Metzger H. ed., *Fc Receptors and the action of antibodies.* 1. Auflage. Washington, D.C., Raven Press 1990, S. 3154.
- Caldwell D, Bryant M. Medium without rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl Microbiol.* 1966;14:794-801.
- Callahan LT III., Richardson SH. Biochemistry of *V. cholerae* virulence; III: Nutritional requirements for toxin production and the effects of pH on toxin elaboration in chemically defined media. *Infect Immun.* 1973;7:567-72.
- Cash RA, Music SI, Libonati JP, Craig JP, Pierce NF, Hornick RB. Response of man to infection with *Vibrio cholerae*, I. Clinical, serological and bacteriologic response to a known inoculum. *J Infect Dis.* 1974;129:45-52.
- Cebra JJ, Shroff KE. Peyer's patches as inductive sites for IgA commitment. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, eds., *Handbook of mucosal immunology.* San Diego, Academic Press. 1994:151-8.
- Cebra JJ. Influences of microbiota on microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr.* 1999,69(suppl.):1046S-51S.

- Cebra JJ, Periwal Bhargava S, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol.* 1998;6:13-8.
- Chandra RK. Malnutrition and immunocompetence; an overview. In: Bellanti JA. ed., *Acute diarrhoea, its nutritional consequences in children.* New York, Nestle, Vervey/Raven Press 1983;131-49.
- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ et al. Identification of defensin-1 and defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem.* 1996;271:2935-40.
- Code CF. The interdigestive housekeeper of the gastrointestinal tract. *Prospect Biol Med.* 1987; 22:549-55.
- Cook GC. Infective gastroenteritis and its relationship to reduced gastric acidity. *Scand J Gastroenterol.* 1985;20:17-22.
- Couturier C, Jahns G, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavillon N. Membrane molecules which trigger the production of interleukin-1 and tumour necrosis factor- α by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Eur J Immunol.* 1992;22: 1461-6.
- Davidson JN, Hirsh DC. Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect Immun.* 1976;13:1773-4.
- Davies CP, McAllister JS, Savage DC. Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. *Infect Immun.* 1973;7:666-72.
- Davies CP, Savage DC. Habitat, Succession, Attachment and Morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 1974;10(4):948-56.
- Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* 1993;150:2885-91.
- Dentener MA, Vreugdenhil AC, Hoet PHM, Vernooij JHJ, Nieman FHM, Heumann D et al. Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defenses to bacterial endotoxins. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(2):146-53.
- DeWitt RC, Kudsk KA. The gut's role in metabolism, mucosal barrier function, and the gut immunology. *Infect Dis Clin North America.* 1999;13(2):465-81.

- Dinareello CA. Role of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor in systemic Responses to Infection and Inflammation. In: Gallin, J.I.; Goldstein, I.; Snyderman, R. eds., *Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates*. New York, Raven Press. 1992;p.211-32.
- Dixon JMJ. Fate of bacteria in small intestine. *J Pathol*. 1968;79:131-40.
- Dobbins WO III. Human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gut*. 1986;27:972-85.
- Downey GP. Mechanisms of Leukocyte Motility and Chemotaxis. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:113-24.
- Drasar BS. Cultivation of anaerobic intestinal bacteria. *J Pathol Bact*. 1967; 94:417-27.
- Drasar BS, Shiner M, McLeod GM. Studies on the intestinal flora I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract of the healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterol*. 1969;56:71-9.
- Drasar BS et al. In: Roe FJC ed., *Metabolic aspects of food safety*, Blackwell Scientific Publications, Oxford; 1970 pp.245.
- Drasar BS, Hill MJ. *Human intestinal flora*. London: Academic Press. 1974.
- Dubos R, Schaedler RW, Costello R, Hoet P. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 1965;122:67-76.
- Dubos RJ, Schaedler RW. The effect of diet on the fecal bacterial flora of mice and on their resistance to infection. *J Exp Med*. 1962,115:1161-72.
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer-zum-Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1995;102:448-55.
- Ellison RT, Giehl TJ. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin und lysozyme. *J Clin Invest*. 1991;88:1080-91.
- Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ et al. Structure of Pentameric Human Serum Amyloid P Component. *Nature*. 1994;367:338-45.
- Even H, Rohde J, Verspohl J, Ryll M, Amtsberg G. Investigations into the occurrence and the antibiotic susceptibility of gram negative anaerobes of the genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium* in specimens obtained from diseased animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1998;111:379-86
- Facklam RR. In: Lennette, E.H. et al., eds., *Manual of clinical microbiology*, 3rd. Edn., ASM, Washington, D.C. 1980;88-110.

