

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt
&
dem Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institutsleiter: Prof. Dr. D.J. Schendel

Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Signalgebung dendritischer Zellen



HelmholtzZentrum münchen
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anastasia Schneider

aus

Moskau

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Konrad Trülzsch
Priv. Doz. Dr. Bianca Schaub

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. biol. hum. A. Zobywalski

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2009

This here's a re-search laboratory. Re-search means look again, don't it? Means they're looking for something they found once and it got away somehow, and now they got to re-search for it?

Kurt Vonnegut, Jr. „Cat's Cradle“

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Probiotika	1
1.2 Dendritische Zellen (DZ)	3
1.2.1 Herkunft und Generierung.....	4
1.2.2 Antigenpräsentation und Polarisierung von T-Zellen.....	5
1.3 Das mukosale Immunsystem des Darmes	9
2. ZIELSETZUNG	13
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Material	14
3.1.1 Probanden.....	14
3.1.2 Buffy Coat.....	14
3.1.3 Probiotische Bakterienstämme.....	14
3.1.4 Lösungen und Reagenzien (Chemikalien, Puffer, Medien).....	14
3.1.5 Stimulantien und Zytokine.....	15
3.1.6 Antikörper.....	16
3.1.7 Geräte und Software.....	17
3.1.8 Glas- und Plastikmaterial.....	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Generierung dendritischer Zellen.....	19
3.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Buffy Coat.....	19
3.2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	20
3.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	20
3.2.1.4 Anreicherung humaner Monozyten.....	20
3.2.1.5 Generierung immaturer DZ aus Monozyten.....	20
3.2.2 Ansetzen der probiotischen Kulturen und UV-Inaktivierung.....	21
3.2.3 DAPI-Färbung.....	22
3.2.4 Stimulation der DZ durch UV-inaktivierte Probiotika.....	23
3.2.5 Vitalfärbung.....	25
3.2.6 Stimulation der DZ durch lebende Probiotika.....	28
3.2.7 Durchflusszytometrie.....	29
3.2.8 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen (Bio-Plex).....	36
3.2.9 Statistische Auswertung.....	39
4. ERGEBNISSE	41
4.1 Generierung dendritischer Zellen	41
4.1.1 Etablieren der Methode.....	41
4.1.1.1 Austesten des peripheren Blutes versus Buffy coat.....	41
4.1.1.2 Austesten des Humanserums.....	42
4.1.1.3 Austesten der verschiedenen Positivkontrollen.....	42
4.1.2 DZ-Population und Kontaminanten.....	42
4.1.3 4-Farben Durchflusszytometrie.....	44
4.2 Stimulation durch UV-inaktivierte Probiotika	45
4.2.1 Vorversuche.....	45
4.2.2 Charakterisierung der Zellpopulationen.....	45
4.2.3 Maturationsmarker an der Oberfläche von DZ.....	46
4.2.3.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ.....	48
4.2.3.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ.....	49
4.2.3.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ.....	50

4.2.3.4 Stimulation mit 50 und 1000 Bakterien pro DZ.....	51
4.2.4 Analyse der Zytokinproduktion.....	53
4.2.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ.....	55
4.2.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ.....	56
4.2.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ.....	57
4.2.4.4 Stimulation mit 50 und 1000 Bakterien pro DZ.....	58
4.2.5 Dosisabhängige Effekte der UV-inaktivierten Probiotika.....	60
4.2.6 Korrelationsanalyse und Clustering.....	62
4.3 Stimulation durch lebende Probiotika.....	66
4.3.1 Auszählung der lebenden probiotischen Bakterien.....	66
4.3.2 Charakterisierung der Zellpopulationen.....	67
4.3.3 Maturationsmarker an der Oberfläche von DZ.....	67
4.3.3.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ.....	70
4.3.3.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ.....	70
4.3.3.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ.....	71
4.3.4 Analyse der Zytokinproduktion.....	72
4.3.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ.....	74
4.3.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ.....	75
4.3.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ.....	76
4.3.5 Dosisabhängige Effekte der lebenden Probiotika.....	77
4.3.6 Korrelationsanalyse und Clustering.....	77
4.4 Vergleich UV-inaktivierter versus lebende Probiotika.....	80
4.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ.....	80
4.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ.....	83
4.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ.....	87
5. DISKUSSION.....	89
5.1 Auswahl der Methoden.....	89
5.1.1 Generierung dendritischer Zellen.....	89
5.1.2 CD3-, CD14- und CD1a-positive Zellen.....	89
5.1.3 Zytokinbestimmung (Bio-Plex).....	90
5.1.4 Probiotische Kulturen.....	91
5.2 Phänotyp und Funktionen der DZ.....	92
5.2.1 Maturation durch UV-inaktivierte Probiotika.....	92
5.2.2 Vergleich der Effekte lebender und UV-inaktivierter Probiotika auf DZ.....	94
5.2.3 Tolerogene Wirkung von Probiotika.....	95
5.3 Ausblick: weitere geplante Untersuchungen.....	96
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	100
8. ANHANG.....	113
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	113
8.2 Tabellenverzeichnis.....	115
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	117
8.4 Danksagung.....	119
8.5 Lebenslauf.....	121
8.6 Publikationen und Poster.....	122

1. EINLEITUNG

1.1 Probiotika

Probiotische Bakterien sind nach der Definition von Fuller¹ nicht-pathogene lebende Mikroorganismen, die mit der Nahrung aufgenommen werden und einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Wirtes ausüben sollen. Probiotika kommen in der Darmflora des Menschen vor und besitzen folgende Eigenschaften: Adhärenz an die Epithelzellen des Darmes, Resistenz gegen Magen- und Gallensäuren und Vermehrung im Gastrointestinaltrakt, Reduktion der Adhärenz und des Wachstums pathogener Keime, sowie Produktion von Säuren, Wasserstoffperoxid und Bakteriziden². Des Weiteren müssen diese Bakterien bei der Lagerung und Anwendung zum größten Teil aus lebenden Zellen bestehen und gesundheitlich unbedenklich (nicht-invasiv, nicht-karzinogen, nicht-pathogen und nicht-toxisch) sein³.

Der Begriff „Probiotikum“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „für das Leben“. Am Anfang des 20-sten Jahrhunderts postulierte der russische Wissenschaftler Ilya Metchnikoff als Erster, dass fermentierte Milchprodukte einen günstigen und lebensverlängernden Effekt auf den Menschen haben⁴. In der letzten Zeit nehmen die Untersuchungen der Eigenschaften und der therapeutischen Aspekte von in diesen Produkten enthaltenen Keimen zu.

Es handelt sich bei Probiotika um verschiedene, häufig Milchsäure produzierende Spezies, wie z. B. Laktobazillen, Laktokokken, Bifidobakterien, Streptokokken und Enterokokken⁵, aber auch um einzelne *Bacillus* Arten⁶, nicht-pathogene Pilze, wie *Saccharomyces boulardii*⁷ und *Aspergillus oryzae*⁸. Zu den häufig in Probiotikapräparationen verwendeten Keimen gehören Laktobazillen (*L. acidophilus*, wie z. B. *L. gasseri* und *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. reuteri*/*L. fermentum*), Bifidobakterien (*B. lactis*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. bifidum*, *B. infantis*) und darüber hinaus viele andere Stämme⁹.

Positive Effekte der Probiotikasupplementation wurden bei zahlreichen gastrointestinalen Symptomen bereits dokumentiert. Dazu gehören Laktoseintoleranz¹⁰, infektiöse^{11;12} und Antibiotika-assoziierte^{13;14} Diarrhö, chronische entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn¹⁵ und Colitis ulcerosa¹⁶, Pouchitis^{17;18} und *Helicobacter pylori* Infektionen¹⁹. In Tierversuchen wurde die Reduktion in der Inzidenz von Kolonkarzinomen gezeigt²⁰. Zusätzlich wurden Lipidstoffwechselstörungen²¹, Erkältungen²² und wintertypische Infektionen von Darm oder Atemwegen²³ günstig beeinflusst. *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) und *Saccharomyces boulardii* gehören zu den Probiotika mit der höchsten Zahl von nachgewiesenen positiven Effekten²⁴.

Der kontinuierliche Anstieg atopischer Erkrankungen in den Industrieländern seit Jahrzehnten wird durch eine verminderte mikrobielle Exposition bei der Geburt bzw. in der früheren

Kindheit (die sogenannte „Hygiene-Hypothese“) erklärt²⁵. Diese mikrobielle Stimulation soll u. a. über die intestinale Mikroflora erfolgen²⁶. Anfang der 80er-Jahre postulierten russische Forscher in einer Studie mit 60 atopischen Säuglingen, dass Nahrungsmittelallergien ursächlich mit einer abnormen Darmflora zusammenhängen²⁷. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Darmflora von Säuglingen, die später Atopien entwickelten, schon im Alter von drei Monaten einen signifikant niedrigeren Anteil bifidogener Bakterien aufwies als jene von Kindern, die keine Atopien hatten²⁸. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine probiotische Supplementation antenatal und in der früheren Kindheit die Entstehung und Ausprägung von Allergien positiv beeinflussen könnte. Die erste umfassende Arbeit zum Überprüfen dieser Hypothese wurde 2001 von Kalliomäki et al. veröffentlicht²⁹. In dieser randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie erhielten schwangere Frauen, für deren Baby ein hohes familiäres Atopierisiko bestand, vor dem errechneten Geburtstermin zwei bis vier Wochen lang LGG. Dieses Probiotikum wurde nach der Geburt den Müttern oder den nicht-gestillten Kindern für weitere sechs Monate gegeben. Die Autoren zeigten, dass die Inzidenz der atopischen Dermatitis bei 2-jährigen Kindern in der Probiotikagruppe im Vergleich zur Placebogruppe um 50% reduziert war, während kein Einfluss auf die Häufigkeit der Sensibilisierung bei Kindern bestand. Diese Effekte ließen sich im Alter von vier bzw. sieben Jahren bestätigen^{30;31}. Folgestudien mit einem ähnlichen Design zeigten widersprüchliche Ergebnisse: keine Reduktion in der Inzidenz allergischer Erkrankungen, in der Probiotikagruppe Anstieg der Sensibilisierung und des IgE-assoziierten Ekzems (*L. acidophilus* LAVRI-A1)³², kein Effekt auf die Sensibilisierung, aber bei 2-jährigen Kindern eine Reduktion des Ekzems und des IgE-assoziierten Ekzems (eine Mischung aus vier Probiotika mit Galaktooligosacchariden)³³. In einer dritten Studie wurde kein Effekt der Supplementation mit *L. reuteri* ATCC 55730 auf eine Prävention atopischer Erkrankungen festgestellt³⁴, dafür aber eine Verminderung des IgE-assoziierten Ekzems und der Sensibilisierung in der Probiotikagruppe. Eine vor kurzem abgeschlossene doppelblinde, placebokontrollierte Studie überprüfte die Wirksamkeit von LGG hinsichtlich der primären Vorbeugung atopischer Krankheiten³⁵. Schwangere Frauen erhielten LGG vier bis sechs Wochen vor der Geburt und drei Monate danach, falls sie stillten. Anschließend wurde das Probiotikum den Säuglingen weitere drei Monate verabreicht. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Inzidenz atopischer Dermatitis, der Ausprägung der Atopie, der Gesamt IgE-Konzentration oder der Sensibilisierung zwischen den Probiotika- und Placebogruppen bei Kindern im Alter von 2 Jahren. Zusätzlich wurden in der Probiotikagruppe signifikant

mehr Kinder mit wiederholten Episoden (≥ 5) einer obstruktiven Bronchitis (wheezing bronchitis) festgestellt.

Therapeutische Ansätze mit Probiotika, wie z. B. eine Anwendung von LGG und BB-12 bei Säuglingen mit atopischer Dermatitis^{36;37}, eine Kombinationsbehandlung mit *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 und *Lactobacillus reuteri* bei Kindern mit atopischer Dermatitis und erhöhtem IgE im Serum³⁸, eine Supplementation mit *Lactobacillus fermentum* VRI-033 PCC bei Kindern mit moderater bis schwerer atopischer Dermatitis³⁹ führten zu einer Besserung der klinischen und laborchemischen Parameter. Dagegen hatte bei jungen Erwachsenen mit Pollenallergie (Birke) eine Therapie mit LGG keinen Effekt⁴⁰. Eine doppelblinde, placebokontrollierte Studie zeigte, dass eine Anwendung von *Lactobacillus casei* Shirota die Immunantworten bei Erwachsenen mit allergischer Rhinitis modulierte⁴¹. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Wirksamkeit hitzeinaktivierter Laktobazillen bei Kindern mit allergischer Rhinitis vergleichbar mit der von lebenden Bakterien war⁴². Dies widerspricht den Beobachtungen von Kirjavainen et al., dass bei allergischer Dermatitis nur lebende LGG positiv wirkten⁴³.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der präventiven und therapeutischen Supplementationen mit probiotischen Keimen kontrovers. Verschiedene Wirkungsmechanismen wurden bereits vorgeschlagen⁴⁴⁻⁴⁷, trotzdem wird ein besseres Verständnis für immunologische Effekte der Darmflora dringend benötigt. Aufgrund von fehlenden Beweisen für klinische Vorteile durch die Langzeitsupplementation mit der Säuglingsnahrung zugesetzten Probiotika empfiehlt die ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) Gesellschaft, nur durch Anzüchten und molekulare Methoden identifizierte, auf genetische Stabilität geprüfte und gesundheitlich unbedenkliche bakterielle Stämme der Babynahrung zuzufügen⁴⁸.

1.2 Dendritische Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen wird das Immunsystem in ein angeborenes und adaptives Immunsystem eingeteilt. Zellen des angeborenen Immunsystems (Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten, Neutrophile) agieren schnell, aber unspezifisch gegen Pathogene. Die damit verbundene Kaskade der inflammatorischen Reaktionen ist darauf ausgerichtet, Eindringlinge zu eliminieren. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil dieser Immunantwort, da sie infizierte oder entartete Zellen vernichten⁴⁹. Die Aufgabe des adaptiven Immunsystems besteht darin, körperfremde Moleküle spezifisch zu erkennen und zu entfernen. Dabei gewährleistet das immunologische Gedächtnis beim wiederholten

Kontakt mit dem jeweiligen Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort. T- und B-Lymphozyten spielen im adaptiven Immunsystem eine entscheidende Rolle. B-Zellen sind in der Lage, Antikörper zu produzieren (humorale Immunität), während T-Lymphozyten eine zelluläre Immunantwort induzieren können. Die Einteilung der T-Zellen erfolgt anhand des Oberflächenantigens CD4 bzw. CD8 in CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th) bzw. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Tc). Solange Lymphozyten mit keinem Antigen in Kontakt kommen, werden sie als naive Zellen bezeichnet. T- und B-Lymphozyten besitzen spezifische Antigenrezeptoren (T- bzw. B-Zellrezeptor, TCR bzw. BCR). Diese Rezeptoren erkennen präsentierte Antigene mittels eines Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)/Peptid-Komplexes⁵⁰. Dabei befinden sich die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche jeder kernhaltigen Zelle, während die MHC-Klasse-II-Moleküle ausschließlich von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert werden. Dendritische Zellen (DZ) sind zentrale Schaltstellen des Immunsystems, da sie APZ mit dem größten Potenzial sind und eine adaptive Immunantwort gegen ein Neoantigen auslösen können. Zusätzlich bestimmen sie, zu welchem Effektorotypen naive T-Zellen ausreifen⁵¹.

1.2.1 Herkunft und Generierung

DZ wurden erstmals im Jahre 1973 beschrieben⁵², als Steinman und Cohn aus der Milz von der Maus diese Zellen isolierten und sie aufgrund ihrer lang gestreckten Ausläufer als „dendritische Zellen“ bezeichneten. Bereits 1868 entdeckte der Medizinstudent Paul Langerhans Zellen in der Haut, die er für Nervenzellen hielt⁵³. Sie wurden „Langerhans-Zellen“ genannt und später ebenfalls als eine DZ-Subpopulation charakterisiert⁵⁴.

DZ werden aus den CD34⁺ Vorläuferzellen im Knochenmark *in vivo* generiert⁵⁵ und erreichen durch die Zirkulation im Blut Gewebe, welche potenzielle Eintrittspforten für Pathogene sind (z. B. Epidermis, Lunge, Darm)⁵⁶. Dort patrouillieren DZ im immaturren Zustand, reifen nach der Aktivierung durch infektiöse Stimuli oder inflammatorische Signale aus und migrieren von der Peripherie zu den sekundären lymphatischen Organen, wo die Antigenpräsentation an die naiven T-Zellen stattfindet⁵⁷.

Humane DZ stellen eine heterogene Zellpopulation dar, bestehend aus mindestens fünf Subpopulationen⁵⁸. Beispielsweise erkennen myeloide CD11c⁺/CD1b⁺ DZ bakterielle Antigene, während CD123⁺ plasmazytoide DZ eine Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Viren spielen⁵⁹.

Die Generierung von humanen und murinen DZ *in vitro* erfolgt durch Kultivierung von peripheren Monozyten oder Knochenmarkzellen unter Zugabe des Granulozyten-

Makrophagen koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF). Nachdem Inaba et al. 1992 zeigten, dass GM-CSF ein essentielles Zytokin für die Generierung von DZ ist⁶⁰, wurde eine einfache und verlässliche Methode für die Gewinnung von DZ aus murinem Knochenmark beschrieben⁶¹. Humane DZ konnten aus CD34⁺ hämatopoetischen Vorläufern unter Zugabe von GM-CSF und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) aus dem Knochenmark⁶² und Nabelschnurblut⁶³ generiert werden. Diese Methode war für peripheres Blut aufgrund einer sehr geringen Population von CD34⁺ Zellen (0,1%) ungeeignet. Bereits 1989 wurde gezeigt, dass die Anwendung von humanem rekombinantem Interleukin-4 (IL-4) die Entwicklung von Makrophagen aus mononukleären Zellen des Knochenmarks unter dem Einfluss von GM-CSF reduzierte⁶⁴. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden DZ in einem neuen Ansatz unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 aus peripheren Monozyten generiert^{65;66}. Dies ist momentan die am häufigsten angewandte Methode in funktionellen Versuchen mit humanen DZ.

1.2.2 Antigenpräsentation und Polarisierung von T-Zellen

In der Peripherie des Organismus lokalisierte immature DZ besitzen eine hohe Kapazität zur Antigenaufnahme, welcher dann die Prozessierung und Bildung von MHC/Peptidkomplexen folgt. Hierbei wurden verschiedene Mechanismen der Antigenaufnahme charakterisiert⁶⁷. Durch Makropinozytose können DZ große Mengen der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit aufnehmen und aufkonzentrieren. Des Weiteren ist die rezeptorvermittelte Endozytose über C-Typ Lektine (z. B. Mannoserezeptor DEC-205) von großer Bedeutung⁶⁸. Zusätzlich exprimieren DZ Typ I (CD64) und Typ II (CD32) Fc γ -Rezeptoren, welche Immunoglobulinkomplexe oder opsonisierte Partikel binden können⁶⁹. Ferner sind DZ in der Lage, apoptotische und nekrotische Zellfragmente, Viren, Bakterien und intrazelluläre Parasiten zu phagozytieren^{70;71}. Für die Aufnahme und Verarbeitung von Lipidantigenen ist der CD1-Prozessierungsweg von Bedeutung. Die Expression von vier CD1-Proteinen (CD1a-d Isoformen) ist für humane DZ charakteristisch^{72;73}.

