

# Ernährung 2006

---

## Wirkmechanismen von Probiotika

Berlin

2. Juni 2006

---

Michael Blaut

Department of Gastrointestinal Microbiology

Deutsches Institut für Ernährungsforschung



German Institute of Human Nutrition



# Was sind Probiotika?

---

**Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die die Gesundheit des Wirtes günstig beeinflussen, indem sie die normale Darmflora verbessern.**

**(Fuller 1989)**

Da man davon ausgeht, dass sich die Wirkung von Probiotika nicht ausschließlich über die Beeinflussung der Intestinalflora entfaltet, sondern u. a. auch über die Modulation immunologischer Parameter sowie von Funktionen der Darmschleimhaut, wurden allgemeinere Definitionen vorgeschlagen.

**Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die nach exogener Zufuhr aktiv und in ausreichender Menge ihren Wirkort (meist das Kolon) erreichen und Gesundheit (und Wohlbefinden) positiv beeinflussen.**

# Probiotische Mikroorganismen

---

## Laktobazillen

*Lactobacillus acidophilus* (La7)  
*Lactobacillus johnsonii* (La1)  
*Lactobacillus casei* (Shirota, Actimell)  
*Lactobacillus rhamnosus* (LGG)  
*Lactobacillus bulgaricus*  
*Lactobacillus gasseri*  
*Lactobacillus reuteri*  
*Lactobacillus plantarum*

## Sonstige

*Saccharomyces cerevisiae* („boulardii“)  
*Escherichia coli* (Nissle)

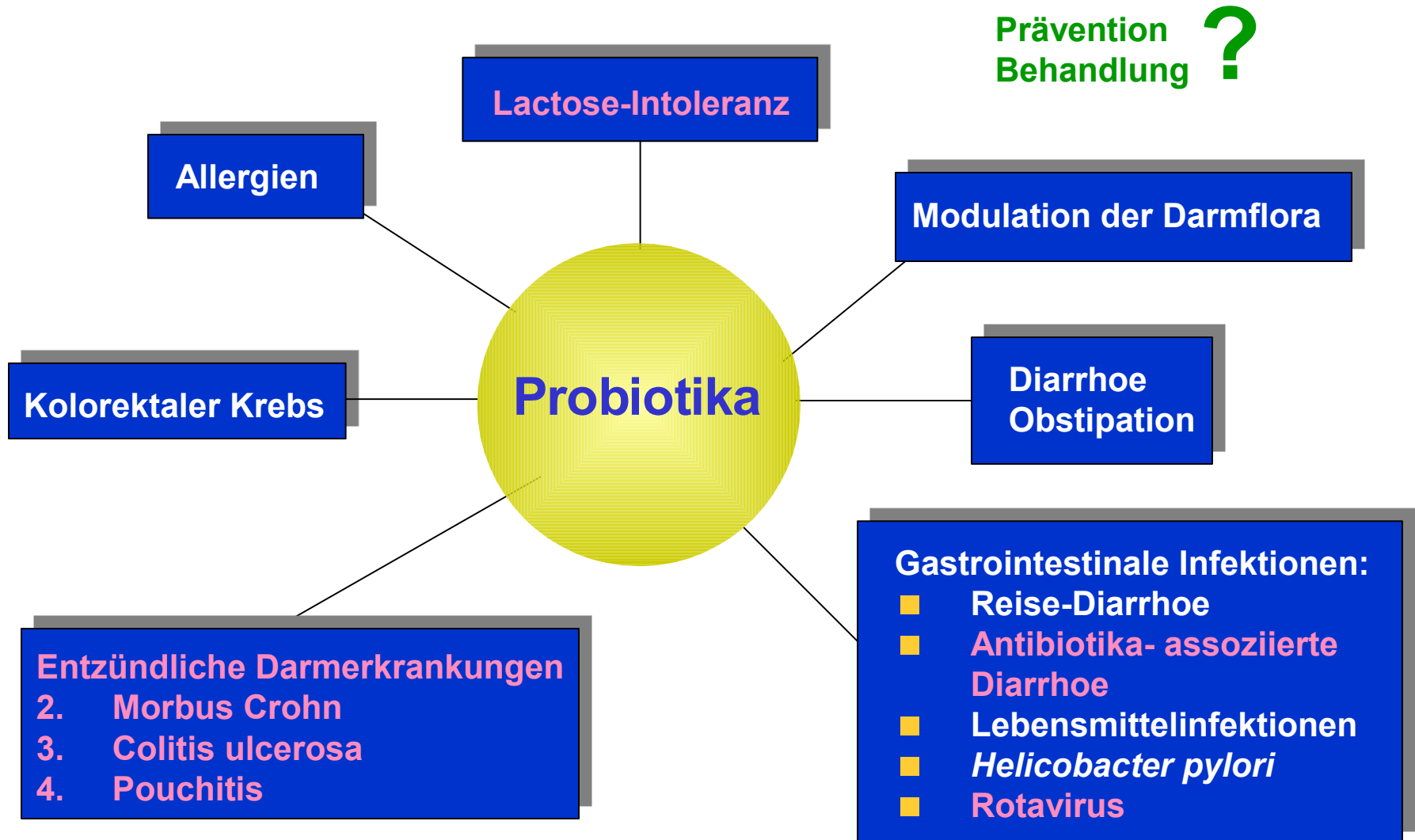
## Bifidobakterien

*Bifidobacterium lactis* (BB12)  
*Bifidobacterium longum* (BB536)  
*Bifidobacterium bifidum*  
*Bifidobacterium infantis*  
*Bifidobacterium breve*  
*Bifidobacterium adolescentis*

## Lakto- und Enterokokken

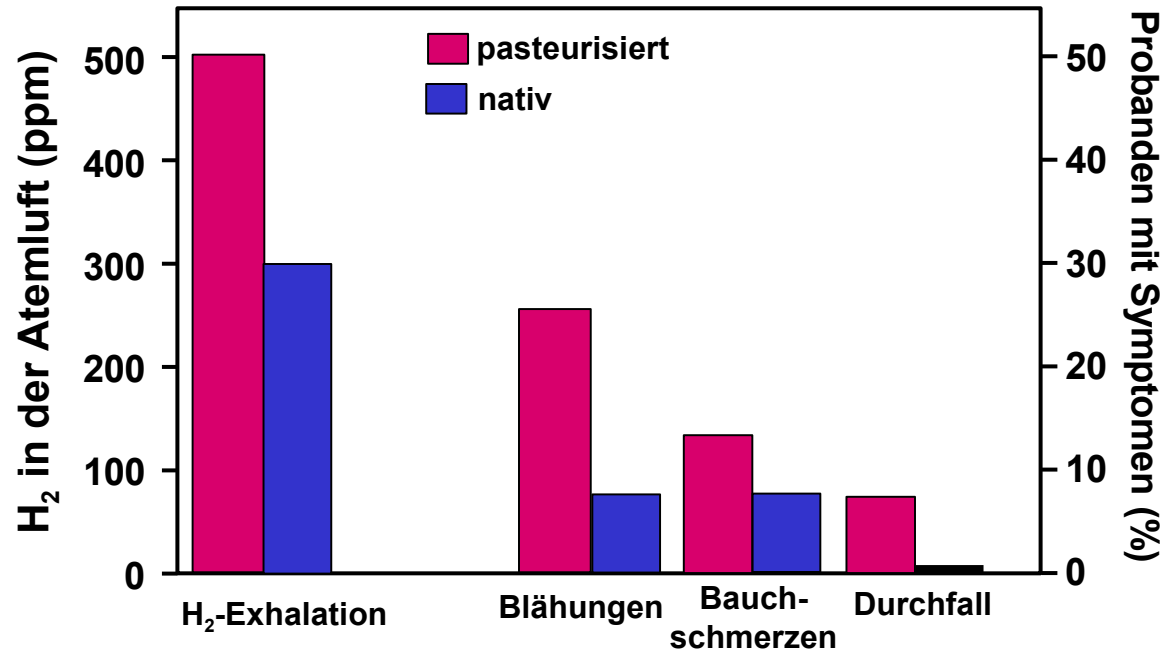
*Lactococcus cremoris*  
*Lactococcus lactis*  
*Streptococcus thermophilus*  
*Enterococcus faecium*