- Fan X, Stelter F, Menzel R, Jack RR, Spreitzer I, Hartung T, Schütt C. Structures of *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a Lipopolysaccharide-binding protein depending reaction. *Infect Immun.* 1999;67(6):2964-8.
- Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of small intestine. *Gut.* 1977;18:921-37.
- Forstner JF, Oliver MG, Sylvester FA. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HD, Guerrant RL. eds., *Infections of the gastrointestinal tract.* New York, Raven Press 1995;71-88.
- Foster EM. Foodborne hazards of microbial origin. *Fed Proc.* 1978;2577-81.
- Freier S, Eran M, Faber J. Effect of cholecystokinin and of its antagonist, of atropine and of food on the release of immunoglobulin A and immunoglobulin G specific antibodies in the rat intestine. *Gastroenterol.* 1987;93:1242-46
- Freter R. In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against shigella flexneri II. The inhibitory mechanism. *J Infect Dis.* 1962;110:38-46
- Freter R. Gut-associated immunity to cholera. In: Barua D, Burrows W, eds. *Cholera.* Philadelphia: Saunders, 1974a;pp.315-33
- Freter R. Interaction between mechanism controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr.* 1974;27:1409-16
- Friedman RM. Interferons. In: Oppenheim JJ, Shevach, EM., eds., *Textbook of Immunophysiology.* New York, Oxford University Press 1988;, p. 94.
- Froon AHM, Dentener MA, Greve JW, Ramsay G, Buurman WA. Lipopolysaccharide toxicity regulating proteins in bacteremia. *J Infect Dis.* 1995;171:1250-7.
- Fukushima Y, Kawata Y, Mizumachi K, Kurisaki J, Mitsuoka T. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int J Food Microbiol.* 1999;46:193-7.
- Gallay P, Carrel S, Glauser MP, Barras C, Ulevitch RJ, Tobias PS. et al. Purification and characterization of murine lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1993;61(2):378-83.
- Gallay P, Barras C, Tobias PS, Calandra T, Glauser MP, Heumann D. Lipopolysaccharide(LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS. *J Infect Dis.* 1994;170:1319-22.
- Gallay P, Heumann D, Le Roy D, Barras C, Glauser MP. Mode of action of anti-LBP-antibodies for prevention of endotoxemic shock in mice. *Proc Nat Acad Sci USA:* 1994a;91(17):7922-6:

- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*: 1985; 76:1427-35:
- Gianella RA, Broitman SA, Zamchek N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*. 1972;13:251-6.
- Gibbons RA. Mucus of the mammalian genital tract. *Br Med Bull*. 1978;34:34-8.
- Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Am J Physiol*. 1961;201:175-8.
- Gordon JH, Dubos R. The anaerobic bacterial flora of the mouse caecum. *J Exp Med*. 1970;132:251-60.
- Griebel PJ, Hein WR. Expanding the role of Peyer`s patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today*. 1996;17:30-9.
- Gumbiner B. The structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol*. 1987;253:C749-58.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. 1994;179:269-77.
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cells/leucocyte co-cultures. *Gut*. 2000;47:79-87.
- Hancock REW, Lehrer R. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*. 1998;16:82-8.
- Harris O, Fields ML. A study of thermophilic aerobic sporeforming bacteria isolated from soil and water. *Can J Microbiol*. 1972;18(6):917-23.
- Harris MA, Reddy CA, Carter GR. Anaerobic bacteria from the large intestine of mice. *App. Environ Microb*. 1976;31(6):907-12.
- Hartemink R, Domenech VR, Rombouts, FM. LAMVAB- a new selective medium for the isolation of lactobacilli from feces. *J Microbiol Methods*. 1997;29:77-84.
- Hartemink R, Rombouts FM. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli und total anaerobes from faecal samples. *J Microbiol Meth*. 1999;36:181-92.
- Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhauer PB, Lehrer RI. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *J Clin Invest*. 1995;95:603-10.

Haudek SB, Natmessnig BE, Redl H, Schlag G, Hatlen GE, Tobias PS. Isolation, partial characterization and concentration in experimental sepsis of baboon lipopolysaccharide-binding protein. *J Lab Clin Med.* 2000;136(58):363-70.