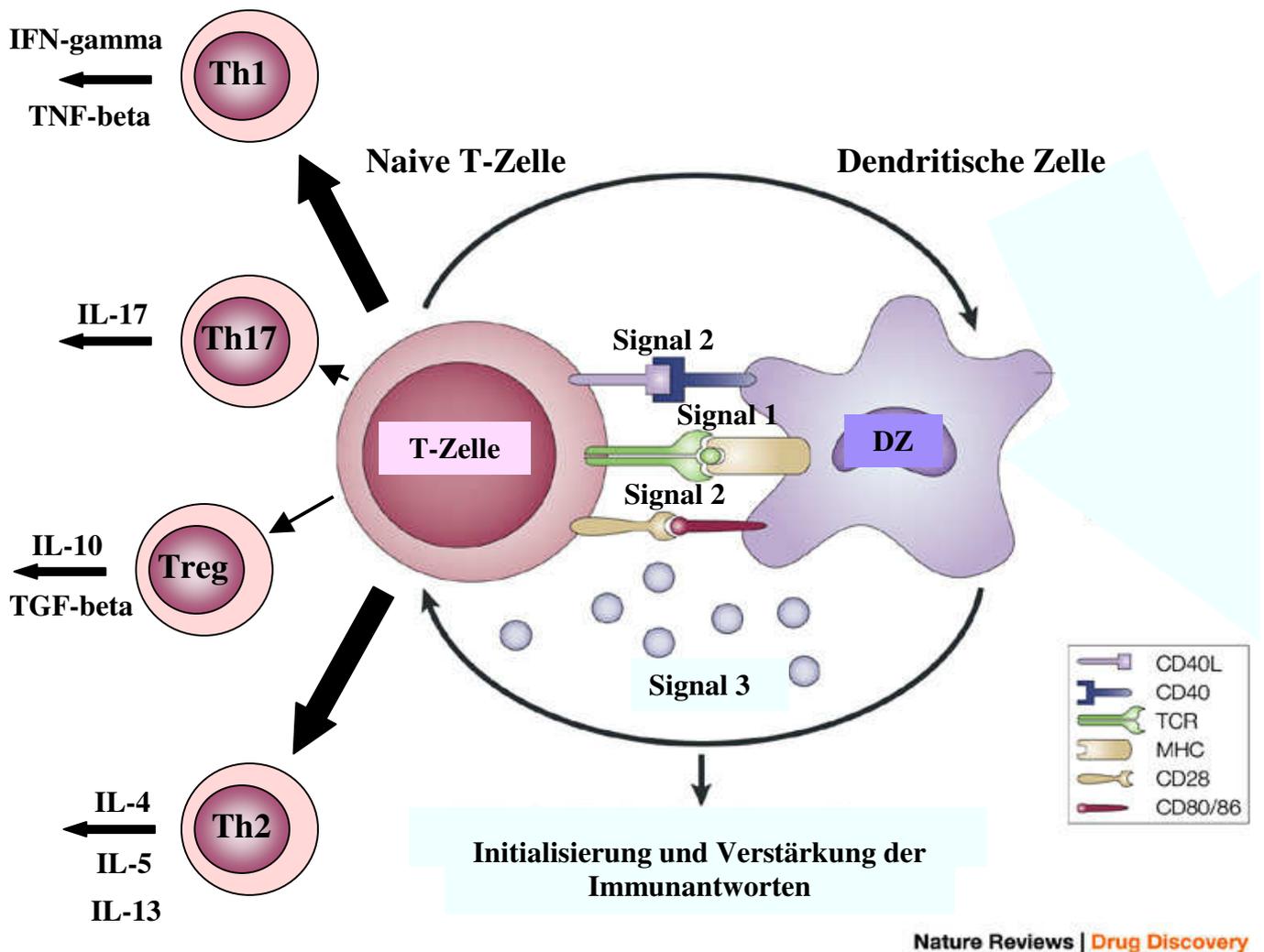
Nach der Aktivierung durch Pathogene oder inflammatorische Faktoren fangen DZ an, sich in einem Prozess, der als „Reifung“ oder „Maturation“ bezeichnet wird, erheblich morphologisch und funktionell zu verändern. Parallel dazu migrieren die Zellen von der Peripherie in die Lymphknoten, wo die Maturation während der DZ-T-Zellen Interaktion beendet wird. Dies wird durch Ausbildung langer zytoplasmatischer Fortsätze, Reduktion der Endozytose und der Phagozytose und Zunahme der Fähigkeit zur Antigenpräsentation, Hochregulation der Adhäsions- und ko-stimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2

(CD86) und CD40, hohe Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und des Chemokinrezeptors CCR7, hohe Produktion von Zytokinen (z. B. IL-12) begleitet^{71;74}. Ein aus der Superfamilie der Immunglobuline stammendes CD83-Molekül, welches ein Marker für mature DZ ist, wird ebenfalls hochreguliert⁷⁵. Bei Chemokinen handelt es sich um kleine Proteine, welche die Leukozytenmigration durch die Bindung an spezifische, transmembrane, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (sogenannte Chemokinrezeptoren) steuern⁷⁶. Abhängig von ihrer Primärstruktur und der Anzahl der Cysteine am N-Terminus werden Chemokine in C, CC, CXC und CX3C Gruppen (X steht für das Vorhandensein weiterer Aminosäuren) eingeteilt. In den ersten Stadien der Maturation produzieren DZ hohe Mengen von inflammatorischen Chemokinen CCL3/MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 alpha), CCL4/MIP-1 β (macrophage inflammatory protein 1 beta) und CXCL8/IL-8⁷⁷.

Aufgrund der Fähigkeit zu dieser Differenzierung werden DZ bei Vakzinierungsstrategien und in der Immuntherapie als „natürliche Adjuvanten“ genutzt.

Neben den oben beschriebenen Mechanismen der Antigenaufnahme, welche nicht zwingend zur Maturation von DZ führen, gibt es noch weitere Wege der Antigenerkennung⁷⁸. Charles Janeway Jr und Ruslan Medzhitov vermuteten als Erste, dass die Erkennung von hochkonservierten, pathogenen Strukturen, sogenannten Erreger-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), durch mustererkende Rezeptoren (PRRs, pattern recognition receptors) eine wichtige Rolle bei Immunantworten spielen können^{79;80}. Diese Rezeptoren erlauben dem angeborenen Immunsystem, zwischen dem „eigenen“ und mikrobiell „fremden“ zu unterscheiden. Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs, Toll-like receptors) gehören zu den transmembranen PRRs und repräsentieren die momentan am besten charakterisierte Gruppe⁸¹. Innerhalb dieser Gruppe sind 11 humane TLR, welche sich an der Zelloberfläche oder endosomal befinden, und ihre korrespondierenden Liganden bekannt. Wichtige Beispiele sind Lipoproteine und Lipoteichonsäure der Gram-positiven Bakterien (TLR2 Liganden), doppelsträngige RNA (virale RNA, TLR3 Ligand), Lipopolysaccharid der Gram-negativen Bakterien (LPS, TLR4 Ligand) und nicht-methylierte DNA-Sequenzen mit einem CG-Dinukleotid im Zentrum (CpG Motive, TLR9 Ligand)⁸². Bekannte PRRs sind auch CD14, ein Co-Rezeptor für TLR2 und TLR4, CD36, Komplementrezeptoren und andere⁸³. Vor kurzem wurden einige intra- und extrazelluläre Rezeptoren identifiziert, welche von APZ exprimiert werden und die Regulation der Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflussen können. Dazu gehören nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD, Erkennung bakterieller Strukturen) und retinoic acid inducible

gene (RIG, Erkennung viraler RNA) Rezeptorfamilien⁸⁴ und C-Typ Lektine wie Dektine und dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)⁸⁵. Einzelne DZ-Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, verschiedene Pathogene zu erkennen. Aktiviert durch mikrobielle Signale und Mikromilieufaktoren, sind alle DZ in der Lage, den Effektorzelltyp zu bestimmen⁸⁶. Die DZ-vermittelte Polarisierung von T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen benötigt drei Hauptsignale (Abbildung 1).



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 1: Die Polarisierung von T-Zellen benötigt drei DZ-vermittelte Signale (modifiziert nach O'Hagan und Valiante⁸⁷ und Kapsenberg⁸⁶)

Die Schlüsselkomponente ist die antigenspezifische Bindung von MHC/Peptidkomplexen an TCR, welche nach Aufnahme von Pathogenpeptiden und deren Prozessierung entstehen (Signal 1). Das zweite Signal ist die Ko-stimulation durch die Interaktion von CD80 und

CD86 mit CD28, welches sich an der Oberfläche von T-Zellen befindet. Diese beiden Signale werden von der Produktion verschiedener löslicher Faktoren (Zytokine und Chemokine), wie z. B. IL-12 und CCL2 begleitet (Signal 3)⁸⁸. Oft wird eine zusätzliche Stimulation von CD40, das sich an der Oberfläche von DZ befindet, durch CD40 Liganden (CD40L, wird von T-Zellen exprimiert) benötigt⁸⁹.

Ein wichtiger Th1-polarisierender Faktor IL-12 fördert die Produktion von Interferon-gamma (IFN- γ) durch T-Zellen^{90;91}. Die molekulare Struktur von diesem Zytokin stellt einen aus zwei Ketten (35 und 40 kDa, p35 bzw. p40) bestehenden Heterodimer p70 dar. Zwei andere Mitglieder der IL-12-Familie, IL-23 und IL-27, induzieren ebenfalls Th1-Immunantworten⁹². IL-23 besitzt wie IL-12 p40- und zusätzlich p19-Einheiten. Die Th2-Polarisierung von naiven T-Zellen ist IL-4 abhängig, während die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Treg) durch IL-10 und TGF- β gesteuert wird^{59;93}.

Abhängig vom Typ der PAMPs, von den ko-stimulatorischen Molekülen und dem dritten Signal entwickeln sich verschiedene Subpopulationen der Effektorzellen. CD8⁺ T-Zellen differenzieren sich in Tc1 und Tc2 und eliminieren infizierte Zellen⁹⁴, während aus den CD4⁺ naiven T-Helfer-Zellen vor allem Th1- und Th2-, sowie regulatorische Effektorzellen entstehen, welche andere Zellen, wie Makrophagen und B-Zellen, aktivieren und regulieren. Die Einteilung CD4⁺ T-Zellen basiert auf den verschiedenen Zytokinmustern⁹⁵. Th1-Zellen produzieren große Mengen von inflammatorisch wirkenden IFN- γ , TNF- β und IL-2, welche in der Induktion der zellvermittelten Immunität gegen intrazelluläre Pathogene (Viren, bestimmte Bakterien, Parasiten) eine Rolle spielen. IL-4, IL-5 und IL-13 werden von Th2-Zellen sezerniert und sind u. a. für die Abwehr gegen Helminthen von Bedeutung⁵⁹. Bei einem gestörten Th1-/Th2-Gleichgewicht in Th1-Richtung entwickeln sich Autoimmunkrankheiten, wie z. B. Arthritis und Multiple Sklerose, bei überwiegenden Th2-Antworten atopische Erkrankungen, wie Asthma und Allergien⁹⁶. Th1- und Th2-Zellen antagonisieren sich gegenseitig. So kann z. B. durch Th1-Zellen produziertes IFN- γ die Proliferation von Th2-Zellen blockieren⁹⁷. Treg übernehmen hauptsächlich Kontrollfunktionen und spielen dabei eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Toleranz gegenüber eigenen bzw. harmlosen fremden Proteinen⁹⁸. Zur Zeit sind drei unterschiedliche Subpopulationen von Treg bekannt: antigen-induzierter Typ 1 (Tr) Zellen, welche IL-10 in hohen und transforming growth factor- β (TGF- β) in niedrigen bis moderaten Mengen produzieren⁹⁹, Typ 3 T-Zellen (Th3) mit primärer TGF- β Sekretion¹⁰⁰ und aus dem Thymus stammende CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, welche die Immunantwort durch den direkten zellulären Kontakt inhibieren¹⁰¹. Vor kurzem wurde eine neue CD4⁺ Population der Effektorzellen

charakterisiert, nämlich Th17-Zellen. Diese Lymphozyten differenzieren sich aus naiven T-Zellen unter TGF- β und IL-6 und produzieren pro-inflammatorisches IL-17¹⁰².

Es bestehen viele Hinweise, dass bereits immature DZ durch PAMPs und inflammatorische Mikromilieufaktoren funktionell polarisiert werden^{86;103}. Th1-polarisierende Faktoren sind z. B. IFN- γ , IL-12, IL-18 und IL-27, intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), Chemokine CXCL9, CXCL10, während die Th2-Polarisation unter dem Einfluss von IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, Chemokin CCL2, Prostaglandin E₂ (PG E₂) und Histaminen stattfindet. Bekannte regulatorische Zytokine sind IL-10 und TGF- β . Polarisierende Faktoren werden von verschiedenen Zellen, wie z. B. Epithelzellen, NK-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten sezerniert und begleiten die Maturation von DZ. Anschließend produzieren DZ Th1- und Th2-polarisierende Zytokine und Chemokine (Signal 3) und induzieren dadurch unterschiedliche Signalkaskaden in den Lymphozyten¹⁰⁴.

Verschiedene Subpopulationen von Effektorzellen erreichen durch die Zirkulation im Blut das infizierte und entzündete Gewebe, wo weitere adaptive Immunantworten gegen Pathogene stattfinden.

1.3 Das mukosale Immunsystem des Darmes

Die häufigsten Begegnungen mit Antigenen oder infektiösen Substanzen finden an der Oberfläche der Mukosa statt. Dazu gehören die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes (GIT), der Atemwege und des Urogenitaltraktes¹⁰⁵. GIT besitzt eine Fläche über 300 m² und ist für die Verdauung und Absorption der Nahrung und Resorption der endogenen Moleküle, wie Elektrolyte, Gallensäure und Vitamine zuständig⁴⁹. Der fetale Darm ist steril. Erst nach der Geburt beginnt die Kolonisation mit verschiedenen Mikroorganismen (vor allem Bifidobakterien)¹⁰⁶, welche durch Diät, körpereigene und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Im Darm eines Erwachsenen befinden sich ungefähr 10¹⁴ Mikroorganismen (meistens Bakterien, aber auch Pilze)¹⁰⁷. Mehr als 400 Bakterienspezies, von denen viele noch nicht identifiziert worden sind, kolonisieren GIT¹⁰⁸. Die Anzahl und die Zusammensetzung der Mikroflora ist von ihrer Lokalisation abhängig. Während sich im Magen nur 10³ koloniebildende Einheiten pro ml (colony forming units, CFU) befinden, existieren bis 10¹² CFU/ml Bakterien im Darm, welche vor allem von obligaten Anaerobiern, wie *Bacteroides*, *Clostridium* Spezies, Bifido-, Eu-, und Fusobakterien dominiert werden¹⁰⁹. Zu den fakultativen Anaerobiern gehören Laktobazillen, Enterokokken, Streptokokken und Enterobakterien¹¹⁰. Verschiedene Bakterien können sich frei im Darmlumen bewegen oder haften sich an Mukosazellen, Nahrungspartikel oder verdaute Reste. In der Regel ist die

Interaktion zwischen der Darmmikroflora und dem Wirt symbiotisch, d. h. der Wirt stellt nahrungsreiches Milieu zur Verfügung, während Bakterien (auch probiotische) durch Kolonisationsresistenz und Produktion von Bakteriziden den Wirt vor pathogenen Keimen schützen¹¹¹.

Um diese Aufgabe zu erfüllen, muss die intestinale Mukosa einerseits in der Lage sein, die Toleranz gegenüber nicht-pathogenen kommensalen Bakterien und Nahrungsantigenen zu erhalten, jedoch andererseits fähig sein, Pathogene schnell zu erkennen und die notwendige Immunantwort auszulösen (intestinale Homeostase). In der Aufrechterhaltung dieser Balance spielt das darmassoziierte lymphatische Gewebe (gut-associated lymphoid tissue, GALT) eine wichtige Rolle. GALT ist das größte sekundäre Immunorgan des Körpers, welches aus organisierten lymphatischen Strukturen (Peyer-Plaques, einzelne Lymphfollikel und Blinddarm) und diffusem lymphoiden Gewebe (intraepitheliale und frei in der Lamina propria vorkommende Lymphozyten) besteht¹¹². Die intestinalen Epithelzellen (intestinal epithelial cells, IEC), welche die Peyer-Plaques bedecken, stellen eine dynamische Barriere dar, um den Wirt von dem Außenmilieu zu schützen (Abbildung 2).

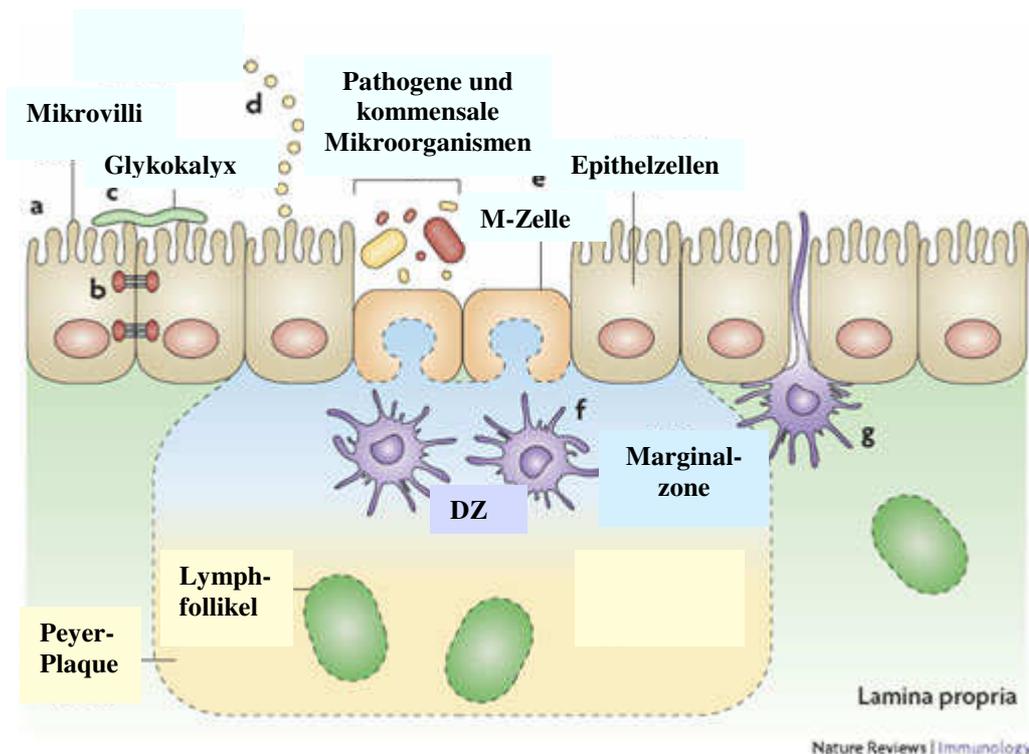


Abbildung 2: Das mukosale Immunsystem (nach D. Artis¹¹³)

Hierfür sind die Mikrovilli (a) an der apikalen Oberfläche der IEC mit den interzellulären Tight Junctions (b) gekoppelt.¹¹⁴ Darüber hinaus wird dieser Schutz durch die Produktion

von Glykokalyx (c) und antibakteriellen Peptiden (d), wie Defensine, Cathelicidine und Calprotectin verstärkt¹¹². Intestinale Antigene gelangen auf drei verschiedenen Wegen durch diese Barriere. Erstens, nehmen sogenannte M-Zellen (e, Mikrofalten-Zellen, microfold) des follikel-assoziierten Epithels Partikel auf und transportieren sie mittels Transpinozytose in die Marginalzone und dort zu den DZ (f), B-Zellen und Makrophagen¹¹⁵. Zweitens, können lokalisierte in der Lamina propria DZ (g) Tight Junctions zwischen den IEC öffnen und Bakterien im Darmlumen mit ihren langen Fortsätzen direkt greifen. Da DZ fähig sind, Tight Junctions Proteine zu produzieren, bleibt die Epithelbarriere erhalten¹¹⁶. Dieser vor kurzem beschriebene neue Mechanismus wird durch den Chemokinrezeptor CX3CR1 vermittelt¹¹⁷. Zusätzlich können die IEC lösliche Antigene aus dem intestinalen Lumen in die Lamina propria transportieren (dritter Mechanismus)¹¹⁸. Diese Zellen sezernieren hohe Mengen von IgA, welches von differenzierten B-Zellen in der Lamina propria produziert wird, ins Darmlumen¹¹⁹. Klinische Studien zeigen, dass Laktobazillen (LGG, *L. acidophilus* La1) und Bifidobakterien (*B. bifidum*) die IgA-Produktion stimulieren^{120;121}.

Einige im Darmlumen vorhandene probiotische Bakterien sind zu der Interaktion mit den IEC fähig. Daraus resultiert eine veränderte Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine, wie z. B. inflammatorisch wirkende IL-1 β , IL-8, TNF- α ¹²², CXCL1, CXCL2 (Chemotaxis der Makrophagen) und CCL20 (Chemotaxis von DZ)¹²³. Ferner wird eine verstärkte Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen unter dem Einfluss von vielen Probiotika, wie z. B. *L. acidophilus* und *L. casei*, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 beobachtet^{124;125}. Das zytotoxische Potential von NK-Zellen wird ebenfalls durch probiotische Keime erhöht (*L. casei* Shirota)¹²⁶. Darüber hinaus weist die orale Applikation einer Mischung aus zwei Bifidobakterien im Tiermodell eine anti-allergische Wirkung durch Suppression von Histamin-Signalkaskade auf¹²⁷.

Zahlreiche experimentelle Studien beschreiben weitere immunmodulatorische Effekte der Probiotika. Einerseits, reduzieren lebende Laktobazillen *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. casei* und LGG die IL-4 und IL-5 Produktion von PBMZ allergischer Patienten nach der Stimulation mit Hausmilbenallergen¹²⁸. Andererseits, können auch die hitzeinaktivierten Laktobazillen die Th1-Polarisation von T-Zellen hervorrufen¹²⁹. Im Mausmodell mit oraler Toleranz gegenüber Laktoglobulin wird die humorale und zelluläre Immunantwort auf Milchprotein am stärksten unter Kolonisierung mit *L. paracasei* unterdrückt¹³⁰. Der gleiche Stamm induziert in der Maus die Differenzierung von CD4⁺ Subpopulation mit niedriger Proliferationskapazität und erhöhter TGF- β und IL-10 Produktion¹³¹. Ein anderer Stamm, *L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 blockiert die Proliferation humaner CD4⁺ Lymphozyten aus dem peripheren Blut, aus

der Lamina propria von Patienten mit chronischen Darmerkrankungen und aus den Payer-Plaques gesunder Probanden¹³². In einem Asthmodell reduzieren LGG und *Bifidobacterium lactis* die allergische Sensibilisierung und Inflammation der Atemwege in der Maus^{133;134}. Zusätzlich ist LGG in der Lage, die Produktion von IL-10 und IFN- γ in PBMZ aus dem peripheren und Nabelschnurblut zu stimulieren¹³⁵.

Da die erwähnten experimentellen Systeme sehr unterschiedlich und die daraus resultierende Ergebnisse teilweise widersprüchlich sind, ist es zur Zeit nicht möglich, eine schlüssige Aussage über die Wirkungsmechanismen der Probiotika zu treffen. Für die Ausreifung des GALT und die Entwicklung intestinaler Homeostase ist die Erkennung kommensaler/probiotischer Bakterien nach der Geburt notwendig¹³⁶. Hierbei spielen intestinale DZ nach der Kondizionierung durch Mikromilieufaktoren eine entscheidende Rolle^{137;138}. Somit stellen die Untersuchungen der Effekte von Probiotika auf DZ einen neuen Weg zur Aufklärung der Wirkung dieser Bakterien auf das Immunsystem dar. Bei der Durchführung der Versuche sind folgende Faktoren entscheidend: die Methode der Generierung von DZ, die Auswahl einer Monokultur oder einer Präparation aus mehreren Stämmen, die Dosierung der Probiotika und die Stimulationszeit der DZ. Die Ergebnisse der bereits bekannten experimentellen Studien werden in dem Abschnitt „Diskussion“ mit den eigenen Daten verglichen.