# Postulierte Wirkungen von Probiotika



# Verminderung von Lactose-Intoleranz-Symptomen

Ballongue et al. 1993. Lait 73:249

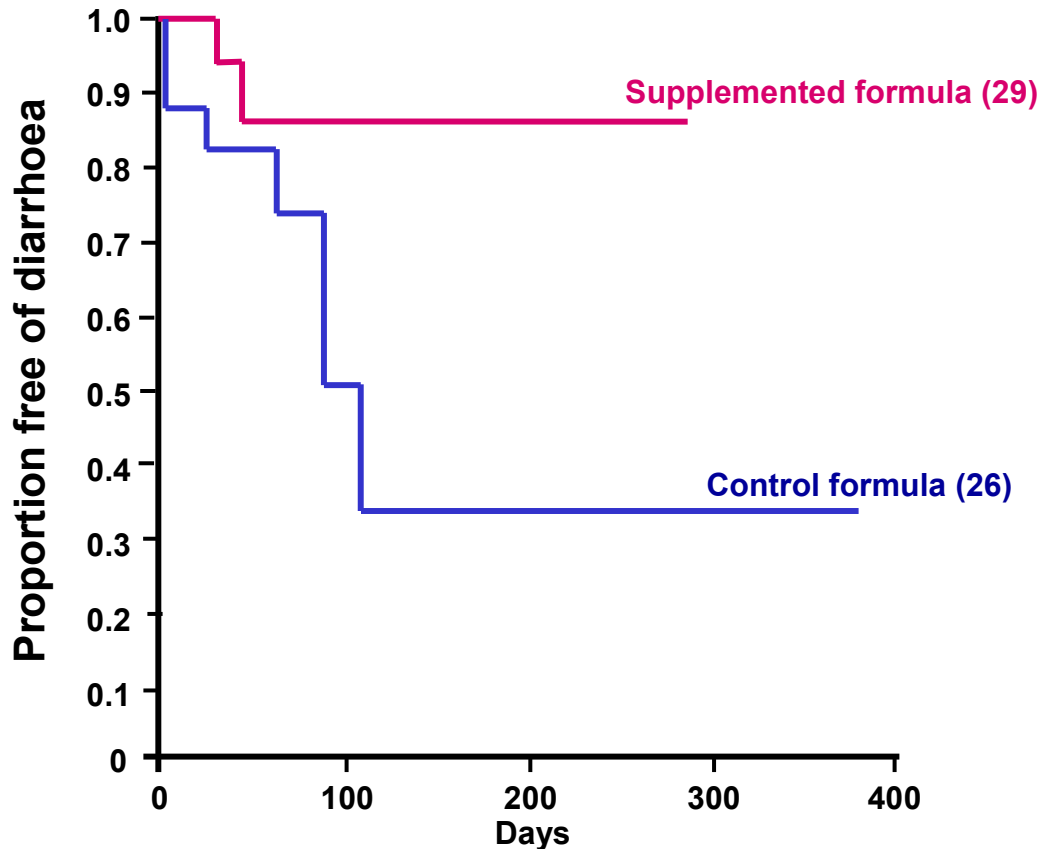


H<sub>2</sub>-Konzentration in der Atemluft und Symptome der Lactose-Intoleranz nach Verzehr eines pasteurisierten oder nativen Sauer Milchprodukts (mit *Lactobacillus lactis* und 20 g Lactose).



Durch die Zufuhr bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase vermindern sich die Symptome der Lactose-Intoleranz (nicht auf Probiotika beschränkt).

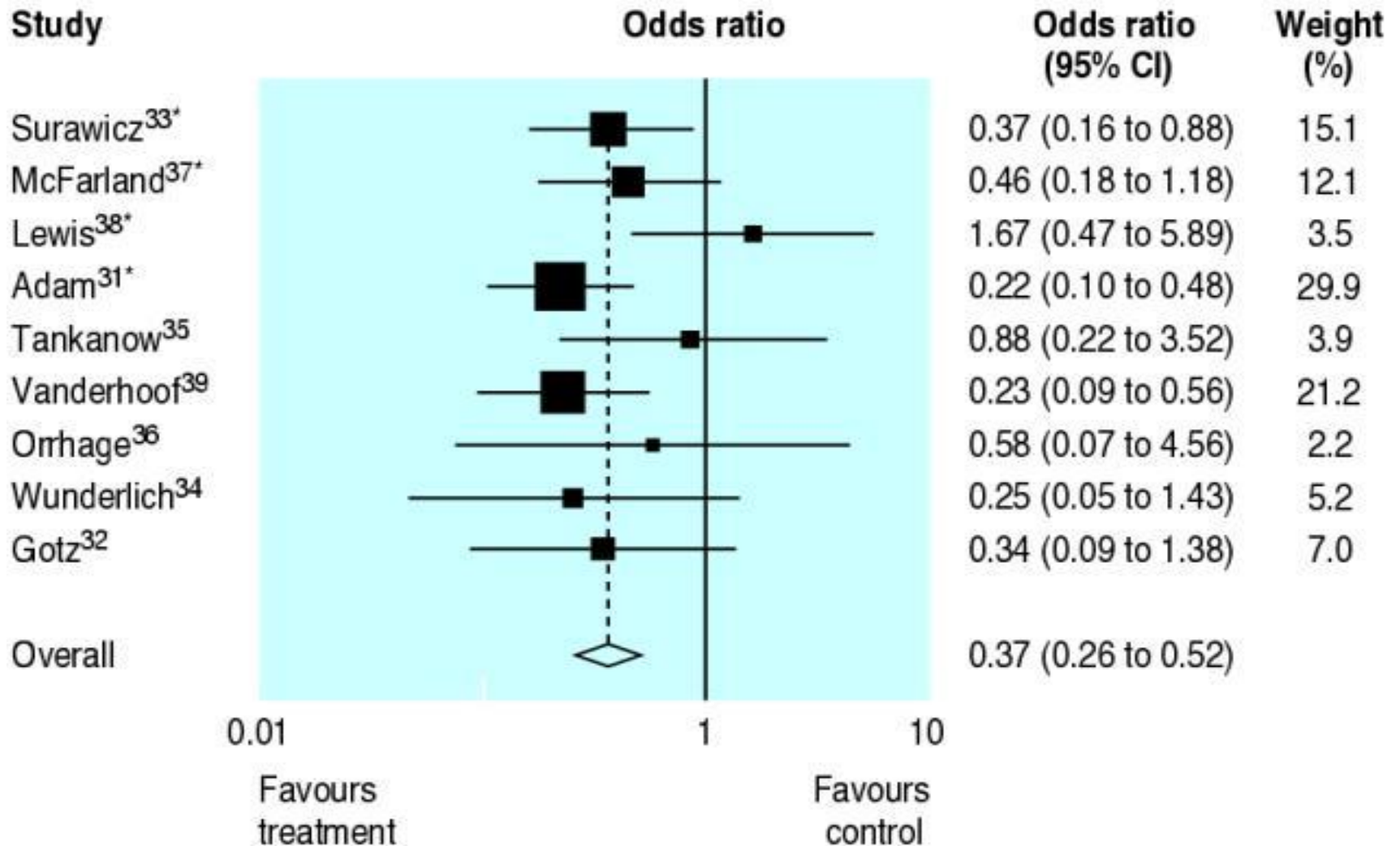
# Durch Rotaviren verursachte Durchfälle bei Säuglingen