Hazenberg MP, Custers-van Lieshout LMC. Conversion of germ-free mice to the normal state by *Chlostridia*. *Z Versuchstierk.* 1976;18:185-90.

Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 1996;4:407-14.

Hein WR, Dulder R, Mackay CR. Surface expression of differentiation antigens on lymphocytes in the ileal and jejunal Peyer's patches of lambs. *Immunol.* 1989;68:365-70.

Heinrich J-M, Bernheiden M, Minigo G, Yang KK, Schütt C, Männel DN, Jack RS. The essential role of Lipopolysaccharide-binding protein in protection of mice against a peritoneal *Salmonella* infection involves the rapid induction of an inflammatory response. *J Immun.* 2001;167:1624-8.

Hentges DJ. Enteric pathogen - normal flora interactions. *Am J Clin Nutr.* 1970;23:1451-6.

Hentges DJ, Maier BR. Experimental *Shigella* infections in laboratory animals. *Infect Immun.* 1972;6:168-73.

Hirayama K, Endo K, Kawamura S, Mitsuoka T. Comparison of the intestinal bacteria in specific pathogen free mice from different breeders. *Jikken Dobutsu.* 1990;39(2):263-7.

Hirsh DC, Biberstein EL, Jang SS. Obligate anaerobes in clinical veterinary practice. *J Clin Microbiol.* 1979;10:188-91.

Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *App Environ Microbiol.* 2000;66:5241-7.

Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. In: 4th edition., *Anaerobe laboratory manual.* Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va. USA, 1977.

Horadagoda NU, Eckersall PD, Andrew L, Gallay P, Heumann D, Gibbs HA. Characterisation of bovine lipopolysaccharide binding protein and the in vivo acute phase response to *Pasteurella haemolytica* Type A. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;49:61-74.

- Hornick RB, Music SI, Wenzet R, Cash R. et al. The broad street pump revisited: response of volunteers to ingested Cholera vibrios. *Bull NY Acad Med.* 1971;47:1181-91.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162:3749-52
- Howden CV, Hunt RH. Relationship between gastric secretion and infection. *Gut.* 1987;28:98-107.
- Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M et al.. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med.* 2001;29:557-61.
- Hungate R. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.* 1950; 14:1-49.
- Iglewski WJ, Garhardt NB. Identification of an antibiotic producing bacteria from the human intestinal tract and characterization of its antimicrobial product. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978;13:81-9.
- Itoh K, Mitsuoka T. Comparison of media for isolation of mouse anaerobic faecal bacteria. *Laboratory Animals.* 1985;19:353-8.
- Itoh K, Mitsuoka T, Sudò K, Suzuki K. Comparison of the fecal flora mice based upon different strains and different housing conditions. *Z Versuchstierk.* 1983;25:135-46.
- Itoh K, Mitsuoka T, Sudò K, Suzuki K. Comparison of fecal lactobacilli in mice of different strains under different housing conditions. *Z Versuchstierk.* 1983a;25:193-200.
- Itoh K, Owada T, Mitsuoka T. Characteristic fecal flora of NC mice. *Lab Animals.* 1985;19:7-15.
- Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A. et al. LBP is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature.* 1997;389:742-5.
- Jackson DE, Lally ET, Nakamura MD, Montgomery PC. Migration of IgA-bearing lymphocytes into salivary glands. *Cell Immunol.* 1981;63:203-9.
- Janeway CA, Rosen FS, Merler E, Alper CA. *The Gamma Globulins.* 2. Auflage Boston (Littel, Brown & Co) 1967.