2. ZIELSETZUNG

DZ sind zentrale Schaltstellen des Immunsystems, da sie als sehr potente APZ mit Mikroorganismen, u. a. mit probiotischen Bakterien im Darm interagieren und somit eine adaptive Immunantwort induzieren. In dieser Interaktion liegt möglicherweise der Schlüssel zum Verständnis der Wirkungsmechanismen von Probiotika, deshalb wählten wir DZ als Modell für unsere Untersuchungen. Wir stellten die Hypothese auf, dass definierte probiotische Stämme von Laktobazillen und Bifidobakterien DZ unterschiedlich modulieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss ausgewählter probiotischer Stämme in UV-inaktiviertem und lebendem Zustand auf den Phänotyp und Funktionen von DZ untersucht.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist die Maturation von DZ nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika nachweisbar, und wenn ja, gibt es stammspezifische Unterschiede?
2. Gibt es Anhaltspunkte für ein stammspezifisches Zytokinmuster in den DZ-Überständen nach Stimulation mit UV-inaktivierten Bakterien?
3. Wie verhält sich die Maturation von DZ nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Vergleich zu UV-inaktivierten?
4. Ändert sich das Zytokinmuster oder die Mengen von DZ produzierten Zytokinen und Chemokinen unter dem Einfluss von lebenden Bakterien im Vergleich zu UV-inaktivierten?
5. Weisen bestimmte Probiotika tolerogene Effekte auf, welche präventive Wirkung der Probiotikasupplementation auf die Entstehung atopischer Erkrankungen in den klinischen Studien erklären könnte?
6. Welche weiteren Untersuchungen bieten sich an, um die Wirkungsmechanismen der Probiotika verstehen zu können?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Probanden

Für die Gewinnung von peripherem Blut wurden Probanden nach folgenden Kriterien ausgesucht: Abwesenheit akuter Infektionskrankheiten, keine bekannten Darmerkrankungen, keine allergischen Erkrankungen, Nichtraucher. Es wurde zwischen 60 und 120 ml venöses Blut abgenommen.

3.1.2 Buffy Coat

Buffy Coat-Präparationen gesunder Spender wurden vom Blutspendedienst (Dachauer Str. 90, 80335 München) bereitgestellt.

3.1.3 Probiotische Stämme

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)	Valio, Helsinki, Finnland
<i>Bf. species 420</i> (<i>Bifidobacterium lactis</i>)	Danisco, Niebüll, Deutschland
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LC-01	Chr. Hansen, Hørsholm, Dänemark
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2	Chr. Hansen, Hørsholm, Dänemark
<i>Bifidobacterium longum</i> BB-46	Chr. Hansen, Hørsholm, Dänemark
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Chr. Hansen, Nienburg, Deutschland
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen, Nienburg
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	BioGaia, Stockholm, Schweden

3.1.4 Lösungen und Reagenzien (Chemikalien, Puffer, Medien)

Biocoll-Trennlösung, Dichte 1,077g/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Citifluor AF1	Citifluor Ltd., London, England
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure))	Biochrom AG
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D-PBS (Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) ohne Kalzium, Magnesium	Invitrogen
FCS (Fötale Rinderserum)	Invitrogen

Penicillin G Natriumsalz	Sigma
<u>Zellkulturmedium</u>	
500 ml VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, mit 2,0 g/l NaHCO ₃	Biochrom AG
7,5 ml hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum	Institut für Transfusionsmedizin, Suhl, Deutschland Celect, MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland
BD FACSFlo TM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences
BD FACS TM Shutdown Solution	BD Biosciences
Bio-Plex Human Cytokine Assay 9-plex (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β)	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Plex Human Cytokine single-plex (IL-5, IL-13)	Bio-Rad
Bio-Plex Cytokine Reagent Kit	Bio-Rad
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen

3.1.5 Stimulantien und Zytokine

Stimulantien	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
LPS (<i>E. coli</i> 0111:B4)	5-500 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IL-4	20 ng/ml	RnD Systems, Wiesbaden
TNF- α	10 ng/ml	RnD Systems, Wiesbaden
IL-1 β	10 ng/ml	RnD Systems, Wiesbaden
IL-6	15 ng/ml	RnD Systems, Wiesbaden
PG E ₂	1 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly (I:C)	50 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GM-CSF Leukine Liquid (Sargramostim)	100 ng/ml	Berlex Oncology, Seattle, USA

Tabelle 1: Zusammenstellung der für die Zellkultur verwendeten Stimulantien

3.1.6 Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Isotyp	Konzentration	Bezugsquelle
CD83	FITC	HB15e	Mouse IgG1	2 x konzentriert*	BD Biosciences
CD1a	PE	HI149	Mouse IgG1	2 x konzentriert	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	FITC	2331 FUN-1	Mouse IgG1	pur	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	PE	L307.4	Mouse IgG1	2 x konzentriert	BD Biosciences
CD14	FITC	M5E2	Mouse IgG2a	pur	BD Biosciences
	APC	61D3	Mouse IgG1	pur	eBioscience
CD40	PE	5C3	Mouse IgG1	pur	BD
	APC	5C3	Mouse IgG1	1:2	Biosciences
CD3	PerCP	SK7	Mouse IgG1	1:2	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP	L243	IgG2a	2 x konzentriert	BD Biosciences
CD3/ HLA-DR	FITC/ PE	SK7 L243	IgG1 FITC/ IgG2a PE	pur	BD Biosciences
	FITC	3G8	Mouse IgG1	pur	BD Biosciences
CD19	PE	4G7	Mouse IgG1	pur	BD Biosciences

Tabelle 2: Zusammenstellung der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

(FITC = Fluoreszeinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, APC = Allophycocyanin,

PerCP = Peridinin chlorophyll protein)

BD Biosciences; eBioscience, Frankfurt, Deutschland

* 4 µl pro 10⁵ Zellen statt 2 µl, wie von BD Biosciences empfohlen

3.1.7 Geräte und Software

Sterilbank Uniflow KR-130 biohazard	UniEquip, Martinsried/München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAcCell 240	Thermo Elektron, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 [AxioVision Release 4.5 Software]	Carl Zeiss, Jena, Deutschland Carl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Axioskop [Axiovision 3.0 Software]	Carl Zeiss Carl Zeiss
BD FACSCanto [BD FACSDiva Software version 5.0.1]	BD Biosciences BD Biosciences
Luminex 200 [Bio-Plex Manager Software 4.1]	Luminex, Oosterhout, Holland Bio-Rad, München
Vakuumpumpe für 96-Well Platte	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Glas-Vakuumfiltrationsgerät	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Laboport-Membran-Vakuumpumpe N86 KT.18	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph-Instruments, Kelheim, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Kühlschrank +4°C	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank Premium GNP 3376 No Frost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mehrkanal Pipette Research 30-300 µl	Eppendorf
Research Pipetten (0,1-2,5 µl; 2,0-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf
PC	Fujitsu/Siemens Celsius W340 i945G
[Windows XP Office Packet]	
[Reference Manager 10]	
[SPSS Version 15.0]	
[Adobe Photoshop 7.0]	

3.1.8 Glas- und Plastikmaterial

50 ml-Spritzen	BD Biosciences
Infusions-Set mit Flügelkanüle, steril	Intermedica, Klein-Winternheim/Mainz, Deutschland
Zellkulturflaschen, Nunclon Oberfläche, 175 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
6-, 12-Well Platten, Nunclon Oberfläche	Nunc
24-Well Platten	BD Biosciences
Nunc Petrischalen	Nunc
Nunc Cryoröhrchen	Nunc
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf
MultiScreen Filterplatten	Millipore
Pasteur-Pipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polypropylen Röhrchen 15, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
QuattroRack	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Sterile Filter-Tips 2,5, 20, 100, 1000 µl	Biozym
Pipettenspitzen 2-200, 20-300 µl	Eppendorf
Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol, 6 ml	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Isopore TM Membranfilter, 0,2 µm GTTP	Millipore
Saugflaschen Duran	Schott, Mainz, Deutschland
Objekträger SuperFrost	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Menzel
Neubauer improved Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.2 Methoden

Sämtliche Arbeiten mit humanen Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten humanen Zellen wurden unter Normalbedingungen, d.h. bei 5% CO₂, wassergesättigter Atmosphäre und 37°C kultiviert.

3.2.1 Generierung dendritischer Zellen

3.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Buffy Coat

Der Buffy Coat ist eine Fraktion aus Leukozyten und Thrombozyten, die man bei der Herstellung der Blutkomponenten (Erythrozyten, Blutplasma und Thrombozyten) nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Die Herstellung erfolgt in der Blutbank in zwei unterschiedlichen Blutbeutelssystemen A und B. Um die mögliche Übertragung der Infektionserreger durch Leukozyten bei der Transfusion zu vermeiden, erfolgt eine Leukozytendepletion. Im Blutbeutelssystem A werden die Leukozyten mittels eines speziellen Filters gleich zu Anfang aus dem Vollblut entfernt, im Blutbeutelssystem B erst am Ende der Herstellung aus dem Erythrozytenkonzentrat.

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMZ) wurden sowohl aus dem Filter (Blutbeutelssystem A) als auch aus Buffy Coat-Präparationen (Blutbeutelssystem B) isoliert. Der Inhalt des Filters wurde mit 150 ml D-PBS ausgespült und in eine Zellkulturflasche überführt. Buffy Coat (150 ml) wurde in einer Zellkulturflasche mit 300 ml D-PBS 1:2 verdünnt. Die folgenden Schritte waren für die Isolierung mononukleärer Zellen aus Filter und Buffy Coat identisch: je 40 ml des mit D-PBS verdünnten Buffy Coats wurden in 50 ml-Röhrchen vorgelegt. Um Thrombozyten zu entfernen, wurde dieses Gemisch schwach zentrifugiert (25 min, 100 rcf, 22°C, Beschleunigungsverzögerung 60 s, Bremse 1). Nach dem Verwerfen des thrombozytenreichen Überstandes wurden PBMZ mit Hilfe der Dichtezentrifugation über einen Biocoll-Trennlösungs-Gradienten isoliert. Hierzu wurde das thrombozytendepletierte Blutgemisch in einer neuen Zellkulturflasche 1:1 mit D-PBS verdünnt und davon jeweils 30 ml über 12 ml Biocoll-Trennlösung geschichtet. Durch Zentrifugation (18 min, 740 rcf, 22°C, Beschleunigungsverzögerung 100 s, ohne Bremse) reichern sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase zwischen Überstand (Plasma und restliche Thrombozyten) und Biocoll an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Die in der Interphase lokalisierten Zellen wurden in D-PBS abpipettiert, zweimal in D-PBS gewaschen (10 min, 360 rcf, 22°C) und anschließend in 2 ml Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt. Die PBMZ wurden auf eine Dichte von 10×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

3.2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Eine bis drei 50 ml-Spritzen wurden mit einem ml Heparin benetzt. Anschließend wurden 60-120 ml venöses Blut mittels eines Infusions-Sets mit Flügelkanüle steril bei gesunden Spendern abgenommen. Das Blut wurde in eine Zellkulturflasche überführt und 1:1 mit D-PBS verdünnt. Anschließend wurden PBMZ, wie oben beschrieben, isoliert.

3.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität bei humanen Zellen

Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 μ l der Zellsuspension mit 180 μ l Trypanblaulösung (1:10 verdünnt) gemischt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran kann der Farbstoff Trypanblau nicht in die Zelle eindringen. Bei toten Zellen mit permeabler Zellmembran diffundiert der Farbstoff durch die Zellmembran und färbt das Zytoplasma blau. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor (10^4) und Verdünnungsfaktor.

3.2.1.4 Anreicherung humaner Monozyten

Humane Monozyten wurden aus PBMZ isoliert, die aus Buffy Coat oder peripherem Blut gewonnen wurden. Die Isolierung erfolgte mittels Plastikadhärenz, die bereits 1966 von Bennett und Cohn beschrieben wurde¹³⁹ und basiert auf der Fähigkeit von Monozyten, an der Plastikoberfläche zu adhären. Bei den nicht-monozytären PBMZ ist diese Eigenschaft nicht so stark ausgeprägt, deshalb kann die Mehrheit dieser Zellen durch Waschen entfernt werden. Die praktische Durchführung erfolgte nach der von Thurner et al. modifizierten Methode¹⁴⁰. In jede Kavität einer 6-Well Platte wurde je 1 ml RPMI Medium (Raumtemperatur, RT) vorgelegt. Die isolierten PBMZ wurden in einer Dichte von 10×10^6 Zellen pro Kavität ausgesät (Endvolumen 2 ml) und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz wurden die nicht-adhären Zellen durch vier- bis fünfmaliges Waschen mit warmem (37°C) RPMI entfernt. Zuletzt wurden je 2 ml frisches Zellkulturmedium pro Kavität zugegeben (Tag 0). Anschließend wurden die Monozyten zur Regeneration über Nacht in den Brutschrank gestellt.

3.2.1.5 Generierung immaturer DZ aus den Monozyten

Die Methode zur Generierung immaturer DZ aus Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 von Sallusto und Lanzavecchia⁶⁵ wurde mit Modifikationen nach Dr. biol. hum. A. Zobywalski (GMP-Labor, Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum

München) angewendet. Monozyten wurden sechs bis sieben Tage mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) in einer 6-Well Platte kultiviert. Am ersten und vierten (fünften) Tag wurde 0,5 ml frisches Zellkulturmedium mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) pro Kavität dazugegeben und die Zelldifferenzierung wurde lichtmikroskopisch beobachtet. Nach sechs (sieben) Tagen der Kultivierung hatten die Zellen das Stadium immaturer DZ erreicht: große Zellen mit unregelmäßigen Konturen, selten mit Fortsätzen. Der Prozentsatz von DZ-Marker CD83, CD1a, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR (MHC-II-Moleküle) exprimierenden Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft.

3.2.2 Ansetzen der probiotischen Kulturen und UV-Inaktivierung

Sämtliche Arbeiten mit probiotischen Bakterien wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Ansetzen und die UV-Inaktivierung der bakteriellen Kulturen erfolgte bei Kooperationspartnern des Projektes in der Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen, Helmholtz Zentrum München, Leiter Prof. Dr. A. Hartmann, durch Frau T. Binder und Frau K. Buddrus nach folgendem Protokoll. Zuerst wurden von allen Stämmen Kryokulturen angelegt. Anschließend wurden 15 ml MRS Medium (de Man, Rogosa and Sharpe broth, eigene Herstellung) mit 50 µl Kryokultur des jeweiligen Laktobazillenstammes angeimpft. Parallel dazu wurden 15 ml MRS versetzt mit 0,05% Cystein mit 100 µl Kryokultur des jeweiligen Bifidobakterienstammes angeimpft. Die probiotischen Bakterien wurden anaerob bei 37°C für 24 oder 48 h hochgezogen, durch Zentrifugation (15 min, 1000 rcf, 4°C) geerntet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Bakterien in PBS aufgenommen und es wurde durch Verdünnung eine optische Dichte photometrisch zwischen 0,3 und 0,4 eingestellt (Wellenlänge 436 nm). Für die UV-Inaktivierung wurden jeweils 30 ml Bakteriensuspension in PBS in einer Petrischale vorgelegt und bei offenem Deckel zwischen 55 und 80 min (je nach Stamm) mit UV-Licht bestrahlt. Um den Verlust der Teilungsfähigkeit der Bakterien zu kontrollieren, wurden sechsmal 100 µl Bakteriensuspension pro Petrischale entnommen. Jeweils 100 µl wurden auf drei MRS-Agarplatten ausplattiert bzw. damit drei Röhren mit MRS-Flüssigmedium inokuliert. Diese Kontrollplatten bzw. -röhren wurden anaerob bei 37°C für 72 h inkubiert, um sicherzustellen, dass kein Bakterienwachstum erfolgte. Der Rest der Bakteriensuspension wurde in 50 ml-Röhren überführt und bei +4°C bis zur Stimulation der DZ aufbewahrt (maximal sechs Wochen).

3.2.3 DAPI-Färbung

Für die Beurteilung der Wirkung von Probiotika auf DZ ist es entscheidend, eine definierte Bakterienzahl pro dendritischer Zelle einzusetzen. Eine gängige Methode zur Ermittlung der Zahl der Bakterien ist die Ausplattierung und Auszählung der koloniebildenden Einheiten. Dies ist bei UV-inaktivierten Bakterien nicht möglich, da sie nicht mehr teilungsfähig sind. Deswegen wurde zur Visualisierung der Gesamtbakterienzahl eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) angewendet. Der Farbstoff ist membrangängig und bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der einzel- und doppelsträngigen DNA, womit gleichzeitig eine Verstärkung der Fluoreszenz verbunden ist¹⁴¹. Bei der DAPI-Färbung kann zwischen aktiven und inaktiven sowie abgestorbenen Zellen nicht unterschieden werden (der Farbstoff bindet an die DNA unabhängig vom physiologischen Zustand der Zelle). DAPI besitzt ein Absorptionsmaximum bei 365 nm und ein Emissionsmaximum bei 418 nm. Gefärbte prokariotische DNA erscheint leuchtend blau, während unspezifische Bindungen von DAPI an Polyanionen wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führen¹⁴². Dies ermöglicht eine quantitativ erfassbare Visualisierung der Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop.

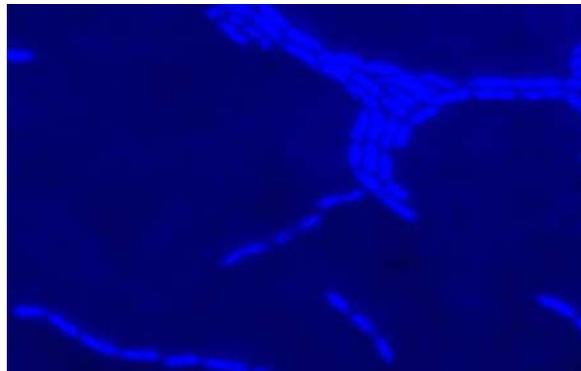


Abbildung 3: DAPI-gefärbte LGG (einzelne Bakterien bilden lange Ketten)

Die Durchführung der DAPI-Färbung erfolgte modifiziert nach Porter und Feig. Die UV-inaktivierten Bakterien wurden bei +4°C 10 min abzentrifugiert (Laktobazillen bei 1000 rcf, Bifidobakterien bei 4500 rcf) und in jeweils einem ml kalten Zellkulturmedium aufgenommen. 100 µl davon wurden 1:10 oder 1:100 mit PBS verdünnt und mit Hilfe eines Glas-Vakuumfiltrationsgerätes auf einen 0,2 µm Polycarbonatfilter aufgebracht. Dazu wurde der Filter mit der glänzenden Seite nach oben zwischen Glasaufsatz und PTFE (Polytetrafluorethylen)-beschichtetem Ring (mit Stützsieb und Lochblech) des

Vakuumfiltrationsgerätes zentral positioniert und das Gerät an einer Vakuumpumpe angeschlossen. Zuerst wurde ein ml PBS in die Filtrationseinheit pipettiert, der benötigte Unterdruck (<300 mbar) wurde mittels der Pumpe erzeugt und PBS, welches zum Befeuchten des Filters diente, abgesaugt. Anschließend wurde ein ml der verdünnten Bakteriensuspension direkt auf den Filter gegeben, zwei min inkubiert und wie oben beschrieben abgesaugt. Der Filter wurde mit einer Pinzette in eine vorbereitete Petrischale überführt und circa 15 min luftgetrocknet. Inzwischen wurde die DAPI-Stammlösung (35 µg/ml in bidestilliertem Wasser) 1:20 mit bidestilliertem Wasser verdünnt (1,75 µg/ml Endkonzentration). 300 µl dieser DAPI-Lösung wurden auf der glänzenden Seite des Filters gleichmäßig verteilt und 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Filter mit destilliertem Wasser gewaschen und im Dunkeln luftgetrocknet.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach Einbettung des Filters auf einem Objektträger. Dazu wurde ein Tropfen Citifluor AF1 auf den Filter aufgetragen, dieser mit einem Deckglas versiegelt und bei -20°C bis zur Auszählung gelagert. Citifluor AF1 wurde zum Schutz vor Ausbleichungseffekten des Fluoreszenzfarbstoffes angewendet. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Zählokulars (10x10 Teilquadrate) bei 1000-facher Vergrößerung unter UV-Anregung an einem Epifluoreszenzmikroskop, Filtersatz 01, Absorptionsmaximum 359 nm, Emissionsmaximum 461 nm. 10 x 6 Zählquadrate pro Filter wurden ausgezählt und nach Bestimmung des Mittelwertes (MW) wurde die Gesamtbakterienzahl nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Bakterienzahl (pro ml)} = \text{MW} \times \text{M}_F \times \text{V}$$

M_F - Mikroskopierfaktor für das verwendete Mikroskop (Axiovert 135) = 21637

= gesamte effektive Filterfläche : Fläche des Gitternetzes

V - Verdünnungsfaktor

3.2.4 Stimulation der DZ durch UV-inaktivierte Probiotika

Um DZ durch Probiotika maturieren zu lassen, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: im ersten Ansatz wurden immature DZ direkt in der 6-Well Platte stimuliert. Um die Zahl der DZ pro Kavität zu ermitteln, wurden die Zellen aus zwei Kavitäten geerntet, ausgezählt, ein Mittelwert gebildet und für die anderen Kavitäten angenommen. Anschließend

folgte Stimulation (auch „Priming“ genannt) der immaturren DZ mit probiotischen Bakterien in den verschiedenen Konzentrationen (siehe unten).