Kumulative Inzidenz von Diarrhoe in 5 bis 24 Monate alten Säuglingen, die mit *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* supplementiert wurden oder nicht.

# Prävention von Antibiotika-assoziierten Durchfällen

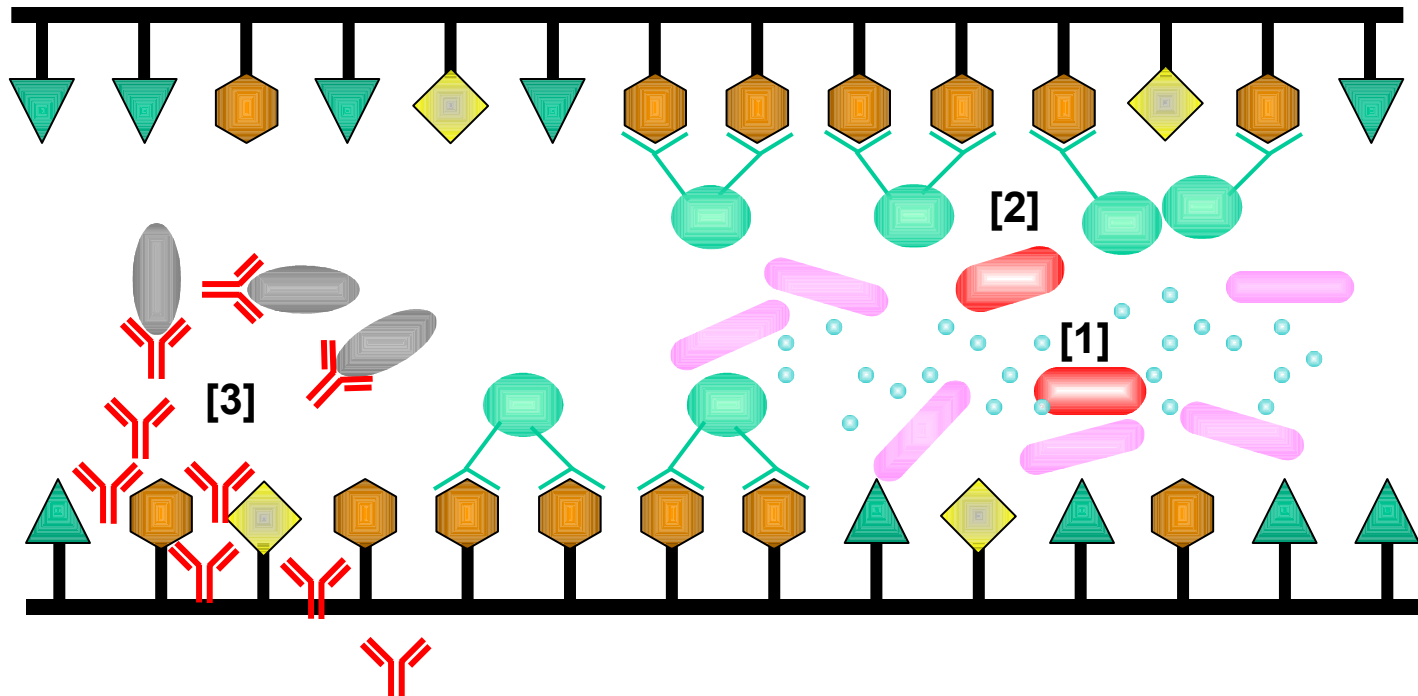
D'Souza et al. 2002. Brit Med J



# Mögliche Wirkmechanismen

## Gastrointestinale Infektionen

- Bildung antibakterieller Substanzen: Lactat,  $H_2O_2$ , Bakteriozine [1]
- Verhinderung der Adhäsion von Pathogenen [2]
- Modulation der Immunantwort (angeborene und adaptive Immunität) [3]





# Verhinderung der Adhäsion von Rotaviren

---

**Bakterien induzieren Änderungen im Glykosylierungsmuster von Epithelzellen im Tiermodell (Bry et al. 1996. Science 273:1380)**