- Jang SS, Hirsh DC. Characterization, distribution, and microbiological association of *Fusobacterium* spp. in clinical specimens of animal origin. *J Clin Microbiol.* 1994;32:384-7.
- Katayama M, Dazhong X, Specian RD. Role of bacteria adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: Effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg.* 1997;225:317-26.
- Kawai Y, Morotomi M. Intestinal enzyme activities in germ-free, conventional, and gnotobiotic rats associated with indigenous microorganisms. *Infect Immun.* 1978;19:771-8.
- Kelstrup J, Gibbons RJ. Inactivation of bacteriocins in the intestinal canal and oral cavity. *J Bacteriol.* 1969;99:888-90.
- Kim YS, Ryu JH, Han SJ, Choi KH, Nam KB, Jang ICH et al. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem.* 2000;42:32721-7.
- Kimura K, MacCartney AL, McConnell MA, Tannock GW. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:3394-8.
- Klaasen HLBM, Peters B, Koopman JP, Poelma FGJ, Van den Brink ME, Bakker MH et al. Different degree of ileal colonization by segmented, filamentous bacteria in two strains of mice. *J Exp Anim.* 1992;35:103-9.
- Kleeßen B, Jacobasch. Bestimmung von obligaten und fakultativen Anaerobiern unter Verwendung der Glove-Box-Technik (Unveröffentlichte Ergebnisse) 2002.
- Knapp S, de Vos AF, Florquin S, Golenbock DT, van der Poll T. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infect Immun.* 2003;71(12):6747-53.
- Koopman JP, Kennis HM. Differentiation of bacteria isolated from mouse ceca. *Z Versuchstierk.* 1977;19:174-81.
- Koopman JP, Kennis HM. Characterization of anaerobic cecal bacteria of mice. *Z Versuchstierk.* 1979;21:185-91.
- Koopman JP, Stadhouders, Kennis HM, de Boer H. The attachment of filamentous segmented micro-organisms to the distal ileum wall of the mouse: a scanning and transmission electron microscopy study. *Lab Animals.* 1987;21:48-52.

- Kroese FG, de Waard R, Bos NA. B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin Immunol.* 1996;8(1):11-18.
- Kruzel ML, Harari Y, Chen CY, Castro GA. The gut: A key metabolic organ protected by lactoferrin during experimental systemic inflammation in mice. In: Spik et al., eds., *Advances in Lactoferrin Research*;., Plenum Press, New York 1998;167-73.
- Kucharzik T, Lugering N, Rautenberg K, Lugering A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann NY Acad Sci.* 2000;915:171-83.
- Lamping N, Dettmer R, Schröder NWJ, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or Gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* 1998;101:2065-71.
- Landsverk T, Halleraker M, Aleksanderson L, McClure S, Hein W, Nicander L. The intestinal habitat for organized lymphoid tissue in ruminant; comparative aspects of structure, function and development. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;28:1-16.
- Langkamp-Henken B, Glezer J, Kudsk KA. Immunology of the gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract.* 1992;7:100-8.
- Lapage SP, Shelton JE, Ribbons DW. In: Norris JR, Ribbons DW., ed., *Methods in Microbiology*, Vol. 3A, Academic Press, London, 1970 S.116.
- Larsen HJ, Landsverk T. Distribution of T and B lymphocytes in jejunal and ileocaecal Peyer's patches of lambs. *Res Vet Sci.* 1986;40:105-11.
- Lee A, Gordon J, Dubos R. Enumeration of oxygen sensitive bacteria usually present in the intestine of healthy mice. *Nature (London).* 1968;220:1137-9.
- Lee A, Gordon J, Lee C, Dubos R. The mouse intestinal microflora with emphasis on the strict anaerobes. *J Exp Med.* 1970;133:339-52.
- Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, Currie MG, Ouellette AJ, Selsted ME et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:8585-9.
- Lengacher S, Jongeneel CV, Le Roy D, Lee JD, Kravchenko V, Ulevitch RJ et al. Reactivity of murine and human recombinant LPS-binding protein (LBP) with LPS and gram-negative bacteria. *J Inflamm.* 1995-96;47:165-72.
- Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J Immunol.* 2001;167(5):2759-65.