Im zweiten Ansatz wurden immature DZ am sechsten bzw. siebten Tag der Kultivierung aus jeder Kavität in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt und abzentrifugiert (10 min, 360 rcf, 22°C). Der Kulturüberstand (Zellkulturmedium mit GM-CSF, IL-4 und von den immaturren DZ produzierten Zytokinen) wurde aufgehoben. Während der Zentrifugation wurden die leeren Kavitäten der 6-Well Platte mit 4 ml D-PBS pro Kavität gefüllt und mit der Hand geschüttelt, um noch verbliebene DZ zu lösen. Danach wurde das DZ-Pellet mit D-PBS aus der Zellkulturplatte resuspendiert, und die Spülung der Kavitäten erfolgte erneut. Restliche immature DZ in D-PBS wurden mit den übrigen DZ vereinigt, das Röhrchen auf 50 ml mit D-PBS aufgefüllt und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 360 rcf, 22°C). Anschließend wurde der klare Überstand verworfen und die pelletierten Zellen wurden in 2 ml des aufgehobenen Kulturüberstandes aufgenommen und gezählt. Der Rest des aufgehobenen Überstandes wurde dazugegeben und DZ in eine neue, vorher mit RPMI ausgespülte 12-Well Platte ausgesät. Zur Ermittlung des Arbeitsvolumens in einem Well der 12-Well Platte (1,1 ml) wurde die Fläche eines Wells der 6-Well Platte (9,6 cm²) durch die Fläche eines Wells der 12-Well Platte (3,5 cm²) dividiert. Das Volumen der Zellsuspension in der 6-Well Platte (3 ml) wurde durch den errechneten Faktor (2,7) geteilt. Die gleiche Rechnung wurde für die Bestimmung des Endvolumens (1,5 ml) in der 12-Well Platte und des Volumens vom Zellkulturmedium, in dem die Stimulantien aufgenommen wurden (0,4 ml), angewendet.

Für Stimulation wurden 1 ml (6-Well Platte) bzw. 0,4 ml (12-Well Platte) x (Anzahl der Stimulationsansätze plus einmal je Negativ- und Positivkontrolle in der 6- bzw. 12-Well Platte) des Zellkulturmediums vorbereitet und mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) versetzt. Danach wurde diese Stocklösung auf 15 ml-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden alle Stimulantien einzeln in die vorbereiteten 15 ml-Röhrchen pipettiert, gut vermischt und in die entsprechenden Kavitäten gegeben.

DZ wurden mit UV-inaktivierten Bakterien in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 50:1, 100:1, 1000:1 Bakterien pro dendritischer Zelle für 24 oder 48 h stimuliert. Die Bakterienzahl wurde vorher mittels DAPI-Färbung bestimmt. Als Positivkontrolle wurde LPS in der Konzentration 50 ng/ml angesetzt. Als Negativkontrolle diente 1 ml (6-Well Platte) bzw. 0,4 ml (12-Well Platte) des Zellkulturmediums mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml).

In den Vorversuchen wurde LPS in den verschiedenen Konzentrationen (5 pg/ml-0,05-0,5-5-50-500 ng/ml) ausgetestet, um die minimale Konzentration, unter der DZ maturieren, zu bestimmen. Neben LPS (Ligand von TLR4) wurden andere Stimulantien als Positivkontrollen

ausgetestet: doppelsträngige RNA (virale RNA oder poly I:C, Ligand von TLR3) und ein sehr bekannter Maturationsfaktor, der sogenannte „Jonuleit cocktail“. Es handelt sich dabei um einen definierten Zytokincocktail aus 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6 und 1 μ g/ml PG E₂, zum ersten mal von Jonuleit beschrieben¹⁴³. Er wurde entwickelt, um mature DZ aus lymphozyten-depletierten PBMZ unter FCS-freien Bedingungen reproduzierbar zu generieren.

Nach 24 h oder 48 h Stimulation wurden DZ wie folgt als matur definiert: große, nicht-adhärenente Zellen mit beweglichen Fortsätzen, oft mit granuliertem Zytoplasma und charakteristischem Phänotyp (siehe Abschnitt 3.2.7). Die Zellvitalität lag immer über 90 % (bestimmt lichtmikroskopisch durch Trypanblaufärbung). 6- oder 12-Well Platten mit maturen DZ wurden auf den Plattformschüttler Rotamax 120 gestellt und circa 10 min bei 100 rpm inkubiert, um eventuell verklumpte Zellen zu lösen. Anschließend erfolgte die Ernte von DZ. Dabei wurde der Inhalt jeder Kavität von einer 6- oder 12-Well Platte in ein entsprechend beschriftetes 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 360 rcf, 22°C), die Überstände wurden abgenommen und für die Zytokinbestimmungen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die leeren Kavitäten wurden mit PBS gefüllt (6-Well Platte: mit je 5 ml, 12-Well Platte: mit je 2 ml) und auf dem Plattformschüttler 5 min bei 100 rpm inkubiert, um die Ernte der restlichen Zellen zu ermöglichen. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die restlichen DZ in die 15 ml-Röhrchen überführt. Diese wurden abzentrifugiert (10 min, 360 rcf, 22°C), die Überstände wurden verworfen und DZ in 650 μ l (2-Farben Ansatz) bzw. 350 μ l (4-Farben Ansatz) FACS-Puffer (PBS + 2% FCS) aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl pro Stimulationsansatz wurden DZ mit fluorchrom-markierten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.5 Vitalfärbung

Sämtliche Arbeiten mit lebenden probiotischen Bakterien wurden nach der Etablierung durch Frau T. Binder von Frau R. Bernatowicz (Doktorandin/ studentische Hilfskraft in unserem Labor) durchgeführt. 15 ml MRS Medium wurden mit 100 μ l Kryokultur des jeweiligen Laktobazillenstammes angeimpft. Zusätzlich wurden 15 ml MRS Medium versetzt mit 0,05% Cystein mit 160 μ l Kryokultur des jeweiligen Bifidobakterienstammes angeimpft. Nach 24 h anaerober Inkubation bei 37°C wurden Bakterien geerntet und dreimal mit 15 ml 0,85% NaCl gewaschen (Zentrifugation: 15 min, 1000 rcf, 4°C). Danach wurden die Keime in 0,85% NaCl Lösung aufgenommen und durch Verdünnung wurde eine optische Dichte photometrisch zwischen 0,3 und 0,4 eingestellt.

Wie bereits im Abschnitt 3.2.3 erwähnt wurde, ist es notwendig, vor der Stimulation immaturer DZ die Zahl einzusetzender Bakterien zu ermitteln. Die Ausplattierung und Auszählung der koloniebildenden Einheiten sind für die Versuche mit lebenden Bakterien ungeeignet, da das Verhältnis Bakterien zu einer DZ erst ca. 24 h nach Stimulation ermittelt werden kann. Eine Methode, die erlaubt, innerhalb 20-30 min den Anteil der lebenden Bakterien in der Bakteriensuspension zu bestimmen, ist die Fluoreszenzmikroskopie nach der Färbung mit dem LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen)¹⁴⁴. Dieser Kit besteht aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen für Nukleinsäuren: SYTO[®]9 (grün) und Propidiumjodid (rot). SYTO 9 durchdringt die Membranen sowohl lebender als auch toter Bakterien und lässt sie grün fluoreszieren. Propidiumjodid dagegen diffundiert nur durch die beschädigten Membranen der toten Bakterien. Bei der gleichzeitigen Anwendung vermindert Propidiumjodid die grüne Fluoreszenz des SYTO 9, so dass lebende Bakterien grün, tote Bakterien rot erscheinen. Die Auszählung mit Hilfe eines Zähllokulars ist jedoch nur innerhalb der ersten 10-15 min möglich, da erstens, Fluoreszenzfarbstoffe sehr schnell ausbleichen, und zweitens, das Fluoreszenzlicht einen Stressfaktor für Bakterien darstellt. Unmittelbar nach der Färbung einer Suspension lebender Bakterien zeigen fast alle bakterielle Zellen in der Regel eine starke grüne Fluoreszenz, es sind nur vereinzelte rot leuchtende Bakterien dabei. Unter der Einwirkung des Fluoreszenzlichtes sterben immer mehr Bakterien, Propidiumjodid kann in die bakteriellen Zellen eindringen und lässt sie rot fluoreszieren. Dadurch können die Ergebnisse sich verändern. Um dies zu verhindern, werden nur die toten Bakterien möglichst schnell ausgezählt. Die Gesamtbakterienzahl wird durch die parallele Auszählung der ungefärbten Bakteriensuspension (Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast) ermittelt. Die Differenz aus der Gesamtbakterienzahl und der Anzahl der toten Bakterien ist die Zahl der lebenden Bakterien.

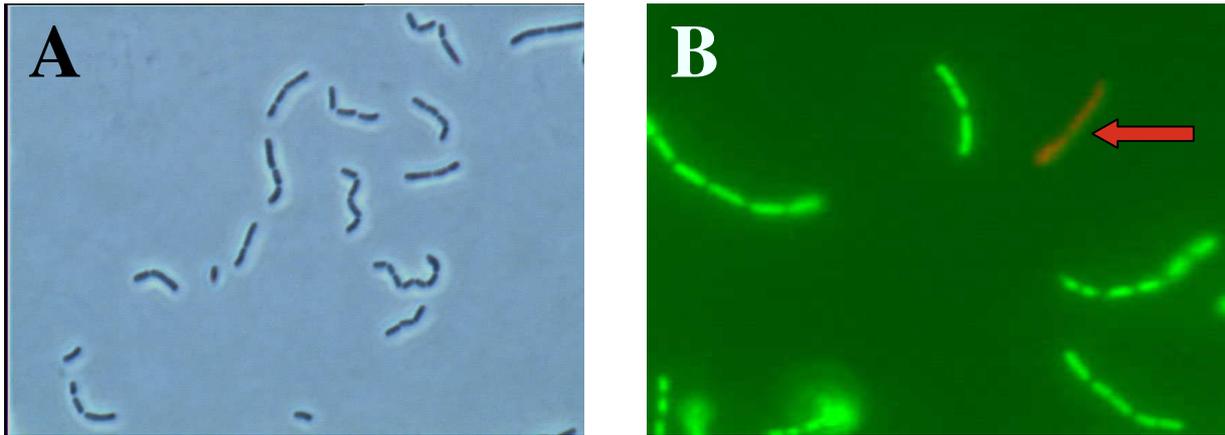


Abbildung 4: *Lactobacillus rhamnosus GG*

- A. Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast**
- B. Färbung mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit
(roter Pfeil markiert eine Kette aus toten Bakterien)**

Die Vorversuche mit den UV-inaktivierten Bakterien zeigten, dass durch Zentrifugation ein Teil der Bakterien verloren ging. Deswegen wurden die lebenden Probiotika unmittelbar vor der Färbung und Auszählung bei +4°C 10 min abzentrifugiert (Laktobazillen bei 1000 rcf, Bifidobakterien bei 3000 rcf). Die Überstände wurden vorsichtig abgekippt und die Pellets in jeweils einem ml kalten Zellkulturmedium aufgenommen. Pro Stamm wurde jeweils zweimal ein ml der 1:100 verdünnten (mit 0,85% NaCl) Bakteriensuspension vorbereitet. Für die Färbung wurden 3,34 mM Syto 9 und 20 mM Propidiumjodid im Verhältnis 1:1 gut vermischt, 3µl davon zu dem ersten Röhrchen mit einem ml Bakterien gegeben und 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3 µl der gefärbten Bakteriensuspension auf ein Well des Teflonobjektträgers (6 mm Durchmesser) pipettiert und ein Deckglas wurde vorsichtig aufgelegt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung mit Hilfe eines Zähllokulars (10x10 Teilquadrante) bei 1000-facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenzmikroskop, Filtersatz 03 (Texas Red), maximale Anregung bei 570 nm, maximale Emission bei 610 nm. 20 Großquadrate wurden pro Well ausgezählt und die Zahl der toten Bakterien nach der bereits bei der DAPI-Färbung verwendeten Gleichung berechnet (Abschnitt 3.2.3). Lebende Bakterien wurden mit Hilfe des Filtersatzes 02 (Fluoreszeinisothiocyanat), maximale Anregung bei 495 nm, maximale Emission bei 530 nm nur mikroskopiert und nicht gezählt.

Um die Gesamtbakterienzahl ermitteln zu können, wurden gleichzeitig 10 µl aus dem zweiten Röhrchen mit einem ml verdünnter Bakteriensuspension auf ein Well des Epoxidobjektträgers

(6,7 mm Durchmesser) pipettiert und bei 70°C ca. 10 min getrocknet. Danach wurde ein Tropfen Citifluor AF1 auf das Well aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Zähllokulars (10x10 Teilquadrate) bei 1000-facher Vergrößerung mit Phasenkontrast (Phase 3). 10 Großquadrate wurden pro Well ausgezählt und die Gesamtbakterienzahl wurde wie oben beschrieben ermittelt.

3.2.6 Stimulation der DZ durch lebende Probiotika

Die Stimulationsversuche mit lebenden Bakterien wurden wie im Abschnitt 3.2.4 (Stimulation der DZ durch UV-inaktivierte Probiotika) beschrieben durchgeführt, um die Effekte von lebenden bzw. UV-inaktivierten Probiotika auf humane DZ vergleichen zu können. Immature DZ wurden von der 6-Well Platte geerntet, auf die 12-Well Platte ausgesät und mit lebenden Probiotika in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle für 24 h stimuliert. Als Positivkontrolle wurde LPS in der Konzentration 50 ng/ml angesetzt. Als Negativkontrolle diente 0,4 ml Zellkulturmedium mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml). Nach Stimulation wurden DZ geerntet, die Zellkulturüberstände wurden für die Zytokinbestimmungen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. DZ wurden mit fluorochrommarkierten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Die Vorversuche zeigten jedoch, dass für die Stimulation mit lebenden Probiotika im Vergleich zu UV-inaktivierten Bakterien zwei Reagenzien zusätzlich benötigt wurden. Erstens, veränderte sich der pH-Wert des Zellkulturmediums im Well durch die von den Bakterien produzierte Milchsäure (von 7,5 bis auf 6,5 nach Stimulation mit LGG). Im sauren Milieu zeigten DZ inflammatorische Reaktionen und starben vermehrt. Um die Milchsäure abzupuffern, wurde bei jedem Stimulationsansatz mit lebenden Probiotika 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure)) Lösung pro Well (auch mit Positiv- bzw. Negativkontrolle) dazugegeben. Zweitens, waren lebende Bakterien trotz des für sie ungeeigneten Zellkulturmediums unter aeroben Bedingungen teilungsfähig. Um dies zu verhindern, wurde sofort, 1 h, 2 h und 4 h nach dem Beginn der Stimulation 100 U/ml Penizillin G pro Well angesetzt. Da bakterielles Wachstum auch nach 4 h nicht beobachtet wurde (bestätigt durch die Bestimmung der Gesamtbakterienzahl), fand die Penizillinzugabe bei allen weiteren Versuchen 4 h nach Stimulation statt.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Die phänotypische Charakterisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines 6-Farben Durchflusszytometers (FACS Canto) und wurde mittels BD FACSDivaTM 5.0-Software ausgewertet. Die Grundlage dieser Methode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die unter Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpern, welche gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren gerichtet sind, durchgeführt wird. Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptkomponenten: Flüssigkeitssystem, Optik und Elektronik. Das Flüssigkeitssystem transportiert gefärbte Zellen und führt sie in einem laminaren Probenstrom, hydrodynamisch fokussiert, zur Analyse durch den Laserstrahl. Die Anregungsoptik besteht beim FACS Canto aus zwei Lasern: Coherent[®] SapphireTM-Festkörperlaser 488 nm (blau) und JDS UniphaseTM HeNe 633 nm (rot). Wenn Zellen einzeln den Laserstrahl passieren, streuen sie das auftreffende Laserlicht. Dabei fluoreszieren alle zellgebundenen Fluoreszenzmoleküle und das gestreute und fluoreszierende Licht wird von den entsprechend positionierten Linsen (Reflektionsoptik) gesammelt. Die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale ist proportional zur Zahl der fluorochrom-markierten Moleküle auf der Zelle. Eine Kombination aus Strahlteilern (Splitter) und Filtern leitet diese Signale zu den entsprechenden Detektoren. Dies sind eine Photodiode und sogenannte Photomultiplier-Röhrchen (photomultiplier tubes, PMT's). Die Photodiode wird für die Detektion des starken FSC-Signals benutzt. PMT's werden verwendet, um die schwachen Lichtsignale des SSC und der Fluoreszenzen in elektronische Signale umzuwandeln. Die Intensität dieser elektronischen Signale ist proportional zu den auftreffenden optischen Signalen. Die elektronischen Signale werden in digitale Signale umgewandelt, die anschließend mittels einer entsprechenden Software graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Durchflusszytometriedaten werden in einem festgelegten Format, dem Flow Cytometry Standard (FCS), gespeichert.

Bei der Durchflusszytometrie hängt das Maß der Lichtstreuung von folgenden physikalischen Eigenschaften einzelner Zellen ab: Größe und interne Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC, gemessen mittels einer Photodiode entlang der Achse des einfallenden Lichtes) ist proportional zur Zelloberfläche oder –größe. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC, gebündelt mittels einer Sammellinse in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht) ist proportional zur internen Komplexität, auch Zellgranularität genannt. Faktoren, die die Lichtstreuung beeinflussen, sind z. B. Zellmembranen, der Zellkern, Mitochondrien, Phago-/Lysosomen etc. Die gleichzeitige Messung des FCS und SSC und deren korrelierte Darstellung ermöglichen die Unterscheidung von Zelltypen. DZ sind große Zellen mit hoher

interner Komplexität. Deshalb lassen sie sich von der kontaminierenden Lymphozytenpopulation (kleine Zellen) in den Proben unterscheiden. Die Abbildung 5 zeigt 2-D Darstellungen (Plots) von DZ, die im Versuch vom 22.02.2006 als Negativkontrolle (immature DZ) und Positivkontrolle (Stimulation durch LPS, mature DZ) verwendet wurden. Es handelt sich dabei um eine Punktwolkendarstellung (DotPlot), bei der zwei Fenster (Gates) auf zwei verschiedene Zellpopulationen, basierend auf Zellgröße und Granularität, gesetzt wurden. Um den Zellschrott (Debris) weitgehend von der Datenaufnahme auszuschließen, muss der FSC-Schwellenwert (Threshold, schwarzer Pfeil auf der Abbildung 5) optimal eingestellt werden. Im Schwellenwert- oder Triggerparameter wird eine untere Signalgrenze definiert, die vom entsprechenden Signal der Zelle überschritten werden muss, damit die Daten der Zelle zur Aufzeichnungen bzw. Darstellung gelangen. Auf der Abbildung liegt der Threshold bei 50,000.

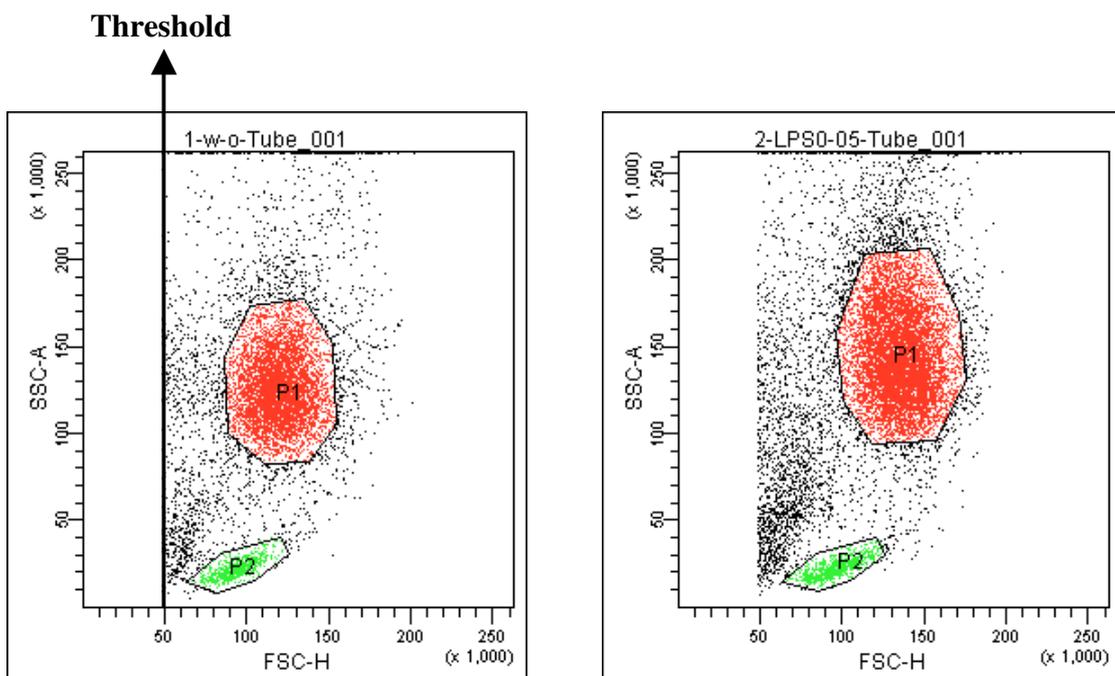


Abbildung 5: FCS/SSC Einstellungen für immature (links) und mature (rechts) DZ nach LPS-Stimulation

Abszisse: FSC, Ordinate: SSC

P1 (rote Wolke): Population 1, DZ

P2 (grüne Wolke): Population 2, Lymphozyten

Parallel zur Bestimmung der Zellgröße und –granularität werden bei der Durchflusszytometrie Fluoreszenzsignale detektiert. Diese Signale entstehen bei der Anregung von Fluorochromen durch Laserlicht und anschließende Emission eines Photons mit einer größeren Wellenlänge. Da die Bindung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörper an die extra- und intrazellulären Antigene spezifisch ist, wird dabei das Färbemuster jeder Zellpopulation in der Probe identifiziert und ihr prozentualer Anteil berechnet. Es wurde ausschließlich direkte Fluoreszenzfärbung verwendet, d.h. die Antikörper wurden direkt mit Fluorochromen konjugiert. Die optimale Antikörperkonzentration für die Durchflusszytometrie (siehe Tabelle 2) wurde durch Titrationsreihen bei den Vorversuchen bestimmt. Die verwendeten Fluorochrome sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Dabei gehört z. B. FITC zur Gruppe kleiner organischer Moleküle, PE, APC und PerCP – zu fluoreszierenden Proteinen.