**Freitas et al. 2002. Histochem Cell Biol 118:141**

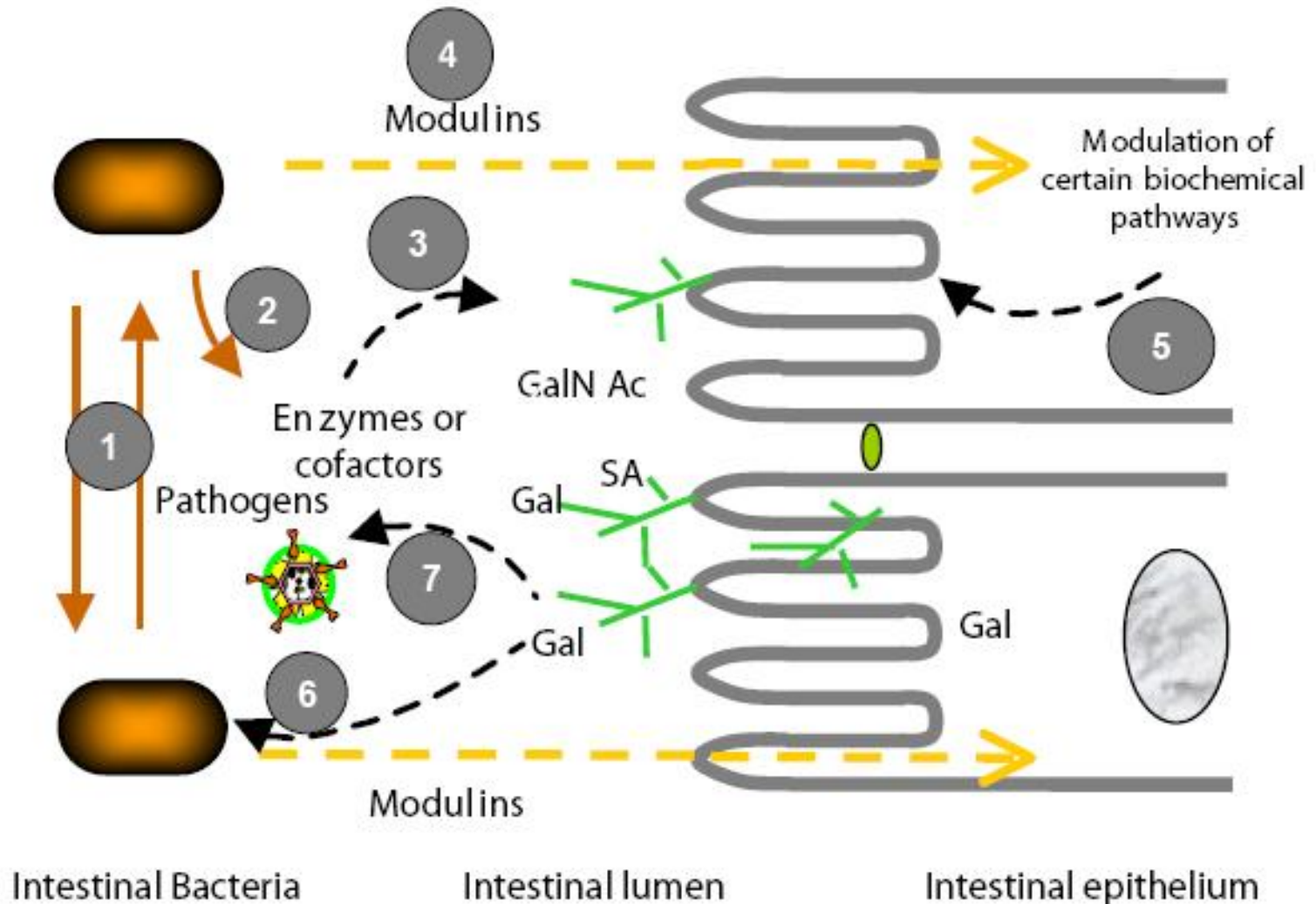
**Freitas et al. 2001. Cellular Microbiol 3:289**

***Bacteroides thetaiotaomicron* strain VPI-5482 produziert einen hitzeempfindlichen Faktor, der spezifisch die Galactosylierung von HT29-MTX-Zellen bewirkt.**

**In ähnlicher Weise induzieren Überstände des probiotischen Stammes *Lactobacillus casei* DN-114-001 die Galactosylierung von HT29-MTX-Zellen**

**Lösliche Faktoren beider Bakterien vermindern stamm-spezifisch die Anzahl der mit Rotavirus infizierten HT29-MTX-Zellen, indem sie das Glykosylungsmuster der Epithelzellen ändern**

# Modulation des Glycosylierungsmusters



# Modulation der Immunantwort

---

## Beeinflussung von Parametern der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr

- **Steigerung der Aktivität von Phagozyten und Makrophagen**
- **Stimulierung der Produktion spezifischer Antikörper (IgA, IgG)**
- **Freisetzung von Zytokinen**
- **Freisetzung von antibakteriellen Substanzen**

# Induktion von Defensinen (1)

---

Ayabe et al. 2000. Nat Immunol 1:99

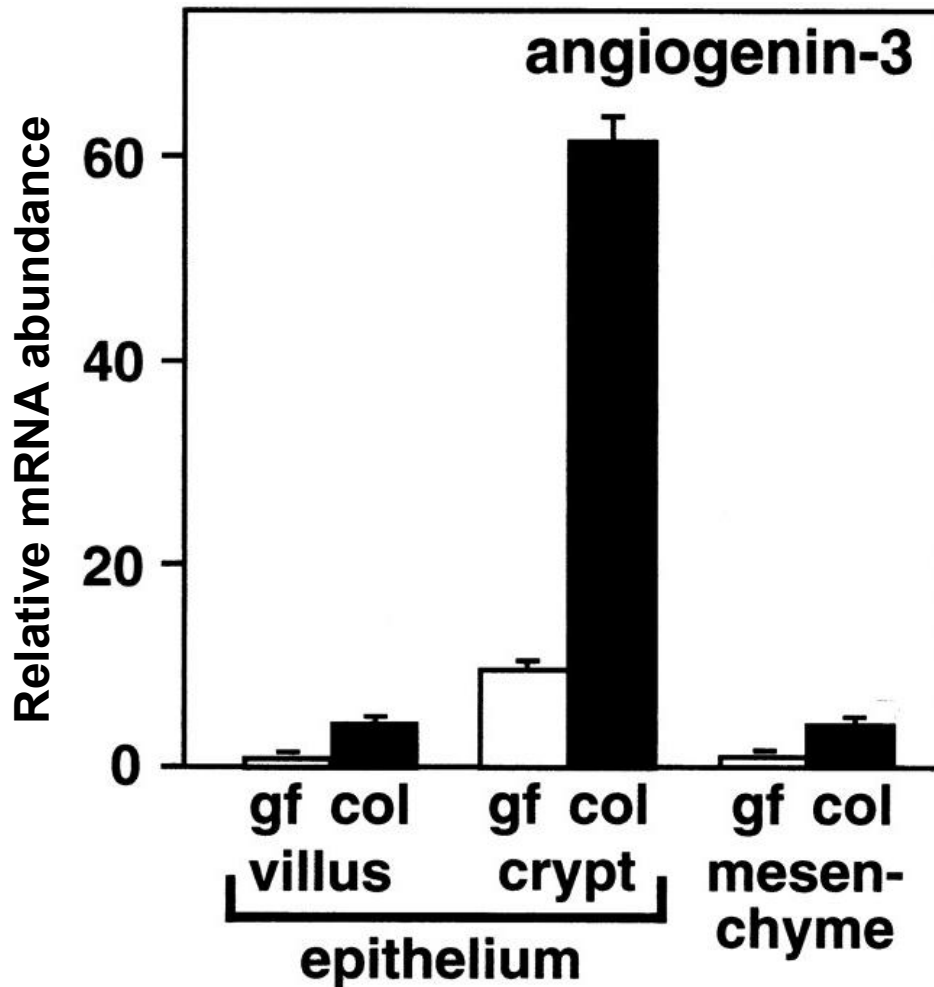
Oulette et al. 1994. Infect Immun 62:5040

- Paneth-Zellen in den Krypten von Mäusen, die mit Bakterien oder bakteriellen Antigenen in Berührung gekommen sind, sezernieren mikrobiozide Peptide

$\alpha$ -Defensine  $\longrightarrow$  Cryptdine

- 70 % der freigesetzten bakteriziden Peptide sind  $\alpha$ -Defensine
- Gram-negative Bakterien, Gram-positive Bakterien, Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäuren, Lipid A und Muramydipeptid bewirken eine Cryptidin-Sekretion.
- Paneth-Zellen produzieren darüber hinaus noch weitere antimikrobielle Peptide