- Li J, Kudsk KA, Hamidian M, Gocinski BL. Bombesin affects mucosal immunity and gut-associated lymphoid tissue in intravenously fed mice. *Arch Surg*. 1995;130:1164-9.
- Lillard JW Jr, Boyaka PN, Chertov O et al. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:651-6.
- Lowden S, Heath T. Lymph pathways associated with Peyer's patches in sheep. *J Anat*. 1992;181:209-17.
- Maejima K, Maejima F, Tajima Y. Viable count of various bacteria in the digestive tract of mice. II. Fecal count in different strains of mice. *Bull Exp Animals*. 1966;104-12.
- Maejima K, Maejima F, Tajima Y. Viable counts of various bacteria in the digestive tract of mice IV. Enumeration of organisms in the stomach and different regions of the intestine. *Exp Animals*. 1968;17:142-9.
- Maejima K, Maejima F, Tajima Y, Okugi M. Viable count of various bacteria in the digestive tract of mice. III. Changes of viable count of fecal bacteria with age. *Bull Exp Animals*. 1967;16:20-5.
- Marcotte H, Lavoie MC. No apparent influence of immunoglobulins on indigenous oral and intestinal microbiota of mice. *Infect Immun*. 1996;64:4694-9.
- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*. 1997;40:782-9.
- McKillip JL. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000;77:393-9.
- Medzhitov R, Kopp EB. The toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1999;11:13-18.
- Mickelsen O. Intestinal synthesis of vitamins in the non-ruminant. *Vitam Horm*. 1956;14:1-95.
- Milton-Thompson GJ, Lightfoot NF, Ahnmet Z. Intragastric acidity, bacteria, nitrate and N-nitrosamine compounds before, during and after cimetidine treatment. *Lancet*. 1982;8:1091-5.
- Mitsuoka T, Terada A, Morishita Y. Die Darmflora von Mensch und Tier. *Goldschmidt Informiert*. 1973;2:23-41.
- Mitsuyama M, Ohara R, Amako K, Yokokura T, Nomoto K. Ontogeny of macrophage function to release superoxide anion in conventional and germfree mice. *Infect Immun*. 1986;52:236-9.

- Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1998;268:14116-24.
- Moore WEC. Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. *Int J Syst Bacteriol.* 1966;16:173-90.
- Moore WEC, Cato E, Holdeman I. Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrences in clinical infections. *J Infect Dis.* 1969;119:641-9.
- Moore WEC, Holdman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol.* 1974;27:961-79.
- Moreau MC, Raibaud P, Muller MC. Relationship between the development and the establishment of the intestinal IgA immune system and the establishment of microbial flora in the digestive tract of young holoxenic mice. *Ann Immun (Paris).* 1982;133(1):29-39.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S et al. Essential role of MD-2 in LPS-responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3:667-72.
- Nagura H, Sumi Y. Immunological functions of the gut - role of the mucosal immune system. *Toxicol Pathol.* 1988;16(2):154-64.
- Ngo TH, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:5241-7.
- Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:410-6.
- Nigatu A, Ahrnè S, Molin G. Temperature-dependent variation in API 50 CH Fermentation Profiles of *Lactobacillus* Species. *Curr Microbiol.* 2000;41:21-6.
- Norin KE, Persson AK, Saxerholt H, Midtvedt T. Establishment of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:1850-2.
- O'Rourke J, Lee A, McNeill J. Differences in the gastrointestinal microbiota of specific pathogen free mice: an often unknown variable in biomedical research. *Lab Anim.* 1988;24(2):297-303.
- Ohkubo T, Tsuda M, Tamura M, Yamamura M. Impaired superoxide production in peripheral blood neutrophils of germ-free rats. *Scand J Immunol.* 1990;32:727-9.

- Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H, Umesaki Y. Effects of fecal microorganisms and their chloroform-resistant variants derived from mice, rats, humans in immunological and physiological characteristics of the intestine in ex-germ-free. *Infect Immun.* 1994;62:5442-6.
- Okada Y, Kanoe M, Yaguchi Y, Watanabe T, Ohmi H, Okamoto K. Adherence of *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* to different animal cells. *Microbios.* 1999;99(393):95-104.
- Ottoway CA. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991;20:511.
- Owen RL. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterol.* 1977;72:440-51.
- Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT, Cano-Gauci DF, Huttner KM, Buick RN et al. Mouse paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun.* 1994;62:5040-7.
- Pacher B, Kneifel W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milkproducts. *Int Dairy J.* 1996;6:43-64.
- Paiva de Sousa C, Dubreuil JD. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol.* 2001; 291:15-20
- Palmer DI. Nutritional states: a determinant of severity of diarrhoea in patients with cholera. *J Infect Dis.* 1967;143:8-14.
- Panja A, Mayer L. Diversity and Function of Antigen-Presenting cells in mucosal tissue. In: Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR et al., eds.. *Handbook of Mucosal Immunology.* San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1994; pp. 177.
- Peeters T, Vantrappen G. The paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut.* 1975; 16: 553-8
- Pleasant JR. In: Coates ME. Ed. *The Germfree Animal in Research.* Academic Press. 1968; p.113-25
- Porter EM, Liu L, Oren A. Localization of human intestinal defensin 5 in paneth cell granules. *Infect Immun.* 1997;65:2389-95.
- Powell D. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol.* 1981;241:G275-88.
- Pugin J, Schürer-Maly D, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:2744-8.