Fluorochrom	Max. Anregung	Max. Emission	Farbe
FITC	488 nm	519 nm	grün
PE	488 nm	578 nm	gelb
APC	595/633 nm	660 nm	rot
PerCP	488/532 nm	678 nm	rot

Tabelle 3: Verwendete Fluorochrome

(Trainingshandbuch „Durchflusszytometrie“, BD Biosciences)

Im FACS Canto können die Zellen gleichzeitig mit sechs verschiedenen Fluorochromen markiert werden, wenn sich jedes bei 488 oder 633 nm anregen lässt und die Wellenlängen der entsprechenden Emissionspeaks sich nicht extrem überlappen. Bei allen Versuchen mit UV-inaktivierten und lebenden probiotischen Bakterien wurde eine 2-Farben Kombination (FITC/PE) verwendet, in einigen Vorversuchen – eine 4-Farben Einstellung (FITC/PE/APC/PerCP). DZ aus den Kavitäten mit verschiedenen Stimulationsansätzen, sowie Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden mit je fünf (2-Farben) bzw. drei (4-Farben) unterschiedlichen Antikörperkombinationen gefärbt. Die verwendeten Ansätze sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu berücksichtigen, wurden pro Stimulationsansatz Färbungen mit Isotyp-Kontrollen der entsprechenden Antikörper durchgeführt.

	FITC	PE
1. Röhrchen	IgG1	IgG1
2. Röhrchen	CD83	CD1a
3. Röhrchen	CD86	CD80
4. Röhrchen	CD14	CD40
5. Röhrchen	CD3	HLA-DR

Tabelle 4: 2-Farben Ansatz

	FITC	PE	APC	PerCP
1. Röhrchen	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
2. Röhrchen	CD86	CD80	CD14	HLA-DR
3. Röhrchen	CD83	CD1a	CD40	CD3

Tabelle 5: 4-Farben Ansatz

Für die Färbung wurden je nach Stimulationsansatz zwischen 1×10^4 und 5×10^5 DZ pro Röhrchen eingesetzt und in einem Volumen von 100 μ l FACS-Puffer (PBS + 2% FCS) mit den jeweiligen Antikörpern 20 Minuten im Dunkeln bei +4°C inkubiert. Danach wurden je 1,8 ml FACS-Puffer pro Röhrchen dazugegeben und nach kurzem Vortexen abzentrifugiert (10 min, 350 rcf, 22°C). Anschließend wurden die Überstände vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, DZ in 350 μ l FACS-Puffer resuspendiert und die Proben bis zur Analyse im Dunkeln aufbewahrt. Pro Färbung erfolgte eine Aufnahme von mindestens 1×10^4 DZ.

Für die Messung der Proben wurde eine eigene Geräteeinstellung verwendet. Zu dem in der Abbildung 5 gezeigten Threshold gehören zu den Geräteeinstellungsparametern (Instrument Settings) Spannungseinstellung (Grad der Fluoreszenzsignalverstärkung) und Kompensation. Die genauen Werte für die Spannungseinstellung sind von der Art der Zellen, Probenvorbereitung und den optischen Eigenschaften des Durchflusszytometers abhängig. Die Kompensation ist notwendig bei der Verwendung von zwei und mehreren Farben, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Dabei wird der jeweils in das fremde Spektrum reichende Anteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert. Die Kompensationswerte sind von den verwendeten Fluorochromen und der Spannungseinstellung abhängig. Zur Berechnung der Negativität und der Autofluoreszenz werden die ungefärbten Zellen benötigt.

Die Abbildungen 6-10 stellen DotPlots von immaturren und maturen (LPS-stimulierten) DZ in einem 2-Farben-Ansatz dar. Die Abbildung 6 präsentiert die Isotyp-Kontrollen. Diese Kontrollen können dazu benutzt werden, um die Quadrantenmarker zu setzen. Ein Quadrantenmarker teilt Plots in vier Sektionen oder Quadrantenbereiche Q1,-2,-3,-4, die erlauben, nur ungefärbte, einzeln markierte oder doppelt markierte Zellen getrennt zu erfassen. Um die Zellvariabilität von verschiedenen Spendern zu berücksichtigen und die Proben vergleichen zu können, wurden Quadranten an der Grenze zwischen den Wolken der entsprechenden Marker von immaturren bzw. maturen DZ gesetzt (Abbildungen 7 bis 10).

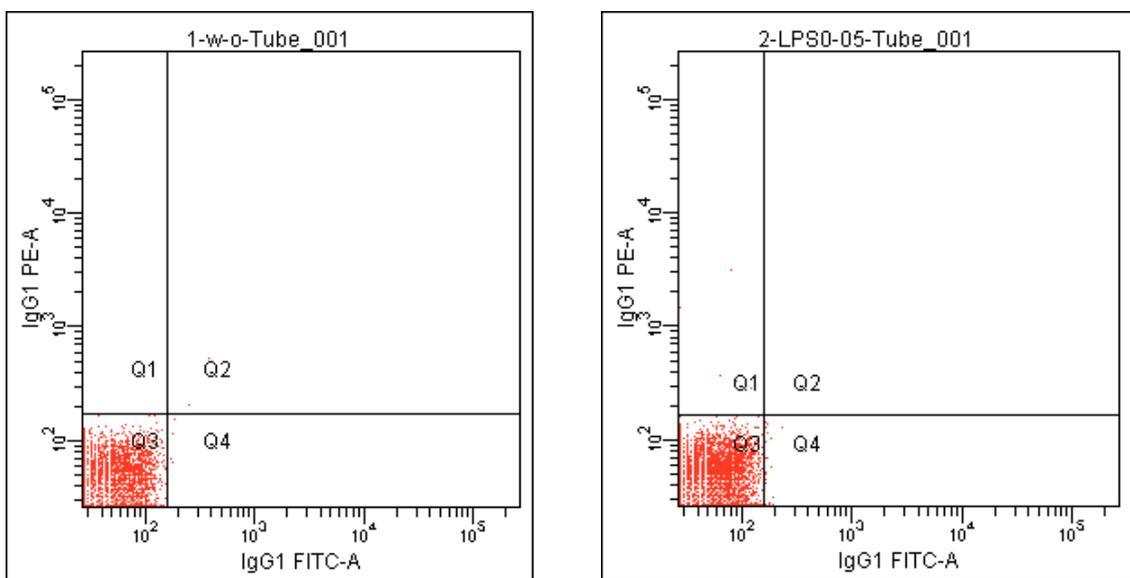


Abbildung 6: Isotyp-Kontrollen

Abszisse: IgG1 FITC, Ordinate: IgG1 PE

links: unstimulierte, immature DZ

rechts: LPS-stimulierte, mature DZ

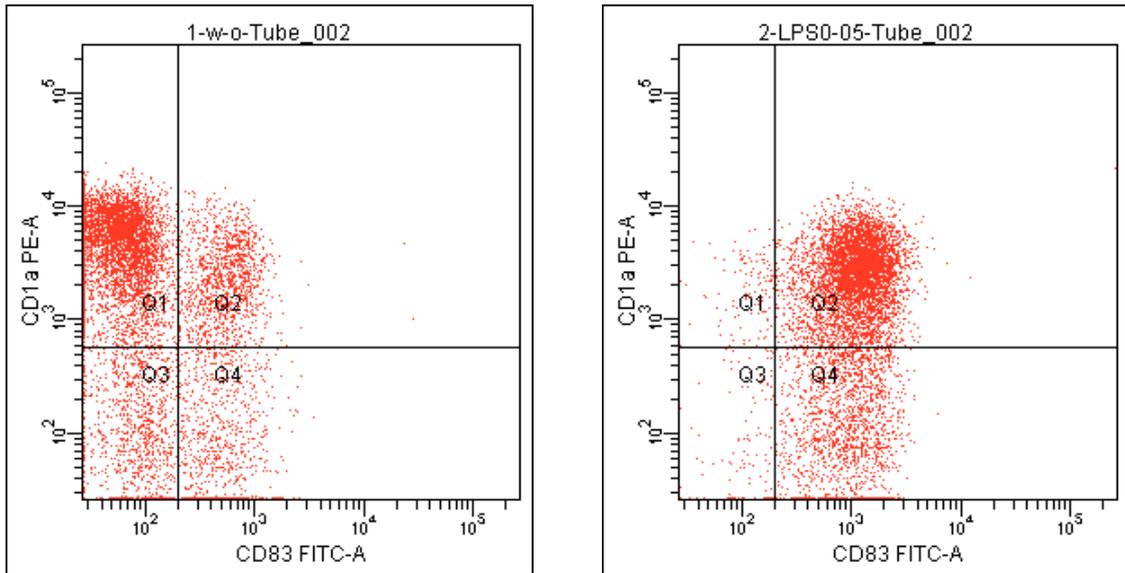


Abbildung 7: Darstellung CD83- und CD1a-positiver Zellen

Abszisse: CD83 FITC, Ordinate: CD1a PE

links: unstimulierte, immature DZ

rechts: LPS-stimulierte, mature DZ

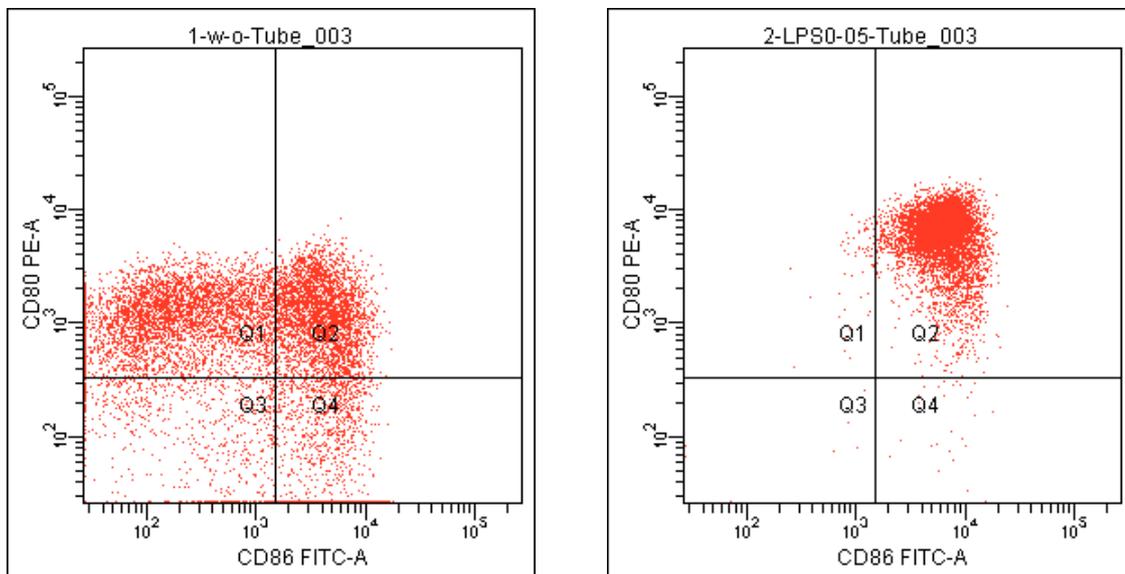


Abbildung 8: Darstellung CD86- und CD80-positiver Zellen

Abszisse: CD86 FITC, Ordinate: CD80 PE

links: unstimulierte, immature DZ

rechts: LPS-stimulierte, mature DZ

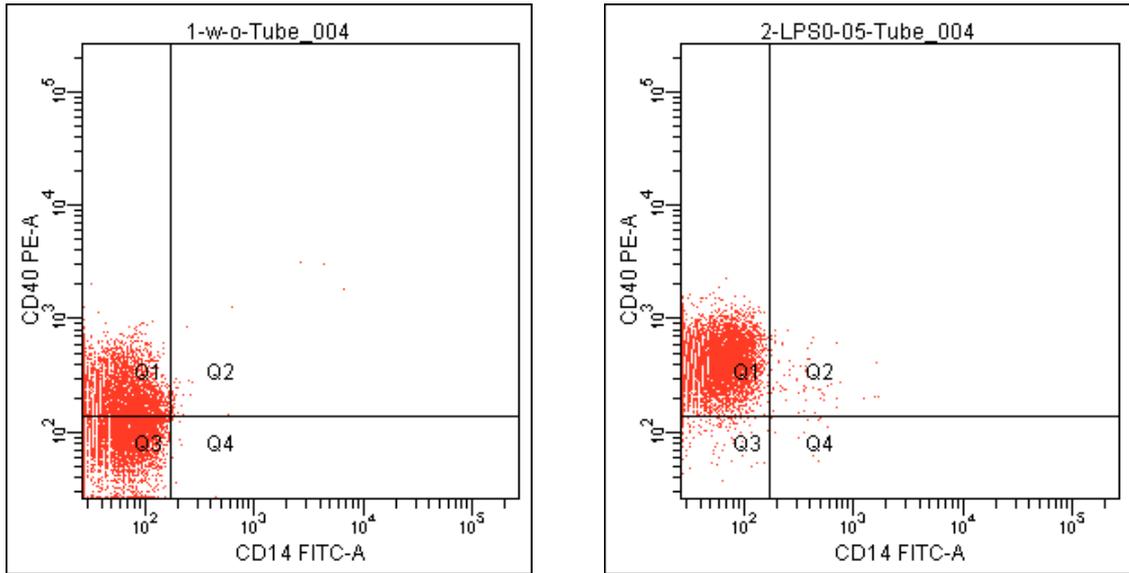


Abbildung 9: Darstellung CD14-negativer und CD40-positiver Zellen

Abszisse: CD14 FITC, Ordinate: CD40 PE

links: unstimulierte, immature DZ

rechts: LPS-stimulierte, mature DZ

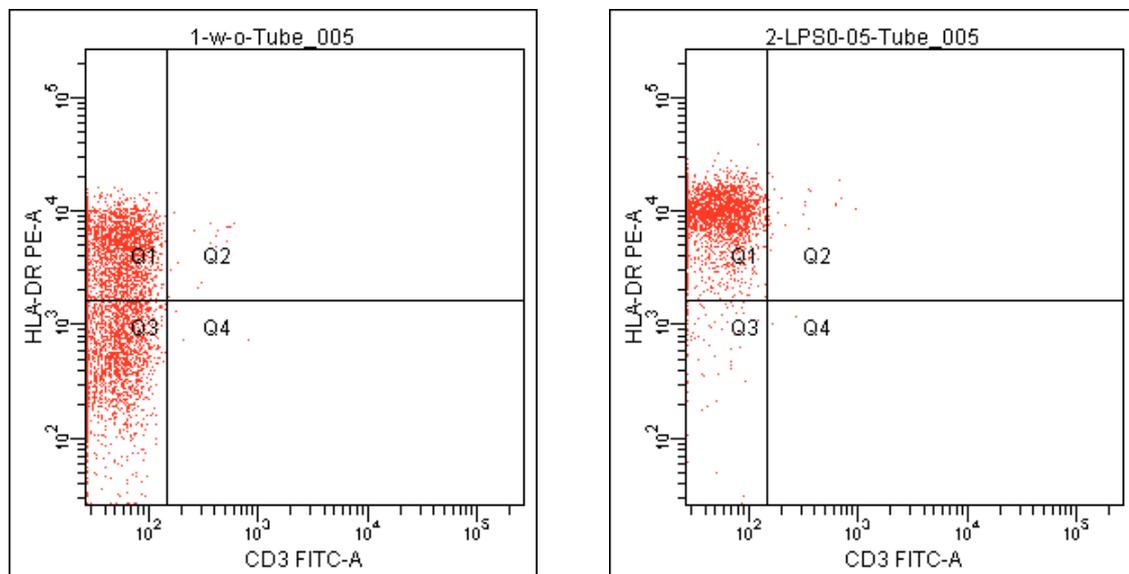


Abbildung 10: Darstellung CD3-negativer und HLA-DR-positiver Zellen

Abszisse: CD3 FITC, Ordinate: HLA-DR PE

links: unstimulierte, immature DZ

rechts: LPS-stimulierte, mature DZ

Zusammengefasst wurden immature DZ nach dem Prozentsatz folgender DZ-typischer Moleküle exprimierender Zellen definiert: CD83^{niedrig}, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2)^{moderat}, CD40^{hoch}, HLA-DR (MHC-Klasse-II-Moleküle)^{hoch}. Mature DZ (nach 24 oder 48 h Stimulation durch LPS) wurden wie folgt definiert: CD83^{hoch}, CD80 und CD86^{hoch}, CD40^{hoch}, HLA-DR^{hoch}. Der Prozentsatz von CD1a⁺ Zellen war variabel und vom Maturationsgrad der DZ unabhängig. Der Anteil von CD14⁺ Zellen war niedrig. Zusätzlich wurden die Anteile kontaminierender CD3⁺ T-Zellen ermittelt. Kontaminierende CD19⁺ B-Zellen, CD16⁺ NK-Zellen wurden nur in den Vorversuchen analysiert.

3.2.8 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen (Bio-Plex)

Zur Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen in den Zellkulturüberständen wurde der Bio-Plex Zytokinassay verwendet. Durch die Anwendung einer speziellen Technologie (Luminex multianalyte profiling technology, Lab-MAP oder xMAP) erlaubt diese Methode den gleichzeitigen Nachweis von bis zu 100 Zytokinen in einer Kavität der 96-Well Mikroplatte. In verschiedenen Studien¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ ist die Lab-MAP Technologie für den Zytokinnachweis im Serum und in Zellkulturüberständen (u. a. von stimulierten PBMZ) validiert worden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sensitivität, Präzision und Richtigkeit dieses Multiplexassays mit dem „Goldstandard“ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) vergleichbar ist. Bei den ungefähr gleichen Kosten sind der Nachweis mehrerer Analyten gleichzeitig in einer Probe, der geringere Zeitaufwand und das kleinere Probenvolumen von Vorteil.

Die Grundlage dieser Methode ist die Anwendung von Mikrosphären (5,6 µm Polystyrol-Beads). Diese Beads sind mit einer Mischung aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen (rot und orange) in unterschiedlichen Verhältnissen kodiert (sogenannte spektrale Adresse). Innerhalb einer spektralen Adresse ist jeweils ein zytokinspezifischer Antikörper kovalent an die Beads gekoppelt. Der Komplex Beads-Antikörper reagiert mit einer Probe (unbekannte Zytokinkonzentration) oder mit einer Standardlösung (bekannte Zytokinkonzentration). Die ungebundenen Proteine werden durch Waschen entfernt. Danach wird ein biotinylierter Antikörper (spezifisch für ein anderes Epitop des gleichen Analyts) zu den Beads gegeben. Das Ergebnis ist die Bildung eines „Sandwichs“ aus den Antikörpern um das Zytokin. Anschließend wird ein fluoreszenz-markierter Reporter (Streptavidin-Phycoerythrin) zu dem Reaktionskomplex dazugegeben, welcher an die biotinylierten Antikörper bindet. Der Assay wird in der Mikrotiterplatte auf eine Mikroplattenplattform positioniert und mit Hilfe eines durchflusszytometrisch basierten Systems bestehend aus zwei Lasern detektiert. Der rote

Laser klassifiziert Beads mit den gebundenen Zytokinen anhand ihrer spektralen Adresse. Die Zytokinkonzentration ist proportional der Intensität des Signals vom Streptavidin, detektiert durch den grünen Laser. Die Messungen werden mittels Bio-Plex Manager Software 4.1 analysiert.