# Induktion von Defensinen (2)



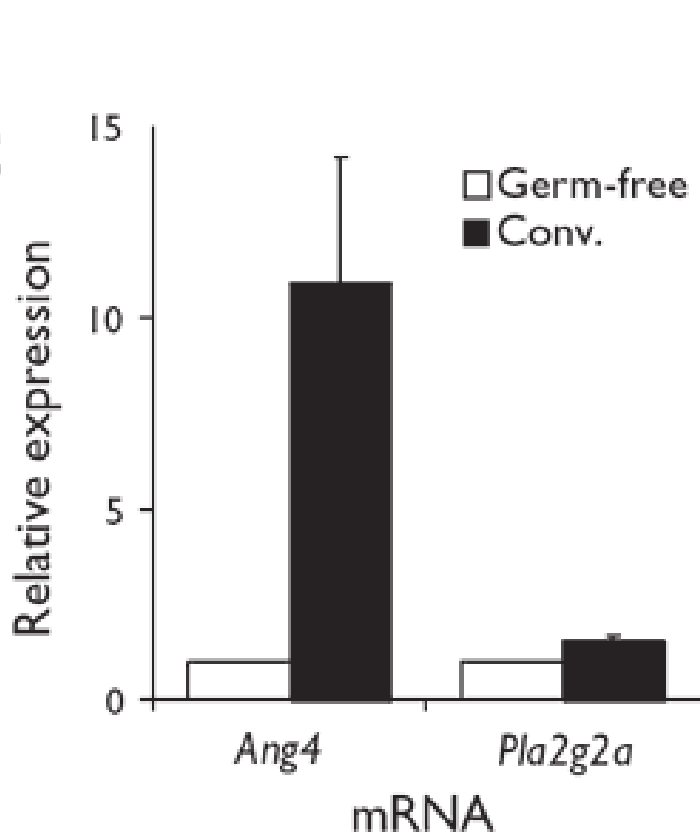
Die Besiedlung von keimfreien Mäusen mit *B. thetaiotaomicron* bewirkt eine Zunahme von **Angionin-3** mRNA, wobei die Expression in den Krypten der besiedelten Tiere am höchsten ist

Eine spätere Analyse zeigte, dass beobachtete mRNA eher ein Transkript des **Angionin-4**-Gens als eines des **Angionin-3**-Gens ist (83% Sequenzidentität).

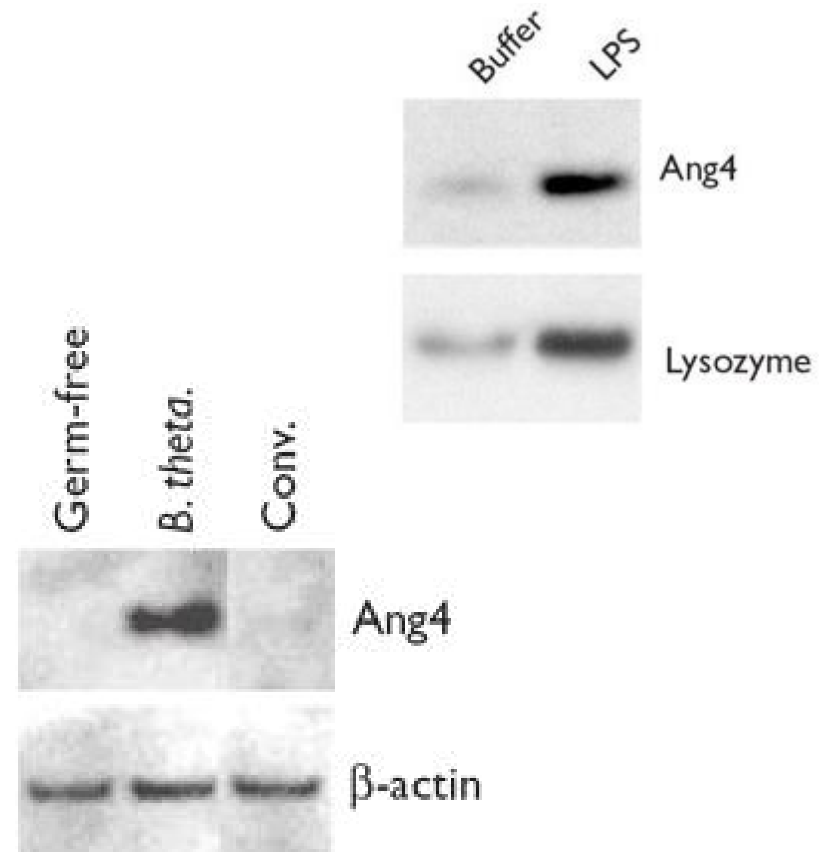
➔ **Komponente der angeborenen Immunität**

Hooper et al. 2001. *Science* 291:881

# Ang4 wird durch Bakterien und LPS induziert

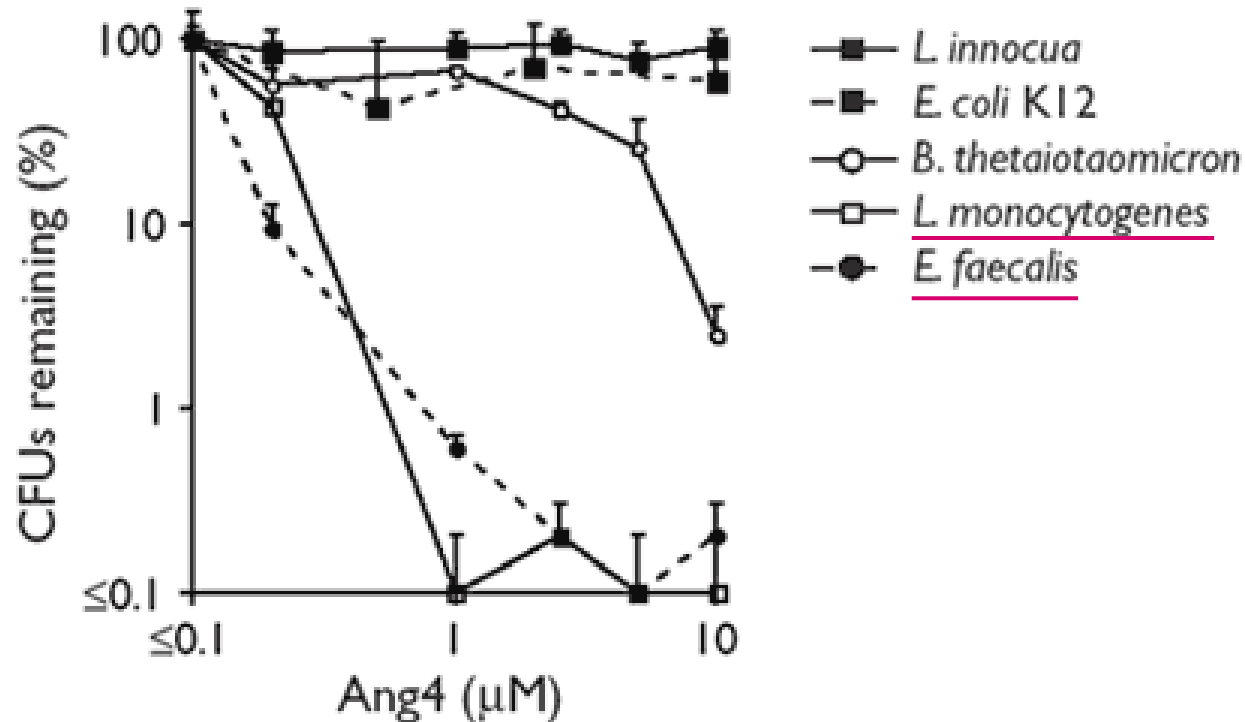


q-RT-PCR analysis in laser-capture-microdissected Paneth cells



Immunoblot analyses

# Ang 4 hat bakterizide Eigenschaften



Anteil überlebender Zellen (CFU) verschiedener pathogener Bakterien 2 h nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ang4