- Raibaud P, Dickinson AB, Sacquet E, Charlier H, Mocquot G. Microflora of the digestive system of the rat. I. Technics of study and proposed culture media. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1966;110(4):568-90.
- Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde Kh, Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. Biosynthesis of lipopolysaccharide binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology*. 1990;58:89-94.
- Renegar KB, Small PA.Jr. IgA mediation of murine nasal anti-influenza immunity. *J Virol*. 1991;65:2146-8.
- Reynaud CA, Garcia C, Hein WR, Weill JC. Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-dependent process
Cell 1995; 80: 115-25
- Reynolds JD, Morris B. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol*. 1983;13:627-35.
- Roberts AK, Chierici R, Sawatzki G, Hill MJ, Volpato S, Vigi V. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. I.Effect on the infant fecal flora. *Acta Paediatr Scand*. 1992;81:119-24.
- Rodning CB, Wilson ID, Erlandsen SL. Immunoglobulins within human small-intestinal paneth cells. *Lancet*. 1976;1:984-7.
- Rosebury T. *Microorganisms indigenous to man*. New York: McGraw-Hill. 1962; 310-84
- Roszkowski R, Ko HL, Beuth J, Ohshima Y, Roszkowski W, Jeljaszewicz J et al. Intestinal microflora of BALB/c-mice and function of local immune cells. *Zbl Bakt Hyg*. 1988;A270:270-9.
- Rowan NJ, Caldow G, Gemell CG, Hunter IS. Production of diarrhoeal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:2372-6.
- Rozee KR, Cooper D, Lam K, Costerton JW. Microbial flora of the mouse ileum mucus layer and epithelial surface. *Appl Environ Microbiol*. 1982;43:1451-63.
- Rubinstein E, Mark Z, Haspel J, Ben-Ari G, Dreznik Z, Mirelman D, Tadmor A. Antibacterial activity of pancreatic fluid. *Gastroenterol*. 1985;88:926-32.
- Rudzik KR, Clancy RL, Perey DYE, Day RP, Bienenstock J. Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes. *J Immunol*. 1975;114:1599-604.

- Salmi M, Jalkanen S. Regulation of lymphocyte traffic to mucosal associated lymphatic tissue. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991;20:495-510.
- Savage D, MacAllister J, Davis C. Anaerobic bacteria on the mucosal epithelium of the murine large bowel. *Infect Immun.* 1971;4:492-502.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
- Savage DC, Dubos R. Localization of indigenous yeast in the murine stomach. *J Bacteriol.* 1967;94:1811.
- Savage DC, Dubos R. Alterations in the mouse caecum and its flora produced by antibacterial drugs. *J Exp Med.* 1968;128:97-110.
- Savage DC, Dubos R, Schaedler RW. The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *J Exp Med.* 1968;127:67-76.
- Savage DC, Blumershine RVH. Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastrointestinal ecosystem: scanning electron microscopy. *Infect Immun.* 1974;10:240-50.
- Schaedler RW, Dubos R, Costello R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med.* 1965;122:59.
- Schaedler RW, Dubos R. The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxin. *J Exp Med.* 1962;115:1149-60.
- Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding protein and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem.* 2003;278(18):15587-94.
- Schrödl W, Fuerll BA, Reinhold P, Krüger M, Schuett C. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *J Endotox Res.* 2001; 7:49-52
- Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med.* 2001;194:79-88.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC et al. Structure and function of Lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249:1429-31.

- Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, Aberle HP, Knope HP, Lamping N et al. The Lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 1996;16:3490-3503.
- Schumann RR, and Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol.* 2000;74:42–60.
- Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI. Primary structures of MCP-1 und MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem.* 1983;258:14485-9.
- Selsted ME, Harwig MS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest.* 1985;76:1436-9.
- Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestine host defence. *J Cell Biol.* 1992;118:929-36.
- Shah HN, Collins MD. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melanogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J syst Bacteriol.* 1990;40:205.
- Sheahan DG, Jervis HR. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *Am J Anat.* 1976;146:103-31.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999;189:1777-82.
- Smith HW. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J Pathol Bacteriol.* 1965;90(2):495-513.
- Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, Ishii T, Tominaga A, Araki S et al. Differential regulation of IgA production by TGF- β und IL-5: TGF- β induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol.* 1992;140:158-72.
- Soukka T, Lumikari M, Tenovuo T. Combined bactericidal effect of human lactoferrin und lysozyme against streptococcus mutans serotype C. *Scand J Dent Res.* 1991;99(5):390-6.
- Spears RW, Freter R. Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967;124:903-9.
- Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on globulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymphnodes and spleen. *J Immunol.* 1986;136:152-6.