Basierend auf den Ergebnissen von Vorversuchen und Literaturrecherchen wurden aus bei Fa. Bio-Rad verfügbaren humanen Einzel-plex Zytokinassays folgende neun Assays ausgesucht und in Form eines fertigen 9-plex Assays bestellt: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF- α . Zusätzlich wurden in den ausgewählten Proben IL-5 und IL-13 bestimmt. Die Überstände wurden einmal aufgetaut und für den Nachweis von IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β und TNF- α 1:10 mit dem Zellkulturmedium verdünnt. Zu dem lyophilisierten Standard (eine Mischung aus 27 Zytokinen in bekannten Konzentrationen) wurden 500 μ l Zellkulturmedium gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden Serienverdünnungen des Standards (1:4) im Zellkulturmedium vorbereitet, um acht Punkte für die Standardkurve zu bekommen. Anti-Zytokin konjugierte Beads (25 x konzentriert) wurden 30 s gevortext und mit Bio-Plex Assay Puffer verdünnt. Der Druck der Vakuumpumpe wurde auf 3-5 mm Hg eingestellt. Je 100 μ l Assay Puffer wurden in die benötigten Wells der 96-Well Filterplatte pipettiert und mittels der Vakuumpumpe abgesaugt (dient der Befeuchtung des Filters). Dabei wurden leere Wells mit einer Folie abgedeckt. Die verdünnten Beads wurden gevortext und zu jedem Well 50 μ l (ca. 5000 Beads) dieser Arbeitslösung gegeben. Der Puffer wurde durch Absaugen entfernt und die Platte wurde zweimal mit 100 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen. Danach wurden die Standards, Proben und die gleichen Mengen von Zellkulturmedium (Negativkontrolle) in die Wells pipettiert. Die Platte wurde mit Alufolie abgedeckt und nach kurzem Aufschütteln bei maximaler Geschwindigkeit auf dem Plattformschüttler 30 min bei 150 rpm und RT inkubiert. Während der Inkubation wurden detektierende Antikörper (10 x oder 50 x konzentriert) mit einer vorgefertigten Lösung verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Platte wurden 25 μ l Antikörperlösung pro Well dazugegeben und die Inkubation auf dem Plattformschüttler wiederholt. Parallel dazu wurde Streptavidin-PE (100 x konzentriert) mit Puffer verdünnt. Die Platte wurde dreimal gewaschen und 50 μ l Streptavidinlösung wurden pro Well pipettiert. Anschließend wurde die Filterplatte 10 min bei 150 rpm und RT inkubiert und dreimal gewaschen. Beads wurden in je 125 μ l Assay Puffer pro Well resuspendiert und die Platte wurde bis zur Messung im Dunkeln bei +4°C aufbewahrt (maximal 24 h). Unmittelbar vor der Messung erfolgte ein kurzes Aufschütteln der Platte bei der höchsten Geschwindigkeit. Der Bio-Plex Suspension Array Reader wurde täglich mit Hilfe des Bio-Plex Calibration Kits kalibriert. Jede Platte wurde

zweimal gemessen: einmal mit niedrigen und einmal mit höheren PMT (photomultiplier tube, Photomultiplier-Röhrchen, s. Abschnitt 3.2.7) Einstellungen (settings), um Fluoreszenzsignale im oberen (low sensitivity) bzw. unteren (high sensitivity) Bereich zu erfassen. Für jede Messung wurde ein Protokoll erstellt. Beim Eingeben von Informationen über Standards wurde recovery percentage range (Verhältnis der gemessenen Zytokinkonzentrationen zu erwarteten Konzentrationen in Prozent) zwischen 70% und 130% festgelegt. Da die typische Antwort eines Immunassays nicht linear ist, wurde zum Erstellen der Standardkurve 5-Parameter logistische Regression¹⁴⁸ (5 PL) angewandt. Die gemessenen Konzentrationen der Zytokine aus dem Standard wurden anhand der Standardkurven und Fluoreszenzintensitäten der Standardverdünnungen zurückgerechnet (Backcalculation of Standards). Die Werte, die unter- bzw. oberhalb recovery range lagen, wurden als sogenannte „Outlier“ (Ausreißer) oder partielle Outlier (d. h. nur ein Wert aus zwei Duplikaten außerhalb der Grenzen), definiert und aus der statistischen Berechnung ausgeschlossen (Abbildung 11).

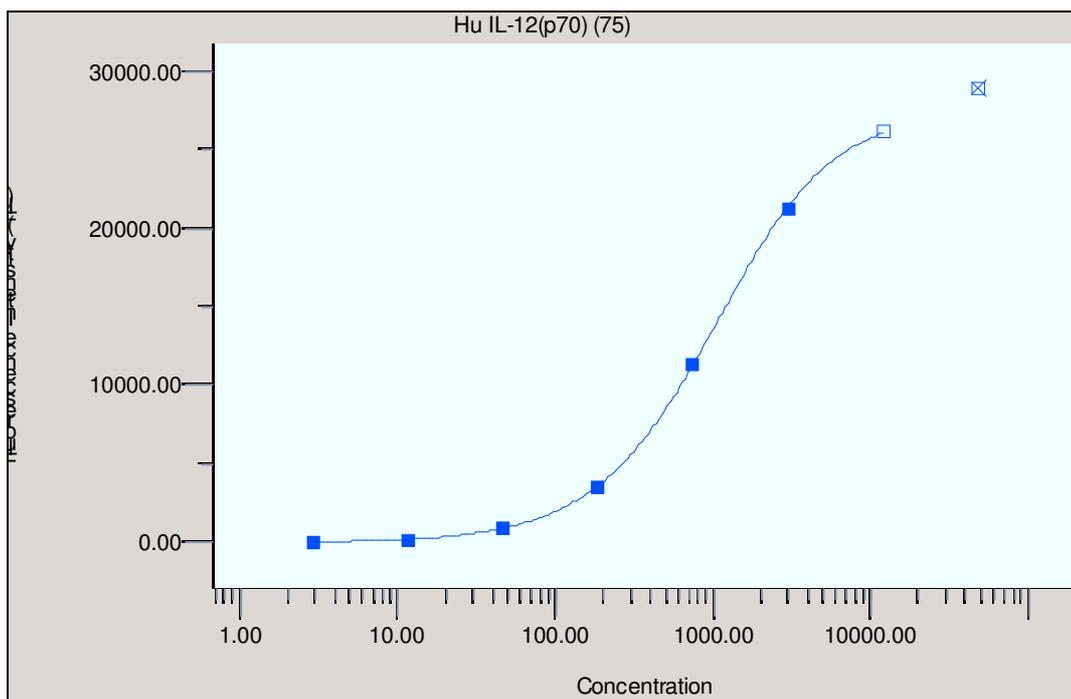


Abbildung 11: 9-plex Assay vom 21.03.07, IL-12-Standardkurve (high PMT settings)

Abszisse: Log der Konzentration von IL-12

Ordinate: Relative mittlere Fluoreszenzintensität

- Standard
- ⊠ Outlier
- Partieller Outlier

Die unbekanntenen Zytokinkonzentrationen der Proben wurden aus den Standardkurven abgeleitet. Die gemessenen Konzentrationen, welche außerhalb recovery range von 70%-130% waren, wurden als unzuverlässig betrachtet und aus den Datenreihen ausgeschlossen. Für die Berechnungen wurden mindestens 100 Beads pro Parameter/Well analysiert. Die Nachweisgrenzen der verschiedenen Zytokine lagen von 1,95 pg/ml bis 11385 (IL-13) bzw. 109650 (TNF- α) pg/ml.

3.2.9 Statistische Auswertung

24 h nach Stimulation mit LPS wurde Maturation von DZ (im Weiteren LPS-Maturation genannt) als 100% für den jeweiligen Versuch definiert. Um den Maturationsgrad von DZ unter Stimulation von eingesetzten probiotischen Bakterien ermitteln zu können, wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{\text{MM (Probiotikum)} - \text{MM (Negativkontrolle)}}{\text{MM (LPS)} - \text{MM (Negativkontrolle)}} \times 100\%$$

MM – Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR (% von positiven Zellen im DZ-Fenster).

Falls der Wert des entsprechenden MM aus dem Well mit der Negativkontrolle höher als Positivkontrollen- bzw. Probiotikumwert war oder Negativ- und Positivkontrollen gleich waren, wurde das Ergebnis der Gleichung als Null angenommen. Um statistische Berechnungen durchführen zu können, wurden restliche Oberflächenmarker (CD1a, CD14 und CD3) und Zytokine auf LPS normalisiert. Alle weiteren Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Bei den vorliegenden Ergebnissen der Zytokinmessungen war keine Normalverteilung zu erwarten und die Mittelwerte der Oberflächenmarker wichen teilweise deutlich von den Median-Werten ab. Deswegen wurden für die statistische Auswertung nicht-parametrische Tests angewendet. Alle Tests erfolgten zweiseitig. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von weniger oder gleich 5% ($p \leq 0,05$) angenommen.

Um signifikante Unterschiede zwischen allen Bakterienstämmen (UV-inaktiviert und lebend getrennt) bei verschiedenen Konzentration von Bakterien pro DZ zu ermitteln, wurde der Kruskal-Wallis-Test für mehrere unverbundene Proben angewendet. Die Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (MWU) für unverbundene

Proben berechnet. Um zu prüfen, ob dosisabhängige Effekte innerhalb eines probiotischen Stammes bei wiederholten Messungen bestanden, wurde der Friedman-Test für mehrere verbundene Proben angewandt. Unterschiede zwischen zwei verbundenen Proben wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Für die Berechnungen wurde das SPSS-Statistikprogramm, Version 15.0 verwendet. Die Graphiken wurden anhand des Programms Excel XP erstellt.

Bis zu 19 Parameter (acht Oberflächenmarker und 11 Zytokine) wurden pro individuellem Stimulationsansatz durch einen probiotischen Stamm (tot oder lebend) in einer bestimmten Konzentration evaluiert. Aus diesem Grund und ferner aus Notwendigkeit, für die Planung weiterer Arbeiten die Anzahl der Stämme bzw. Konzentrationen zu reduzieren, übernahm Dr. P. Pagel (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, Technische Universität München und Institut für Bioinformatik und Systembiologie/MIPS, Helmholtz Zentrum München) freundlicherweise die Durchführung der Korrelationsanalysen und des hierarchischen Clusterings. Am Anfang wurden die rohen Daten wie bereits beschrieben, auf LPS normalisiert und die Replikate als arithmetische Mittel zusammengefasst. Die weiteren Analysen beschränkten sich auf drei Konzentrationen: 1:1, 10:1 und 100:1 UV-inaktivierte und lebende Bakterien pro dendritischer Zelle. Anschließend wurde je eine Korrelationsmatrix für Parameter und Bakterienstämme, jeweils für eine Kombination der Konzentration und des Zustandes der Bakterien (tot/lebend) erstellt. Die Farbskala zeigte dabei den Wertebereich des Korrelationskoeffizienten nach Pearson: rot (-1 bis 0), weiß (0) und grün (0 bis +1) mit jeweiligen Übergängen. Da die rohen Messwerte der Oberflächenmarker und Zytokine einen großen Zahlenbereich überdeckten, war es notwendig, eine Z-Transformation durchzuführen. Dafür wurde ein Z-score für jeweilige Zeile (=jeden Parameter) berechnet. Dieser score (Punktzahl) ist eine dimensionslose Größe und zeigt, wie viele Standardabweichungen eine Stichprobe von dem Mittelwert der Population entfernt ist. Er ist negativ, wenn die Stichprobe kleiner als der Mittelwert ist und positiv, wenn die Stichprobe größer als der Mittelwert ist. Die Z-scores sind in den Grafiken in verschiedenen Blautönen wiedergegeben. Dabei sind niedrige Werte heller und höhere dunkler. Das Clustering wurde anhand dieser transformierten Werte durchgeführt, dabei wurde die Pearsonkorrelation als Ähnlichkeitsmaß verwendet.

4. ERGEBNISSE

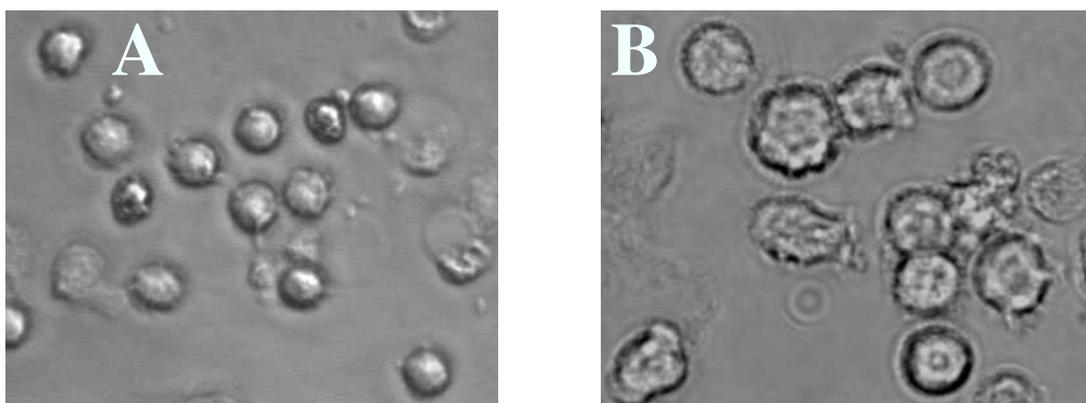
4.1 Generierung dendritischer Zellen

4.1.1 Etablieren der Methode

4.1.1.1 Austesten des peripheren Blutes versus Buffy Coat

In den ersten Vorversuchen wurde getestet, ob Buffy coat (Blutbeutelssystem A, siehe Abschnitt 3.2.1.1) oder peripheres Blut gesunder Spender für die Isolierung von Monozyten besser geeignet waren. Es stellte sich heraus, dass die Abtrennung von Leukozyten über den Filter zu einer vorübergehenden Adhärenz der Monozyten an der Filteroberfläche führte. Dadurch wurden die Monozyten bereits vor der Anreicherung voraktiviert. Aus diesen Monozyten generierte immature DZ-Population zeigte entweder einen hohen Prozentsatz von CD83⁺ Zellen, welcher ein Maturationsmerkmal darstellt, oder maturierte nicht unter Stimulation und ging stattdessen in die Apoptose. Deshalb wurde bei den weiteren Versuchen für die Isolierung von Monozyten und die Generierung von immaturren DZ (Abbildung 12) peripheres Blut gesunder Spender verwendet.

Um für die Etablierung der 4-Farben Durchflusszytometrie ausreichend DZ generieren zu können, wurden Monozyten aus dem Buffy coat (Blutbeutelssystem B) isoliert. Da die Leukozytendepletion ohne Hilfe eines Filters stattfand, waren die Monozyten nicht voraktiviert. Dabei war der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen in der Population immaturren DZ niedrig. Jedoch waren die Kosten und der Zeitaufwand bei der Aufarbeitung dieses Buffy coats höher als bei der Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut.



**Abbildung 12: Charakteristische Morphologie von aus peripherem Blut isolierten Monozyten (A) und immaturren DZ (B)
(Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung)**

4.1.1.2 Austesten des Humanserums

Nachdem festgestellt wurde, dass peripheres Blut für die Isolierung von Monozyten am besten geeignet war, wurden andere Faktoren, welche die Eigenschaften von Monozyten und DZ beeinflussen konnten, untersucht. U. a. wurde das in den ersten Versuchen verwendete kommerzielle Humanserum mit dem im Institut für Transfusionsmedizin (Suhl) hergestellten Serum verglichen. Die Anwendung vom Zellkulturmedium mit diesem Humanserum hatte folgende Vorteile gegenüber dem kommerziellen Serum: reinere Monozytenpopulation nach der Plastikadhärenz, höhere Überlebensrate der Zellen in der Kultur und größere Population von immaturren DZ. Deswegen wurde bei allen Versuchen mit probiotischen Bakterien das Humanserum aus dem Institut für Transfusionsmedizin verwendet.

4.1.1.3 Austesten der verschiedenen Positivkontrollen

Um den Maturationsgrad von DZ unter Stimulation von probiotischen Bakterien ermitteln zu können, wurden immature DZ mit bekannten Maturationsfaktoren¹⁴⁹⁻¹⁵¹ stimuliert. Folgende Positivkontrollen wurden ausgetestet: definierter Zytokincocktail („Jonuleit“), doppelsträngige RNA (dsRNA) und LPS. Nach 24 h Stimulation hatten die Zellen durchflusszytometrisch das Stadium maturer DZ (siehe Abschnitt 3.2.7) unter allen ausgetesteten Stimuli erreicht. Durch „Jonuleit“ maturierte DZ erschienen weniger adhärent als DZ, welche mit LPS und dsRNA stimuliert wurden. Da LPS jedoch ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Wand und ferner kostengünstiger als die übrigen Maturationsfaktoren ist, wurde bei allen weiteren Versuchen dieser Stimulus als Positivkontrolle verwendet.

LPS wurde in 10-fachen Schritten austitriert: von 0,5 µg/ml bis 5 pg/ml. Es wurde festgestellt, dass die minimale LPS-Konzentration, unter welcher DZ maturierten, 50 pg/ml war. Die Stimulation mit LPS für 48 h zeigte im Vergleich zum 24 h-Ansatz keinen Unterschied.

4.1.2 DZ-Population und Kontaminanten

Durch Plastikadhärenz angereicherte Monozyten wurden in Vorversuchen mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und am sechsten (siebten) Tag mit LPS stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und geerntet. Mature DZ waren nicht-adhärent und zeigten die typische Morphologie mit vielen Fortsätzen (Abbildung 13).

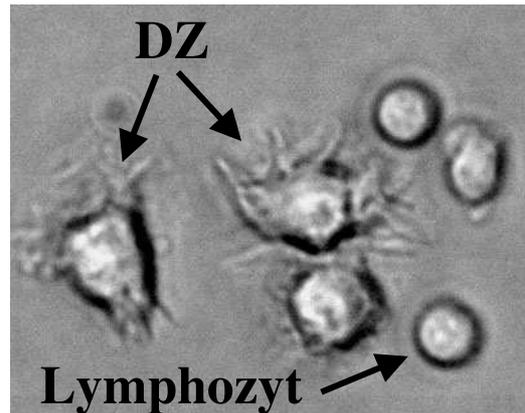


Abbildung 13: LPS-Stimulation: charakteristische Morphologie von maturen DZ und kontaminierenden Lymphozyten (Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung)

Pro Well einer 6-Well Platte wurden $9,6 \pm 1,2 \times 10^6$ (n=10) PBMZ angesetzt, um $4,1 \pm 3,5 \times 10^5$ mature DZ (Well mit LPS-stimulierten Zellen, im Weiteren nur LPS-Well genannt) zu generieren (Ausbeute $4,3 \pm 3,6\%$). Durchflusszytometrische Untersuchungen der kultivierten Zellen zeigten, dass es sich um eine Mischpopulation bestehend aus $47 \pm 19\%$ DZ und $31 \pm 17\%$ kontaminierender Lymphozyten handelte. Tabelle 6 zeigt den Anteil maturer CD83⁺ und CD1a⁺ DZ, Lymphozyten (CD3⁺ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen und CD16⁺ NK-Zellen) und CD14⁺ Zellen (vermutlich Makrophagen) in Prozent von allen analysierten Zellen aus dem LPS-Well der 6-Well Platte 24 h nach LPS-Stimulation.

Marker	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
CD83	10	40,6	23,0	73,8	17,5
CD1a	10	29,7	15,8	62,5	15,4
CD3	10	10,3	0,5	31,6	9,8
CD19	5	18,8	6,4	24,5	7,3
CD16	5	3,8	0,5	10,0	4,5
CD14	10	3,6	0,4	19,7	5,9

Tabelle 6: DZ und Kontaminanten (in % der LPS-stimulierten Zellen)

4.1.3 4-Farben Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen von mit Probiotika stimulierten DZ wurde eine 2-Farben (FITC/PE) Antikörperkombination verwendet. Dabei wurden die geernteten Zellen aus einem Well der 12-Well Platte auf fünf Röhrchen aufgeteilt und mit in der Tabelle 4 aufgelisteten Fluoreszenzantikörpern inkubiert. Die Aufteilung der Zellsuspension stellte sich gelegentlich als schwierig dar, da die Zellzahl nicht ausreichend für alle Färbungen war. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine 4-Farben Kombination basierend auf den Literaturrecherchen und Empfehlungen von Dr. rer. nat. A. Pfeiffer, Applikationsspezialistin der Fa. BD Biosciences, etabliert. Es stellte sich heraus, dass bei der Messung von parallel mit 2- bzw. 4-Farben Kombination gefärbten Zellen prozentuale Anteile von positiven Zellen für Oberflächenmarker nicht übereinstimmten (Tabelle 7, Versuch vom 31.05.06). Deswegen wurde in allen weiteren Versuchen die 2-Farben Einstellung verwendet.

Oberflächenmarker	Negativkontrolle 2-Farben Ansatz	Negativkontrolle 4-Farben Ansatz	Positivkontrolle 2-Farben Ansatz	Positivkontrolle 4-Farben Ansatz
CD83	5,6	26,1	88,9	84,3
CD1a	64	54,8	59,7	46,0
CD86	5,9	22,9	97,2	99,6
CD80	35,1	53,4	99,5	99,6
CD14	0,5	22,7	1,8	7,7
CD40	5,9	61,9	55,6	96,8
CD3	1,6	2,9	1,5	4,8
HLA-DR	32,4	72,7	94	96,8

Tabelle 7: Vergleich der Oberflächenmarker bei 2- bzw. 4-Farben Kombination (in % der unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen)

4.2 Stimulation durch UV-inaktivierte Probiotika

4.2.1 Vorversuche

In den ersten Versuchen wurden DZ mit LGG und *Bifidobacterium species 420* (Bf. 420) stimuliert, welche nach der UV-Inaktivierung im PBS/Glycerin-Gemisch (1 ml PBS + 350 µl Glycerin) bei -80°C eingefroren wurden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Variabilität bei dem wiederholten Anzichten von probiotischen Kulturen zu vermeiden. Dabei wurde die Zahl der Bakterien durch die Ausplattierung (vor der UV-Bestrahlung) und die Auszählung der koloniebildenden Einheiten ermittelt. Die beiden probiotischen Stämme zeigten in allen getesteten Konzentrationen keinen Maturationseffekt auf DZ im Vergleich zu der LPS-Stimulation. Eventuell verhinderte die Glyzeringabe zu der Bakteriensuspension, welche die bakteriellen Zellwände beim Einfrieren vor dem Platzen schützen sollte, die Aufnahme von Bakterien durch DZ. Deswegen wurden die Probiotika unmittelbar vor der Kokultivierung mit DZ mit dem Zellkulturmedium gewaschen. Zusätzlich wurde eine längere Stimulationszeit (48 h statt 24 h) ausgetestet. Da bakterielle Effekte auf DZ trotzdem fehlten, wurden probiotische Stämme nach der UV-Inaktivierung nicht mehr eingefroren, sondern bei +4°C im PBS aufbewahrt. Um die Zahl der Bakterien zu ermitteln, wurde die DAPI-Färbung angewendet. Um ausschließen zu können, dass durch die UV-Inaktivierung die Zusammensetzung von PBS sich verändern und einen Einfluss auf die Maturation von DZ ausüben konnte, wurde diese Lösung in den Vorversuchen parallel zu den Bakterien in einer separaten Petrischale mit UV-Licht bestrahlt. Die Zugabe von bestrahltem PBS ergab in den Stimulationsansätzen keinen Unterschied zur Negativkontrolle.