# Probiotika und entzündliche Darmerkrankungen

---

- **Die Gabe von Laktobazillen verhindert in IL-10-defizienten Mäusen Colitis** (Madsen et al. 1999. Gastroenterology 116:1107-1114; Veltkamp et al. 1999. Gastroenterology 116: A83). **Tierstudie**
- **Die Remissionserhaltung in Colitis-ulcerosa-Patienten, die durch *E. coli* Nissle bewirkt wird, ist mit der Standardbehandlung vergleichbar** (Kruis et al. 1997. Aliment Pharmacol Ther 11: 853; Rembacken et al. 1999. Lancet 354: 635; Kruis et al. 2001. Gastroenterology 120: A127). **Humanstudie**
- **Die orale Gabe einer Mischung von acht verschiedenen Stämmen von Milchsäurebakterien (VSL3) konnte das Wiederauftreten einer chronischen Pouchitis in Patienten verhindern.** (Gionchetti et al. 2000. Gastroenterology 119:305). **Humanstudie**



# Mögliche Wirkmechanismen von Probiotika (1)

---

## Entzündliche Darmerkrankungen

### ■ Abbau von Antigenen

**Pessi et al. 1998.** Probiotics reinforce mucosal degradation of antigens in rats: implications for therapeutic use of probiotics. *J Nutr* 128: 2313-2318.

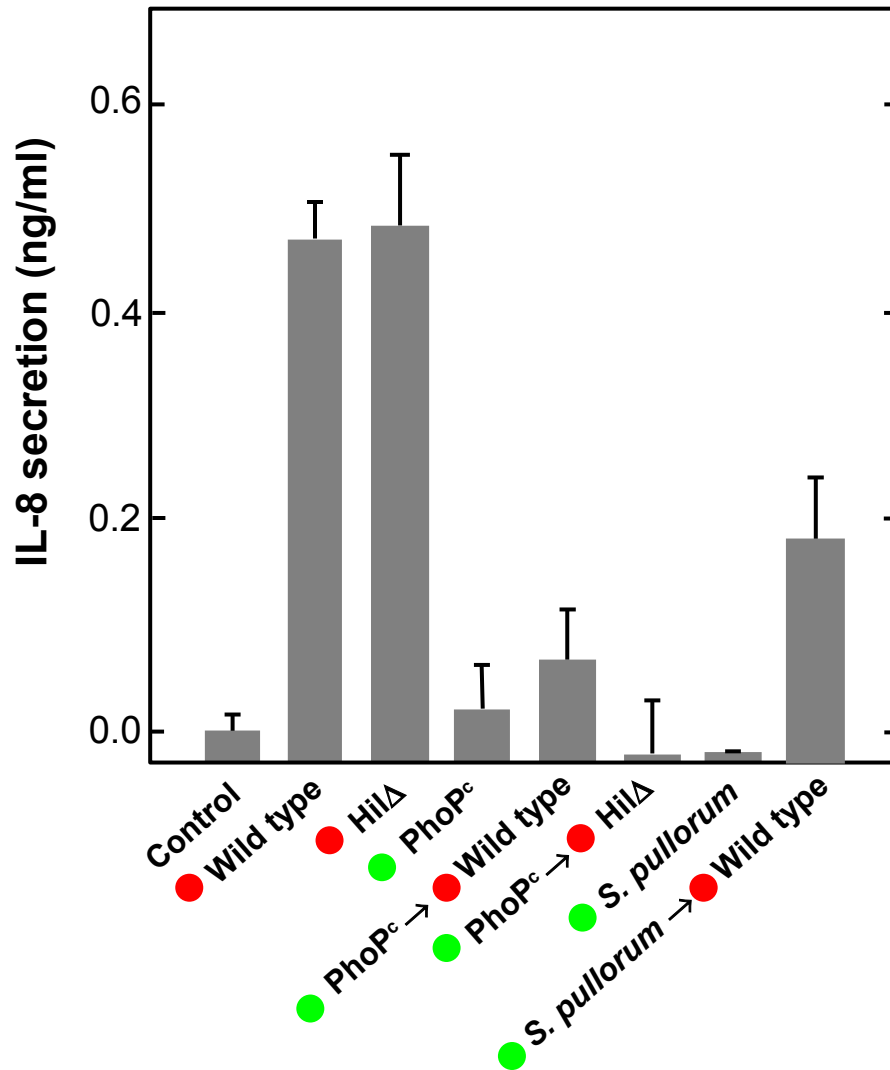
### ■ Herabregulation inflammatorischer Cytokine

**Schultz et al. 2000.** Oral administration of *Lactobacillus* GG induces an antiinflammatory Th2-mediated immune response towards intestinal organisms. *Gastroenterology* 118: A4180.