- Starlin JR, Balish E. Lysosomal enzyme activity in pulmonary alveolar macrophages from conventional, germfree, monoassociated, conventionalized rats. *J Reticuloendothelial Soc.* 1981;30:497-505.
- Su GL, Freeswick PD, Geller DA, Wang Q, Shapiro RA, Wan YH et al. Molecular cloning, characterization and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. *J Immunol.* 1994;153:743-52.
- Summanen P, Baron EJ, Vitron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM. In: *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 5th ed., Star, Belmont 1993.
- Svanborg-Eden C, Svennerholm AM. Secretory immunoglobulin A und G antibodies prevent adhesion of *E. coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun.* 1978;22(3):790-7.
- Svanborg C. Bacterial adherence and mucosal immunity. In: Ogra, P.L.; M.E. Lamm; J.R. McGhee et al. (eds.): *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego, CA, Academic Press, 1994; pp. 71.
- Szurszewski JH. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol.* 1969;217:1757-63.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews.* 1976;40:722-56.
- Tannock GW, Savage DC. Influence of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 1974;9:591-8.
- Tennant B, Reina-Guerra M, Harrold D. Influence of microorganisms on intestinal absorption. *Ann NY Acad Sci.* 1971;176:262-72.
- Teraguchi S, Shin K, Ozawa K, Najamura S, Fukuwatari Y, Tsuyuki S et al. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *App Environ Microbiol.* 1995;61:501-6.
- Thompson GR, Trexler PC. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut.* 1971;12:230-5.
- Thompson PA, Tobias PS, Viriyakosol S, Kirkland TN, Kitchen RL. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS. *J Biol Chem.* 2003;278(31):28367-71.
- Tobias PS; Soldau K; Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med.* 1986;164:777-93.
- Tobias PS, Soldau K. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem.* 1988;263:13479-81.

- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Exp Med*. 1989;264:10867-71.
- Tobias PS, Soldau K, Kline L, Lee JD, Kato K, Martin TP, Ulevitch RJ. Cross-linking of lipopolysaccharide (LPS) to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein. *J Immunol*. 1993;150:3011-21.
- Tobias PS, Soldau K, Gegener JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*. 1995;270(18):10482-8.
- Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
- Umesaki Y, Setoyama H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microb Infect*. 2000;2:1343-51.
- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor bearing intestinal lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunol*. 1993;79:32-7.
- Usui M, Hanamura N, Hayashi T, Kawarada Y, Suzuki K. Molecular cloning, expression and tissue distribution of canine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. *Bioch Biophys Act*. 1998;1397:202-12.
- Vaahtovuori J, Toivanen P, Eerola E. Study of murine faecal microflora by cellular fatty acid analysis; effect of age and mouse strain. *Ant Van Leeuwenhoek*. 2001;80:35-42.
- Van der Heijden PJ, Stok W, Bianchi TJ. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the "background" immunoglobulin production. *Immun*. 1987;62:551-5.
- Van der Waaij LA, Harmsen HJM, Madjiipour M, Kroese FGM, Zwijs M, van Dullemen HM et al. Chapter 6: Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells *Proefschrift, Rijksuniversiteit Groningen (2003): The interaction between the mucosal immunosystem and the commensal microflora of the colon* ISBN 90-806085-9-9, URL: <http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/medicine/l.a.van.der.Waaij/c6.pdf>.
- Van Snik J. Interleukin-6: An Overview. *Ann Rev Immun*. 1993;8:253-78.
- Vantrappen G, Janssens J, Hellems J, Ghos Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth. *J Clin Invest*. 1977;59:1158-66.