4.2.2 Charakterisierung der Zellpopulationen

Aus 105 ± 16 ml peripherem Blut (n=15) wurden $6,3 \pm 2,9 \times 10^7$ PBMZ isoliert und anschließend $5 \pm 4,8 \times 10^6$ immature DZ generiert (Ausbeute $9 \pm 12,3\%$). Pro Well einer 12-Well Platte wurden $4 \pm 5,5 \times 10^5$ immature DZ ausgesät und 24 h mit UV-inaktivierten probiotischen Bakterien stimuliert. Aus dem LPS-Well wurden $1,7 \pm 1,1 \times 10^5$ mature DZ geerntet (Recovery oder Rückgewinnung $51,5 \pm 29\%$). Die Mischpopulation in diesem Well bestand aus $50,2 \pm 16\%$ DZ und $21,7 \pm 17\%$ kontaminierender Lymphozyten. Tabelle 8 zeigt den Anteil maturer CD83⁺ und CD1a⁺ DZ, CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ Zellen in Prozent von allen analysierten Zellen aus dem LPS-Well der 12-Well Platte 24 h nach Stimulation.

Marker	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
CD83	15	45,4	12,6	74,5	16,2
CD1a	15	29,9	5,6	64,2	18,9
CD3	15	8,6	1,0	26,1	8,3
CD14	15	3,0	0,1	14,6	3,7

Tabelle 8: Zellsubpopulationen (in % der LPS-stimulierten Zellen) in den Versuchen mit UV-inaktivierten Probiotika

4.2.3 Maturationsmarker an der Oberfläche von DZ

DZ wurden mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 50:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle stimuliert. LGG, LC-01 und BB-46 wurden in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 100:1 und 1000:1 Bakterien pro dendritischer Zelle für Stimulation angesetzt. Alle weiteren Stämme (LA-2, LA-5 und *Lactobacillus reuteri*, LR) wurden in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 getestet. Die Stimulation der DZ mit UV-inaktivierten LGG in den Konzentrationen 10:1 und 1:1 Bakterien pro dendritischer Zelle wurde zweimal, mit LA-2 in drei verschiedenen Konzentrationen viermal, mit LA-5 in drei verschiedenen Konzentrationen sechsmal wiederholt. Die Versuche mit den restlichen fünf UV-inaktivierten Stämmen (BB-12, BB-46, Bf. 420, LC-01 und LR) wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Stimulationszeit der DZ betrug bei allen acht probiotischen Bakterien 24 h. Nach der Normalisierung der durchflusszytometrischen Daten auf LPS wurden UV-inaktivierte Probiotika in drei Gruppen anhand vom Prozentsatz der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR exprimierenden DZ nach Stimulation grob eingeteilt (Abbildung 14, Strichlinien teilen die Gruppen). Zu der ersten Gruppe gehörten LGG, LR, BB-12, LA-5 und LA-2. Unter 100 von diesen Bakterien maturierten DZ vollständig (der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen \geq 100% der LPS-Maturation). Bei der Konzentration 10:1 Bakterien pro DZ in dieser Gruppe betrug der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen $>$ 70%, bei der Konzentration eine Bakterie pro DZ 40 – 80% der LPS-Maturation. Die zweite Gruppe bestand aus einem Stamm: Bf. 420. Unter seiner Wirkung maturierten DZ nur im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 vollständig. Unter Stimulation durch 10 Bakterien pro dendritischer Zelle war der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen $<$ 60% der LPS-Maturation, bei der Konzentration 1:1 blieben DZ unstimuliert (CD83⁺ Zellen $<$ 10%).

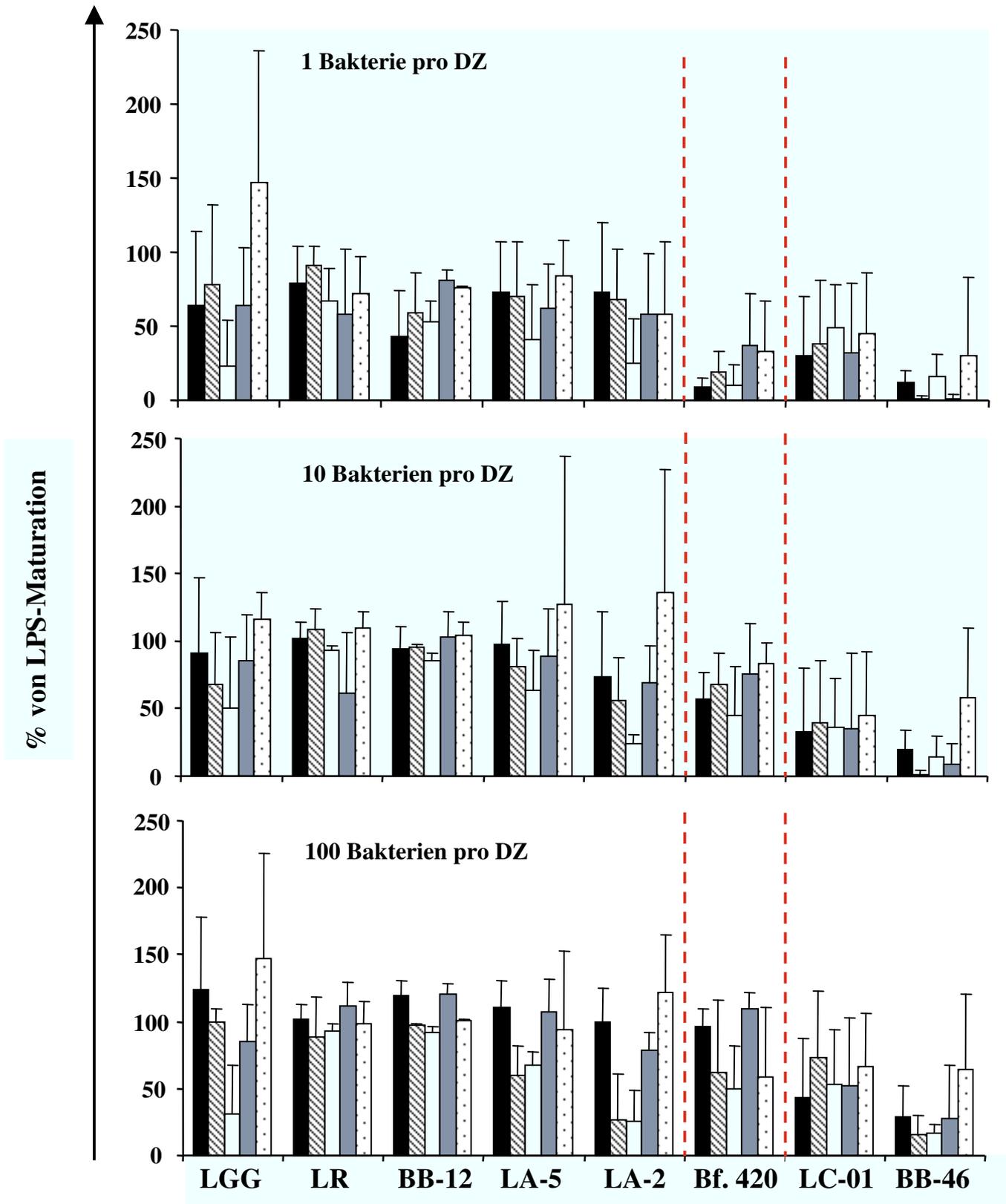


Abbildung 14: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1

CD83
 CD86
 CD80
 CD40
 HLA-DR

Zu der dritten Gruppe gehörten LC-01 und BB-46. Obwohl der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen nach Stimulation mit diesen Stämmen in der Konzentration 1000:1 Bakterien pro DZ 60-80% der LPS-Maturation betrug, zeigte die durch Probiotika im Verhältnis 100:1 stimulierte DZ-Population einen Prozentsatz von CD83⁺ Zellen < 45%. DZ maturierten unter LC-01 und BB-46 in den Konzentrationen 10:1 und 1:1 Bakterien pro DZ nur gering.

4.2.3.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ

Unter Stimulation mit einer Bakterie pro DZ war der höchste Prozentsatz CD83, CD86 und CD80 exprimierender DZ nach Stimulation mit LR, der niedrigste von CD83⁺ und CD80⁺ Zellen unter Bf. 420 zu beobachten (Tabelle 9). Unter BB-46 Stimulation waren CD86⁺ DZ am niedrigsten. Der höchste Prozentsatz von CD40 exprimierenden DZ war unter Stimulation mit BB-12, der niedrigste unter BB-46 zu beobachten. Durch LGG maturierte DZ exprimierten mehr HLA-DR als die Zellen, die mit anderen Probiotika stimuliert wurden. Der niedrigste Prozentsatz HLA-DR⁺ Zellen wurde unter Stimulation mit BB-46 und Bf. 420 festgestellt.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	64,1 ± 50,1	77,9 ± 54,1	23,2 ± 30,6	63,9 ± 39,5	147,1 ± 89
LR	78,8 ± 25,3 ^a	90,9 ± 13,2 ^a	66,8 ± 22 ^a	57,9 ± 44	72,4 ± 24,7
BB-12	42,9 ± 31,4 ^c	58,9 ± 27,3 ^c	52,6 ± 14 ^c	81,4 ± 6,7	76,3 ± 1,1
LA-5	72,7 ± 34,3 ^c	70,4 ± 36,1	41,1 ± 36,5	61,7 ± 29,8	83,7 ± 24,4
LA-2	72,8 ± 47,4 ^{c,e}	67,6 ± 34 ^e	24,9 ± 30,2	57,7 ± 40,9	58,2 ± 48,9
Bf. 420	9,3 ± 6,1 ^{b,d}	19 ± 14,4 ^{b,d,f}	9,6 ± 14,2 ^{b,d,f}	36,9 ± 35,2	33,1 ± 34,2
LC-01	30,2 ± 39,5	38,1 ± 43,4	49,4 ± 28,3 ^e	31,7 ± 47,6	44,7 ± 41,5
BB-46	12,5 ± 7,8 ^{b,f}	1,2 ± 2 ^{b,d,f}	16,3 ± 15 ^{b,d,f}	1,3 ± 2,3	30,5 ± 52,8

Tabelle 9: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede (p≤0,05, MWU).

4.2.3.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ war der höchste Prozentsatz CD83, CD86 und CD80 exprimierender DZ nach Stimulation mit LR, der niedrigste unter BB-46 zu beobachten (Tabelle 10). Der höchste Prozentsatz von CD40 exprimierenden DZ wurde unter Stimulation mit BB-12, der niedrigste unter BB-46 festgestellt. Unter der Wirkung von LA-2 exprimierten DZ am höchsten HLA-DR, unter LC-01 wurde der niedrigste Prozentsatz HLA-DR⁺ Zellen gemessen.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	90,7 ± 56,1	67,6 ± 38,4	50,7 ± 52,6	85,6 ± 33,8	116 ± 19,8
LR	102,1 ± 11,4	108,7 ± 15,6 ^a	93,7 ± 2,7 ^a	61,8 ± 44,5	110,1 ± 11,7
BB-12	94,4 ± 16,3	95,6 ± 1,8 ^c	85,6 ± 5,4 ^{b, c}	103 ± 18,8	104,2 ± 9,5
LA-5	97,1 ± 32,2	81 ± 21 ^e	63,3 ± 29,7 ^e	88,5 ± 35,2	127,7 ± 108,7
LA-2	73,6 ± 48,6	55,8 ± 32 ^e	24,2 ± 6,5 ^{b, d, f}	69,5 ± 27,2	135,6 ± 91,3
Bf. 420	57,6 ± 19	68 ± 22,7 ^{b, d, e}	45,4 ± 35,7 ^{b, d}	76,2 ± 36,7	83,1 ± 15,9
LC-01	32,8 ± 47,4	39,6 ± 45,7 ^{b, d}	36,4 ± 35,7 ^{b, d}	35,6 ± 55,4	45,4 ± 47,2
BB-46	20 ± 14,2	1,4 ± 2,5 ^{b, d, f}	13,8 ± 16 ^{b, d}	8,7 ± 15,1	58,4 ± 51,2

Tabelle 10: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch signifikante Unterschiede zwischen CD86⁺ DZ nach Stimulation mit acht probiotischen Stämmen.

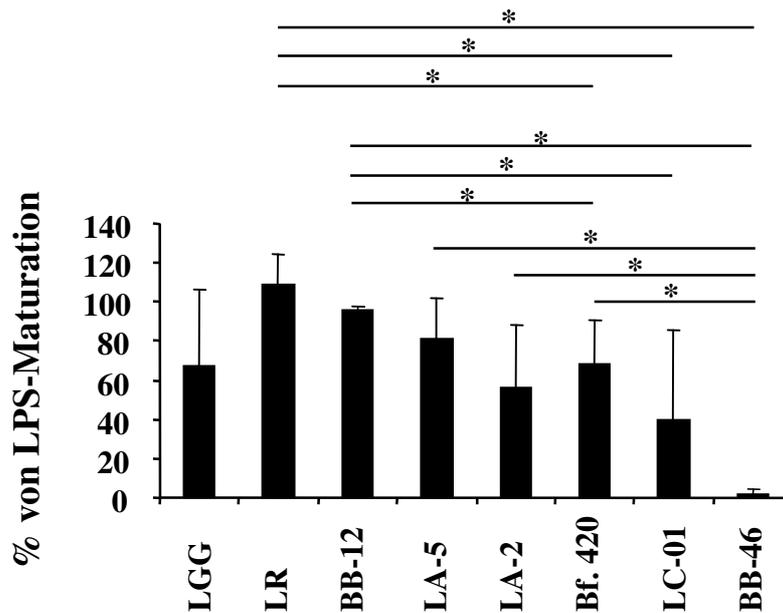


Abbildung 15: CD86 exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (* $p \leq 0,05$, MWU)

4.2.3.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ war der höchste Prozentsatz CD83 und CD86 exprimierender DZ nach Stimulation mit LGG und BB-12, der höchste Prozentsatz CD40 exprimierender DZ unter BB-12, der niedrigste von CD83⁺, CD86⁺, CD80⁺ und CD40⁺ Zellen unter BB-46 zu beobachten (Tabelle 11). Der höchste Anteil von CD80⁺ Zellen wurde unter der Wirkung von LR und BB-12 gemessen. Durch LGG maturierte DZ exprimierten mehr HLA-DR als die Zellen, welche mit anderen Probiotika stimuliert wurden. Der niedrigste Prozentsatz HLA-DR⁺ DZ wurde unter Bf. 420 festgestellt.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	123,4 ± 54,5 ^a	99,2 ± 10,9 ^a	31,4 ± 36,4 ^a	85,3 ± 27,9 ^a	147,4 ± 78,8
LR	102,2 ± 11,2 ^a	88,3 ± 30,4 ^c	92,5 ± 6 ^{b,c}	112 ± 17,7 ^c	98,5 ± 16,2
BB-12	119,5 ± 10,7 ^c	97,8 ± 0,4 ^e	91,7 ± 4,3 ^{b,e}	121,1 ± 7,8 ^b	100,8 ± 0,6
LA-5	110,5 ± 19,5 ^c	60,2 ± 22 ^{b,c,f}	68 ± 10 ^{d,f,g,i}	107,4 ± 24 ^c	94,5 ± 58,2
LA-2	100 ± 25 ^e	26,2 ± 35,1 ^{b,f}	25 ± 24,2 ^{d,f,j}	78,3 ± 14 ^{a,d}	122,1 ± 43,2
Bf. 420	96,3 ± 13,6 ^e	62 ± 53,8 ^f	50,1 ± 31,6 ^{d,f}	109 ± 12,5 ^c	59,1 ± 52
LC-01	43,6 ± 43,5 ^d	72,9 ± 49,7	53,3 ± 40,2 ^g	52,4 ± 50,6 ^a	66,3 ± 39,6
BB-46	29 ± 23,5 ^{b,d,f}	15,8 ± 14 ^{b,d,f}	17 ± 5,9 ^{d,f,h}	28 ± 39,6 ^{a,d}	64,7 ± 56,2

Tabelle 11: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef, gh, ij innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.2.3.4 Stimulation mit 50 und 1000 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 50 Bakterien pro DZ war der Prozentsatz CD83-, CD86- und CD80-positiver DZ nach Stimulation mit BB-12 signifikant höher als unter Bf. 420 (Tabelle 12). Kein bedeutender Unterschied bestand jedoch in der Maturation von DZ nach Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 in den Konzentrationen 100:1 und 50:1. Der Unterschied in der Wirkung von Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 und 50:1 war ebenfalls gering. Deswegen wurden die lebenden Probiotika in der Konzentration 50:1 Bakterien pro DZ nicht getestet.

	BB-12 50:1	Bf. 420 50:1	p-Wert, MWU
CD83	107,7 ± 8,3	85,6 ± 17,2	0,05
CD86	99,7 ± 1,7	79 ± 26,2	0,05
CD80	90,1 ± 6,4	55,8 ± 24,2	0,05
CD40	115,2 ± 6,7	108,3 ± 13,8	0,513
HLA-DR	93,2 ± 24,2	77,3 ± 21,8	0,275

Tabelle 12: Der Vergleich Maturationsmarker exprimierender DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 50:1 (Mittelwert ± Standardabweichung)

Unter Stimulation mit 1000 Bakterien pro DZ war der höchste Prozentsatz CD83, CD86, CD40 und HLA-DR exprimierender DZ nach Stimulation mit LGG zu beobachten (Tabelle 13). Der höchste Anteil von CD80⁺ Zellen wurde unter der Wirkung von LC-01 gemessen. Der niedrigste Prozentsatz CD83⁺, CD86⁺ und HLA-DR⁺ DZ wurde unter BB-46 festgestellt. Nach Stimulation mit LGG war der niedrigste Anteil CD80, unter LC-01 CD40 exprimierender DZ zu beobachten.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	161,6 ± 89,2	98,9 ± 2,1 ^a	39,4 ± 36,4	87,8 ± 15	142,1 ± 67,9
LC-01	76,8 ± 39,5	91,3 ± 11,4 ^a	62,3 ± 40,4	70 ± 42,5	82,4 ± 22,2
BB-46	57,7 ± 43,2	13,2 ± 13,4 ^b	41,9 ± 14,5	76,9 ± 34,7	67,3 ± 36,5

Tabelle 13: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede (p=0,05, MWU).

Die Konzentration 1000:1 Bakterien pro DZ schien für die Situation *in vivo* unphysiologisch hoch zu sein. Deswegen wurden die lebenden Probiotika in dieser Konzentration nicht getestet.

4.2.4 Analyse der Zytokinproduktion

DZ wurden mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 50:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle stimuliert. LGG, LC-01 und BB-46 wurden in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 100:1 und 1000:1 Bakterien pro dendritischer Zelle für Stimulation angesetzt. Alle weiteren Stämme (LA-2, LA-5 und LR) wurden in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 getestet. Die Stimulation der DZ mit UV-inaktivierten LGG in den Konzentrationen 10:1 und 1:1 Bakterien pro dendritischer Zelle wurde zweimal, mit LA-2 in drei verschiedenen Konzentrationen viermal, mit LA-5 in drei verschiedenen Konzentrationen sechsmal wiederholt. Die Versuche mit den restlichen fünf UV-inaktivierten Stämmen (BB-12, BB-46, Bf. 420, LC-01 und LR) wurden jeweils dreimal durchgeführt. In den Zellkulturüberständen aus allen Stimulationsversuchen wurden folgende Zytokine bestimmt: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF- α . Aufgrund der Mangel an den aliquotierten Überständen wurde IL-13 bei den Ansätzen mit folgenden UV-inaktivierten Probiotika nicht gemessen: bei den ersten Versuchen mit LGG in den Konzentrationen 100:1 und 1000:1 Bakterien pro DZ und mit BB-12 und Bf. 420 in den Konzentrationen 1:1, 10:1, 50:1 und 100:1 Bakterien pro DZ. Bei LC-01 und BB-46 in allen vier Konzentrationen wurde IL-13 jeweils einmal bestimmt. Der Nachweis von IL-5 folgte nur in ausgewählten Proben. Da die Mengen von diesem Zytokin sehr niedrig oder nicht messbar waren, wurde auf weitere Bestimmungen verzichtet.

Nach der Normalisierung der durchflusszytometrischen Daten auf LPS wurden UV-inaktivierte Probiotika in drei Gruppen anhand vom Prozentsatz der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR exprimierenden DZ nach Stimulation arbiträr eingeteilt. Die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen (ebenfalls auf LPS normalisiert) waren mit den durchflusszytometrischen Daten nicht kongruent. Die Abbildung 16 zeigt die Reihenfolge der probiotischen Bakterien (je nach Konzentration), welche die Produktion von Zytokinen (vom höchsten zum niedrigsten Prozent der Werte unter LPS-Maturation) durch DZ beeinflussten. Eine hohe Zytokinproduktion wurde unter dem Einfluss von UV-inaktivierten Probiotika in den niedrigen Konzentrationen aus der ersten Gruppe (LR, BB-12, LA-5 und LA-2), aber auch nach Stimulation mit Bf. 420 (zweite Gruppe) und LC-01 (dritte Gruppe) festgestellt. Die Stimulation mit LGG dagegen führte zu einer moderaten Zytokinantwort. Unter BB-46 in allen Konzentrationen produzierten DZ geringe Mengen von Zytokinen, dies stimmte mit dem niedrigsten Prozentsatz der Maturationsmarker überein.