**Neish et al. 2000.** Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* 289: 1560.

**Borrueel et al. 2002.** Increased mucosal tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 51: 659.

# Abschwächung der Entzündungsantwort (1)



**Apathogene *Salmonella*-Stämme schwächen die Entzündungsantwort ab (IL-8-Sekretion)**

**T84-Zellen** wurden 1 h lang apikal mit den angegebenen Bakterien inkubiert

In einigen Experimenten wurde anschließend ein weiterer Stamm zugegeben

Interleukin 8 wurde mit ELISA bestimmt

● Pathogener Stamm

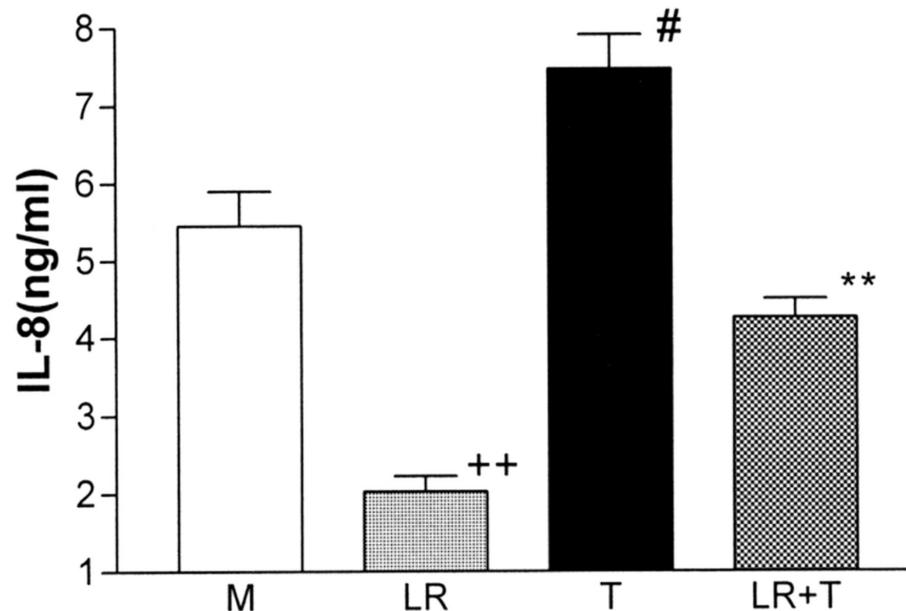
● Apathogener Stamm

# Abschwächung der Entzündungsantwort (2)

## ■ Hemmung der durch $\text{TNF}\alpha$ ausgelösten Bildung von IL 8

Ma et al. 2004. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect of  $\text{TNF}\alpha$ -induced interleukin-8 expression. Infect Immun 72: 5308-5314.

### Intrazelluläre IL-8-Akkumulation in T84-Zellen



M = Medium  
LR = *Lactobacillus reuteri*

ST = *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*  
LR = *Lactobacillus reuteri*

T =  $\text{TNF}\alpha$

# Abschwächung der Entzündungsantwort (3)

---

## ■ Mechanismus der Hemmung der IL-8-Bildung

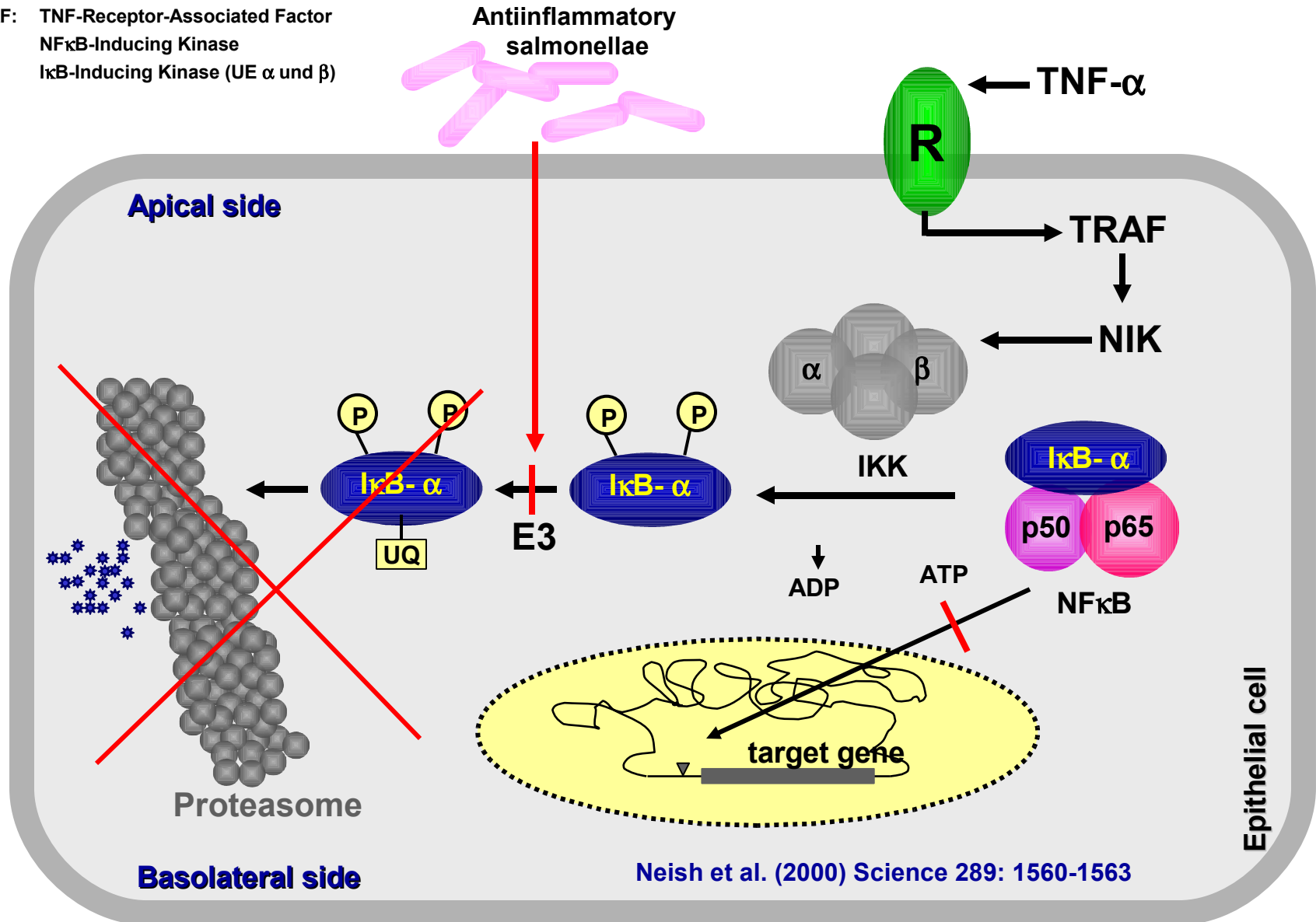
*Lactobacillus reuteri* verhindert die TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-Translokation in den Kern durch Hemmung des I $\kappa$ B-Abbaus und somit die Expression von proinflammatorischem IL-8 (Experiment an HeLa-Zellen)

**Weder Bakterienlysate noch hitzeinaktivierte Bakterien lösen diesen Effekt aus**

**Ma et al. 2004.** Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect of TNF $\alpha$ -induced interleukin-8 expression. Infect Immun 72: 5308-5314.

# Abschwächung der Entzündungsantwort (4)

TRAF: TNF-Receptor-Associated Factor  
NIK: NF $\kappa$ B-Inducing Kinase  
IKK: I $\kappa$ B-Inducing Kinase (UE  $\alpha$  und  $\beta$ )