- Vantrappen G, Janssens J, Peeters TL. The migrating motor complex. *Med Clin North Am.* 1981;65:1311-29.
- Verdu EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E et al. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:46–50.
- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial Lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2001;276:38044-51.
- Von Asmuth EJU, Dentener MA, Bazil V, Bouma MG, Leeuwenberg JF, Buurman WA. Anti CD 14 antibodies reduce responses of cultured human cells to endotoxin. *Immunol.* 1993;80:78-83.
- Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JWM, Buurman WA. LBP and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immun.* 1999;163:2792-8.
- Vreugdenhil AC, Snoek AM, van't Veer C, Greve JWM, Buurman WA. LPS- binding protein circulates in association with apoB- containing lipoproteins and enhances endotoxin - LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest.* 2001; 107(2):225-34.
- Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JWM, van't Veer C, Burrman WA Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by Chylomicrons: *J Immun:* 2003;170:1399-1405:
- Wakabayashi H, Bellamy W, Takase M, Tomita M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *J Food Protect:* 1992;55:238-40.
- Waker WA. Host defence mechanisms in gastrointestinal tract. *Pediatrics.* 1976;57:901-6
- Wang CS, Cloben HV. Purification of human lysozyme from milk and pancreatic juice. *Ann Biochem.* 1985;139:224-7.
- Weiss WI, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of a C-Type Mannose-Binding Protein Complexed with an Oligosaccharide. *Nature.* 1992;360:127-34.
- Wells CL, Maddaus MA, Reynolds CM, Jechorek RP, Simmons RL. Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. *Infect Immun.* 1987;55(11):2689-94.
- Whitt DD, Savage DC. Kinetics of changes induced by indigenous microbiota in the activity levels of alkaline phosphatase and disaccharides in small intestinal enterocytes in mice. *Infect Immun.* 1980;29:144-51.

- Whitt DD, Savage DC. Influence of indigenous Microbiota on Amount of Protein and activities of Alkaline Phosphatase und Disaccharidases in extracts of intestinal mucosa in mice. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42(3):513-20.
- Williams RC, Showalter R, Kern F Jr. In-vivo effects of bile salts and cholestyramine on intestinal anaerobic bacteria. *Gastroenterol.* 1975;69:483-91.
- Winner L III., Mack J, Weltzin R, Mekalanos JJ, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. New model for analysis of mucosal immunity: Intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect Immun.* 1991;59:977-82.
- Wolf JL, Rubin DH, Finberg R, Kauffman RS, Sharpe AH, Trier JS et al. Intestinal M-cells: A pathway for entry of reovirus into the host. *Science.* 1981;212:471-2.
- Wostman BS. In: *The Germfree Animal in Research* (Coates ME ed.). Academic Press. 1968; pp.197-209.
- Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) -binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med.* 1989;170:1231-41.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *Science.* 1990;249:1431-3.
- Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS) - binding Protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* 1994;180:1025-35.
- Wurfel MM, Monks BG, Ingalls RR, Dedrick RL, Delude R, Zhou D et al. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)- binding protein gene leads to profound suppression of LPS response ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J Exp Med.* 1997;186(12):2051-6.
- Wurfel MM, Wright SD. Lipopolysaccharid-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J Immunol.* 1997a;158:3925.
- Yu B, Wright SD. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem.* 1996;271:4100-5.
- Zagulski T, Lipinski P, Zagulska A, Broniek S, Jarzabek Z. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *E. coli* in experimental infection in vivo. *Br J Exp Pathol.* 1989;70:697-704.
- Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetic conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* 2001;107:13-19.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau Professor M. Krüger für die Überlassung des Themas und für Ihre Hilfe beim Entstehungsprozess dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schrödl, der durch sein umfangreiches Wissen, seinen Optimismus und durch seine Hartnäckigkeit wesentlich dazu beigetragen hat, diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Ich danke Frau Professor Schütt für die Zurverfügungstellung des Tiermaterials, und Herrn Professor Wieler für die Untersuchung der Bakterienstämme.

Warmen Dank auch den „Labormädels“ des Institutes für Bakteriologie und Mykologie, ohne die die Laborarbeit nur halb so spannend und lustig gewesen wäre.

Danke auch an alle Freunde, insbesondere an meinen „Leidensgenossen“ Thomas. Ich werde nie unsere Zeit mit „Michel aus Lönneberga“ und den unzähligen Plattenstapeln vergessen.

Zum Entstehen dieser Arbeit, ihrem doch noch stattfindenden Ende und ihrem Erfolg haben meine Eltern, meine Schwester und meine Großeltern durch mehrmaliges Lesen (die Armen!), seelisch-moralische und finanzielle Hilfe beigetragen.

Der letzte und damit größte Dank gilt meinem Mann. Da seine Leistungen nicht in Worte fassbar sind, werde ich versuchen, ihm mit meiner Liebe jeden Tag meinen Dank spüren zu lassen.