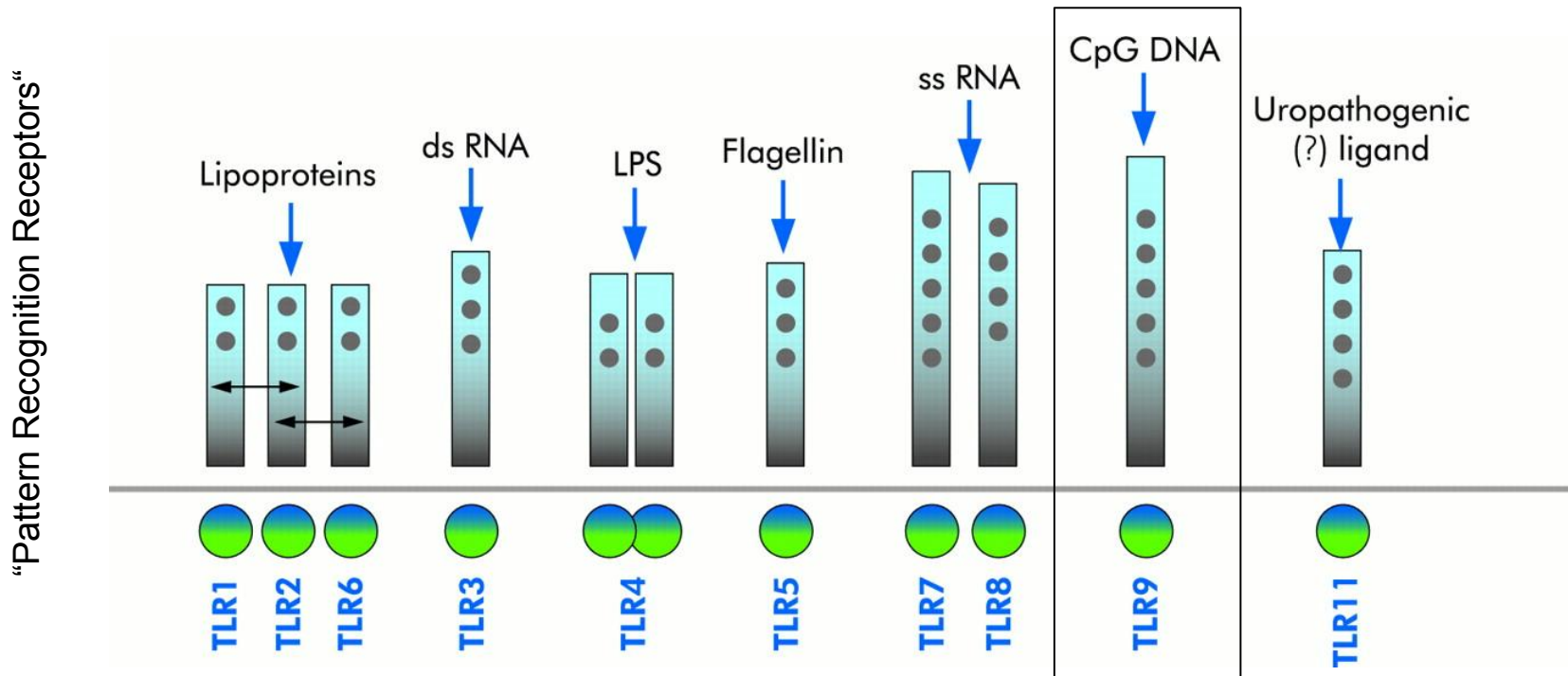


# Abschwächung der Entzündungsantwort (5)

## ■ Protektive Effekte durch TLR-9-Signalling

Rachmilewitz et al. (2004): Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126: 520-5288

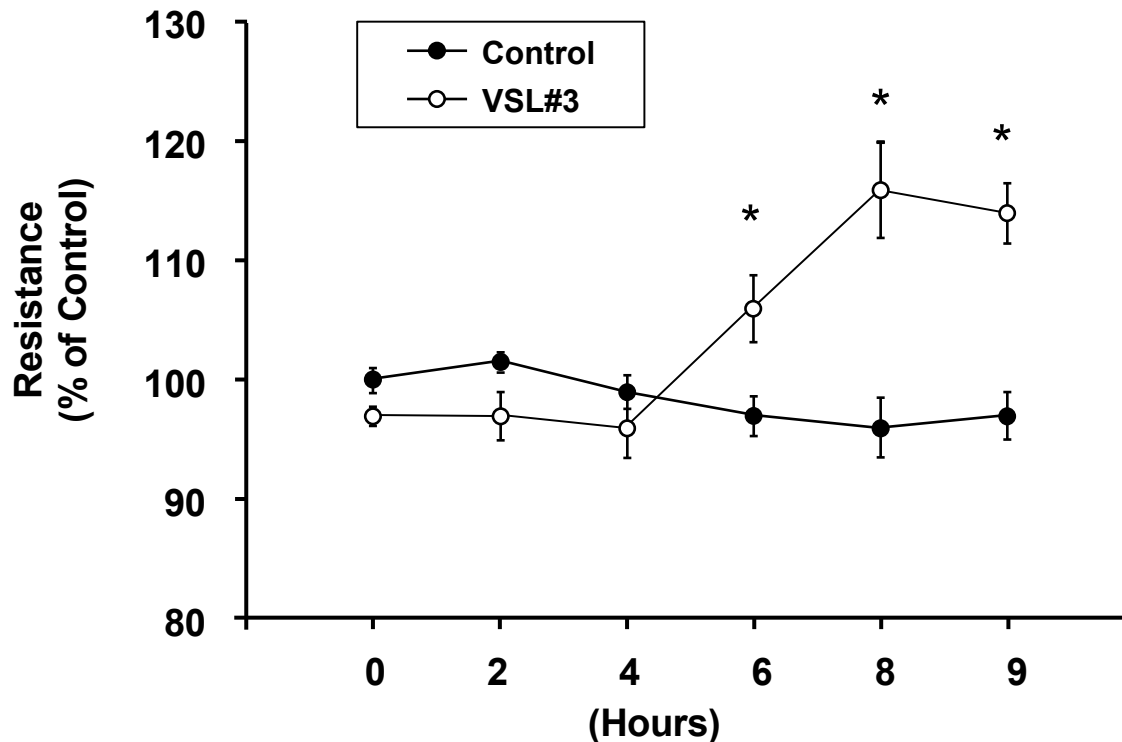
Im DSS-, TNBS- und IL-10<sup>-/-</sup>-Mausmodell genügt bakterielle DNA (VSL#3 und *E. coli*), um diesen Effekt auszulösen. TLR-9<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen diesen Effekt nicht.



# Mögliche Wirkmechanismen von Probiotika (2)

## Entzündliche Darmerkrankungen

### ■ Verringerung der intestinalen Permeabilität



**Madsen et al. 2001.** Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal barrier function. *Gastroenterology* 121: 580-591.

# Schlussfolgerungen

---

1. Bestimmte Probiotika verbessern die Symptome oder den Verlauf bestimmter Erkrankungen wie Lactose-Intoleranz, Rotavirus-Diarrhoe, Antibiotika-assoziierte Diarrhoe und entzündlicher Darmerkrankungen.
3. Die Wirkmechanismen von Probiotika sind weitgehend unbekannt. Die Kenntnis dieser Mechanismen könnte die Glaubwürdigkeit des probiotischen Konzepts erheblich verbessern.
5. Die durch Probiotika verbesserte Lactoseverträglichkeit lässt sich auf die Zufuhr bakterieller  $\beta$ -Galactosidase zurückführen.
7. Die durch Probiotika induzierte Änderung der Glycosylierungsstruktur der Epithelzellen könnte die geringere Inzidenz von Rotavirusinfektionen erklären.
9. Die Fähigkeit von Probiotika zur Bildung von Bakteriozinen und zur Induktion von Cryptidinen in Paneth-Zellen könnten einen Beitrag zur Abwehr von pathogenen Bakterien leisten.
11. Die Komponenten des angeborenen Immunsystems spielen bei der Abschwächung der Entzündungsantwort durch probiotische Bakterien vermutlich eine wichtige Rolle.