1 Bakterien pro DZ

IL-1 β	LA-2	LR	LA-5	BB-12	LC-01	LGG	Bf. 420	BB-46
IL-6	LR	BB-12	Bf. 420	LA-5	LA-2	LC-01	LGG	BB-46
IL-8	LR	LA-2	LC-01	BB-12	LA-5	Bf. 420	LGG	BB-46
IL-10	LR	LA-2	LC-01	LA-5	BB-12	LGG	BB-46	Bf. 420
IL-12	BB-12	Bf. 420	LA-5	LR	LA-2	LGG	LC-01	BB-46
IL10/IL-12	LC-01	LR	BB-46	LA-5	LA-2	BB-12	LGG	Bf. 420
IL-13	LA-2	LA-5	LR	LGG	BB-12	Bf. 420	LC-01	BB-46
IFN- γ	LR	LA-2	LA-5	BB-12	LC-01	LGG	Bf. 420	BB-46
MIP-1 α	LA-2	LR	BB-12	LA-5	LC-01	LGG	BB-46	Bf. 420
MIP-1 β	LR	LA-5	LA-2	LC-01	BB-12	LGG	BB-46	Bf. 420
TNF- α	LR	LA-2	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	LGG	BB-46

10 Bakterien pro DZ

IL-1 β	LA-5	LA-2	LR	LGG	BB-12	LC-01	Bf. 420	BB-46
IL-6	LR	BB-12	Bf. 420	LA-5	LGG	LA-2	LC-01	BB-46
IL-8	LR	BB-12	LA-2	LA-5	Bf. 420	LGG	LC-01	BB-46
IL-10	Bf. 420	LR	BB-12	LGG	LA-5	LA-2	LC-01	BB-46
IL-12	Bf. 420	BB-12	LA-5	LR	LGG	LA-2	LC-01	BB-46
IL10/IL-12	LR	LGG	LA-2	BB-12	Bf. 420	LA-5	LC-01	BB-46
IL-13	LA-5	LA-2	LR	LGG	BB-12	Bf. 420	LC-01	BB-46
IFN- γ	LR	LA-5	BB-12	LA-2	LGG	Bf. 420	LC-01	BB-46
MIP-1 α	LR	BB-12	LA-2	Bf. 420	LA-5	LC-01	LGG	BB-46
MIP-1 β	LR	LA-5	BB-12	LGG	LA-2	LC-01	Bf. 420	BB-46
TNF- α	BB-12	Bf. 420	LA-5	LR	LA-2	LGG	LC-01	BB-46

100 Bakterien pro DZ

IL-1 β	LA-5	LA-2	BB-12	LR	LC-01	LGG	Bf. 420	BB-46
IL-6	LR	BB-12	LA-5	Bf. 420	LGG	LA-2	BB-46	LC-01
IL-8	BB-12	Bf. 420	LR	LA-2	LA-5	LGG	LC-01	BB-46
IL-10	BB-12	LR	Bf. 420	LGG	LA-5	LC-01	LA-2	BB-46
IL-12	BB-12	Bf. 420	LA-5	LGG	LR	LC-01	LA-2	BB-46
IL10/IL-12	LR	BB-12	LA-2	BB-46	LGG	Bf. 420	LC-01	LA-5
IL-13	LA-5	LR	BB-12	LC-01	LA-2	LGG	Bf. 420	BB-46
IFN- γ	LA-5	BB-12	LR	Bf. 420	LGG	LA-2	LC-01	BB-46
MIP-1 α	BB-12	Bf. 420	LR	LA-2	LA-5	LGG	LC-01	BB-46
MIP-1 β	BB-12	LA-5	LR	Bf. 420	LC-01	LA-2	LGG	BB-46
TNF- α	BB-12	Bf. 420	LA-5	LR	LA-2	LGG	LC-01	BB-46

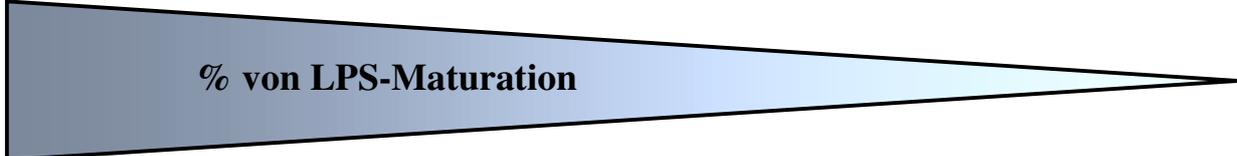


Abbildung 16: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1. Mit Kursivschrift sind die Stämme gekennzeichnet, die sich in ihrer Wirkung nicht unterscheiden.

4.2.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ

Unter Stimulation mit einer Bakterie pro DZ war die höchste IL-6, IL-10, MIP-1 β und TNF- α Sekretion unter LR, die niedrigste IL-6 und TNF- α Produktion unter BB-46, IL-10 und MIP-1 β unter Bf. 420 zu beobachten (Tabelle 14). Die IL-12 Produktion war unter der Wirkung von BB-12 am höchsten und unter BB-46 am niedrigsten. Das IL-10/IL-12 Verhältnis war unter LC-01 am höchsten, unter Bf. 420 am niedrigsten. Nach Stimulation mit LA-2 wurden die höchsten Werte von IL-1 β , IL-13 und MIP-1 α , unter der Wirkung von LR die größten Mengen von IL-8 und IFN- γ bestimmt. Die niedrigste IL-1 β , IL-8, IL-13 und IFN- γ Produktion wurde unter BB-46 festgestellt. MIP-1 α wurde am wenigsten unter Bf. 420 von DZ sezerniert.

	LGG	LR	BB-12	LA-5	LA-2	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	10,3 \pm 6,6	132,1 \pm 112,8	31 \pm 25,6	74,1 \pm 55,9	239,1 \pm 300,6	5,6 \pm 9	26,7 \pm 40,7	4,1 \pm 7
IL-6	0,5 \pm 0,2	18,6 \pm 16,7 ^a	16,3 \pm 27,1 ^c	6,5 \pm 5,9 ^c	4,4 \pm 5,2 ^c	9,5 \pm 16,4	1,1 \pm 1,8 ^b	0,1 \pm 0,1 ^{b, d}
IL-8	5 \pm 3,4	54,5 \pm 9,1	12,8 \pm 14,8	9,8 \pm 8,6	35,4 \pm 36,9	6,2 \pm 10,8	13 \pm 22,5	3 \pm 4,9
IL-10	0,4 \pm 0,6	11,6 \pm 12 ^a	0,9 \pm 1,2 ^b	3,8 \pm 5,1 ^c	5,2 \pm 5,8	0 ^{b, d}	4,5 \pm 7,8	0,01 \pm 0,02 ^b
IL-12	76,2 \pm 35,7	128,8 \pm 193,2 ^a	600,8 \pm 991,1 ^c	162,6 \pm 164 ^{a, e}	80,9 \pm 81,6 ^a	264,2 \pm 456,7	3,9 \pm 6,6 ^{d, f}	0,17 \pm 0,17 ^{b, d}
IL-10/IL-12	0,01 \pm 0,01	0,34 \pm 0,4	0,03 \pm 0,03	0,04 \pm 0,04	0,04 \pm 0,03	0	0,39 \pm 0,68	0,06 \pm 0,11
IL-13	0	29,2 \pm 50,5	0	47,9 \pm 83,2	79,3 \pm 63,3	0	0	0
IFN-γ	11,9 \pm 12,1	41,1 \pm 29,4	32 \pm 12,9	34,2 \pm 28,4	38,3 \pm 35,4	5,1 \pm 6,9	20,3 \pm 31,4	2 \pm 3,4
MIP-1α	35,9 \pm 48,7	149,7 \pm 207,2	137,1 \pm 125	78,7 \pm 79,2	9609 \pm 19149	7,8 \pm 9,2	53,6 \pm 86	9,4 \pm 15,9
MIP-1β	6,7 \pm 0,1	38 \pm 36,7 ^a	10,1 \pm 8,2 ^a	34,9 \pm 28 ^{a, c}	26,4 \pm 28,2 ^a	0,7 \pm 0,7 ^b	13,7 \pm 23,2	2,8 \pm 3,5 ^d
TNF-α	0,6 \pm 0,2	25,2 \pm 31,1 ^a	17,8 \pm 28,9 ^c	14 \pm 15,9 ^c	24,1 \pm 35,2 ^c	7,5 \pm 12,9	0,8 \pm 1,5 ^b	0,03 \pm 0,05 ^{b, d}

Tabelle 14: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede (p≤0,05, MWU).

4.2.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ waren die IL-6, IL-8, das IL-10/IL-12 Verhältnis, IFN-γ, MIP-1α und MIP-1β Sekretion unter LR am höchsten und unter BB-46 am niedrigsten (Tabelle 15). Die höchste Produktion von IL-1β und IL-13 war unter Stimulation mit LA-5, die niedrigste unter BB-46 zu beobachten. Durch BB-12 stimulierte DZ sezernierten TNF-α am höchsten, unter BB-46 am niedrigsten. IL-10 und IL-12 wurden in größten Mengen nach Stimulation mit Bf. 420, in geringsten unter BB-46 von DZ produziert.

	LGG	LR	BB-12	LA-5	LA-2	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	265,9 ± 358,6	402,4 ± 308,3 ^a	192,6 ± 216,1 ^a	1606 ± 1656,2 ^a	997,5 ± 1050,5 ^a	47,3 ± 54,8 ^a	63 ± 107,1	1,1 ± 1,7 ^b
IL-6	52,2 ± 67,6	123,2 ± 67,9 ^{a,c}	95,5 ± 158 ^{a,e}	58,7 ± 40,9 ^{a,e}	12,3 ± 11,4 ^{a,d}	93,1 ± 160,4 ^a	0,7 ± 0,8 ^{d,f}	0,04 ± 0,06 ^b
IL-8	61,2 ± 65,3	584,3 ± 758,5 ^a	118,8 ± 151,7 ^c	69,4 ± 95,8	88,3 ± 106,8	66,9 ± 115,3	4,9 ± 8 ^b	2,3 ± 3,9 ^{b,d}
IL-10	27,1 ± 36,4	169,1 ± 112,3 ^a	132,3 ± 200,6 ^c	19,9 ± 19,8 ^{b,e}	7,8 ± 6,7 ^{b,e}	223,9 ± 386,6 ^e	2,1 ± 3,5 ^{b,d}	0 ^{b,d,f}
IL-12	214,7 ± 63,5	266 ± 299,5	5712 ± 9444 ^a	1331 ± 1310 ^{a,c}	80,6 ± 50,8 ^a	6850 ± 11809 ^a	37,4 ± 61,6 ^d	0,02 ± 0,04 ^b
IL-10/IL-12	0,11 ± 0,14	1,1 ± 0,76 ^a	0,07 ± 0,05 ^{b,c}	0,02 ± 0,02 ^{b,c}	0,08 ± 0,06 ^{b,c}	0,04 ± 0,03 ^{b,c}	0,02 ± 0,03 ^b	0 ^{b,d}
IL-13	38,3 ± 54,2	133,8 ± 136,5	27,8 ± 33,5	316,9 ± 278	138,3 ± 164,5	0	0	0
IFN-γ	55,9 ± 60,5	118,2 ± 1,3 ^a	88,5 ± 39,9 ^c	93,1 ± 54,6 ^{c,e}	68,9 ± 43,6 ^b	54,8 ± 67 ^c	22,3 ± 33,9 ^{b,f}	3,3 ± 4 ^{b,d}
MIP-1α	17,7 ± 20,8	752 ± 1198 ^a	173 ± 121,3 ^a	77,6 ± 60,5	155,5 ± 192,9 ^a	83,2 ± 72,7	33,8 ± 56,2	7,5 ± 12,4 ^b
MIP-1β	48,5 ± 51,1	78 ± 27,9 ^{a,c}	59,3 ± 17,1 ^{a,c}	73,9 ± 68,9 ^a	33,7 ± 24,2 ^a	14,1 ± 20,6 ^d	16,1 ± 26,9	2,3 ± 3,9 ^b
TNF-α	28,6 ± 35,1	115,5 ± 106 ^{a,e}	327,2 ± 511,1 ^a	147 ± 122 ^{a,e}	102,8 ± 103,7 ^a	181,5 ± 311,3 ^a	4,1 ± 6,9 ^f	0,07 ± 0,08 ^b

Tabelle 15: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede (p≤0,05, MWU).

4.2.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ war die IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 α und TNF- α Sekretion unter BB-12 am höchsten und unter BB-46 am niedrigsten (Tabelle 16). Unter Stimulation mit LA-5 wurden die höchsten Werte von IL-1 β , IL-13 und IFN- γ , unter der Wirkung von LR die größten Mengen von IL-6 und das Verhältnis IL-10/IL-12 festgestellt. MIP-1 β wurde am höchsten unter BB-12 und LA-5, am niedrigsten unter BB-46 produziert. Die niedrigste IL-1 β , IL-13 und IFN- γ Sekretion wurde unter BB-46 festgestellt, die geringsten Mengen von IL-6 unter LC-01 und das niedrigste IL-10/IL-12 Verhältnis unter LA-5.

	LGG	LR	BB-12	LA-5	LA-2	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	175,4 \pm 142 ^{a,c}	808,3 \pm 462,9 ^c	811,9 \pm 1055 ^{c,e}	9219 \pm 11296 ^{b,c}	1007 \pm 1150,4	109,9 \pm 3,6 ^{a,c,f}	222,6 \pm 362,9	23,7 \pm 20,5 ^d
IL-6	15,9 \pm 13,7 ^{a,c}	209,3 \pm 68 ^b	181,2 \pm 175 ^{d,e}	147,8 \pm 104 ^{d,e}	14,6 \pm 12,6 ^{a,f}	66,6 \pm 102,1	1,2 \pm 0,9 ^{a,d,f}	2,5 \pm 3,1 ^{a,f}
IL-8	77,3 \pm 61,5	125,8 \pm 104,9 ^a	223,1 \pm 195 ^{a,c}	123,5 \pm 89,9	123,4 \pm 142,2	168 \pm 235,6 ^a	18,8 \pm 30,7 ^d	6,9 \pm 9,6 ^b
IL-10	56,4 \pm 78,4 ^a	325,1 \pm 197 ^{a,c}	406,1 \pm 476 ^{a,e}	43,5 \pm 40,4 ^{a,d}	7,3 \pm 4,2 ^{a,d,f}	197,4 \pm 318,4 ^a	9,8 \pm 16,6 ^{d,f}	0,7 \pm 0,7 ^b
IL-12	390,8 \pm 257,7 ^a	286,6 \pm 212 ^{c,g}	6875,2 \pm 10738	2420 \pm 1519 ^{d,g}	64,5 \pm 36 ^{b,c,e}	2777 \pm 4391 ^{f,g}	251 \pm 417,7 ^c	29,8 \pm 48,8 ^{b,h}
IL-10/IL-12	0,11 \pm 0,1 ^{a,c}	1,6 \pm 1,5 ^b	0,48 \pm 0,66 ^e	0,02 \pm 0,01 ^{a,d,f}	0,14 \pm 0,09 ^{a,e}	0,08 \pm 0,06 ^{a,c}	0,03 \pm 0,02 ^{a,f}	0,12 \pm 0,2 ^a
IL-13	30 \pm 42,4	336 \pm 121,6	179,2 \pm 53,7	680,9 \pm 750,8	101,3 \pm 185,3	1,9 \pm 2,7	106,3	0
IFN-γ	78 \pm 30,9 ^{a,c}	125,7 \pm 20,5 ^b	135,8 \pm 45,6 ^e	192,7 \pm 97,8 ^{c,g}	69,3 \pm 33,3 ^{a,f}	93,2 \pm 41,4 ^c	36,1 \pm 49 ^{a,f,h}	22,6 \pm 22 ^{a,d,f}
MIP-1α	48,8 \pm 46,3	90,4 \pm 21,5 ^a	3804 \pm 6396 ^c	62,3 \pm 45,8	83 \pm 33,9	125 \pm 22,5	41,7 \pm 36,1 ^{b,d}	23,6 \pm 36,3 ^{b,d}
MIP-1β	30,1 \pm 13 ^a	67,3 \pm 24,8 ^c	102,4 \pm 28 ^{b,e}	100 \pm 34,7 ^{b,e}	30,5 \pm 8,9 ^{d,f}	60,6 \pm 35,5 ^g	33,5 \pm 51,3	9,4 \pm 11 ^{b,d,f,h}
TNF-α	72,9 \pm 85,7 ^a	297,9 \pm 51,6 ^{c,g}	1603 \pm 2464 ^e	317,5 \pm 185 ^{b,c}	105,2 \pm 69,2 ^{e,h}	335 \pm 483,5 ^e	17,9 \pm 30 ^d	1,1 \pm 1,2 ^{b,d,f}

Tabelle 16: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef, gh innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.2.4.4 Stimulation mit 50 und 1000 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 50 Bakterien pro DZ waren die Produktion von allen gemessenen Zytokinen und das IL-10/IL-12 Verhältnis nach Stimulation mit BB-12 höher als unter Bf. 420, ein signifikanter Unterschied bestand nur in der Sekretion von IL-1 β (Tabelle 17). Unter Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 in der Konzentration 100:1 produzierten DZ mehr IL-1 β , IL-10, IL-13 und TNF- α und weniger IL-12 als unter BB-12 in der Konzentration 50:1. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war höher unter BB-12 in der Konzentration 100:1 Bakterien pro DZ. Der Unterschied in der Sekretion von den restlichen Zytokinen war gering. Die Produktion von IL-12 und IL-13 war unter Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 niedriger als in der Konzentration 50:1, das Verhältnis IL-10/IL-12 dagegen höher. Der Unterschied in der Sekretion der restlichen Zytokine war sehr gering.

	BB-12 50:1	Bf. 420 50:1	p-Wert, MWU
IL-1β	552,8 \pm 733	82,3 \pm 29	0,05
IL-6	159,7 \pm 192	80,5 \pm 129,9	0,513
IL-8	229,7 \pm 255,3	140,7 \pm 210	0,275
IL-10	332,6 \pm 463,6	210,5 \pm 350,2	0,275
IL-12	7582,8 \pm 12309,1	4831,8 \pm 8019,6	0,827
IL-10/IL-12	0,27 \pm 0,34	0,05 \pm 0,04	0,275
IL-13	104,8 \pm 46,2	50 \pm 70,7	0,439
IFN-γ	117,8 \pm 49,8	78,3 \pm 43,4	0,275
MIP-1α	3817,9 \pm 6383,6	94,7 \pm 22,3	0,275
MIP-1β	87,4 \pm 54,1	42,6 \pm 25,9	0,275
TNF-α	751,5 \pm 1155,2	295,2 \pm 478,2	0,827

Tabelle 17: Der Vergleich der Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 50:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Unter Stimulation mit 1000 Bakterien pro DZ waren die IL-8, IFN- γ , MIP-1 α , TNF- α Sekretion und das Verhältnis IL-10/IL-12 unter LGG am höchsten, IL-8, TNF- α und IL-10/IL-12 unter LC-01, IFN- γ und MIP-1 α unter BB-46 am niedrigsten (Tabelle 18). Unter Stimulation mit LC-01 wurden die höchsten Werte von IL-1 β , IL-12, IL-13 und MIP-1 β , unter der Wirkung von BB-46 die niedrigsten Mengen von IL-1 β , IL-13 und MIP-1 β

festgestellt. Die niedrigste IL-12 Sekretion wurde unter LGG beobachtet. IL-10 war unter BB-46 am geringsten, unter LGG und LC-01 produzierten DZ die gleichen Mengen von diesem Zytokin.

	LGG	LC-01	BB-46
IL-1β	245,9 \pm 117,7	1663,5 \pm 2764,7	59,9 \pm 54,5
IL-6	19,3 \pm 13,9	37,5 \pm 54,1	42,9 \pm 54,4
IL-8	129,6 \pm 78,7	48,7 \pm 62,9	65,7 \pm 77,4
IL-10	41,7 \pm 43,7	41,7 \pm 54,1	24 \pm 24,5
IL-12	145,9 \pm 78,6	435,8 \pm 673	257,5 \pm 400,1
IL-10/IL-12	0,30 \pm 0,23	0,25 \pm 0,24	0,28 \pm 0,34
IL-13	3,3 \pm 4,7	134,4	0
IFN-γ	86,5 \pm 15,2	70,2 \pm 57	53,2 \pm 48,5
MIP-1α	56,9 \pm 43,5	49,6 \pm 42,6	30,8 \pm 46,9
MIP-1β	31,2 \pm 4,5	48,1 \pm 51,1	28 \pm 29
TNF-α	121,3 \pm 87,8 ^a	18,7 \pm 19,7 ^b	40,8 \pm 55,1

Tabelle 18: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Das Superscript-Paar ab innerhalb einer Zeile zeigt einen signifikanten Unterschied (p=0,05, MWU).

Ein signifikanter Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen LGG, LC-01 und BB-46 in der Konzentration 1000:1 Bakterien pro dendritischer Zelle bestand nur in der TNF- α Sekretion (Abbildung 17).

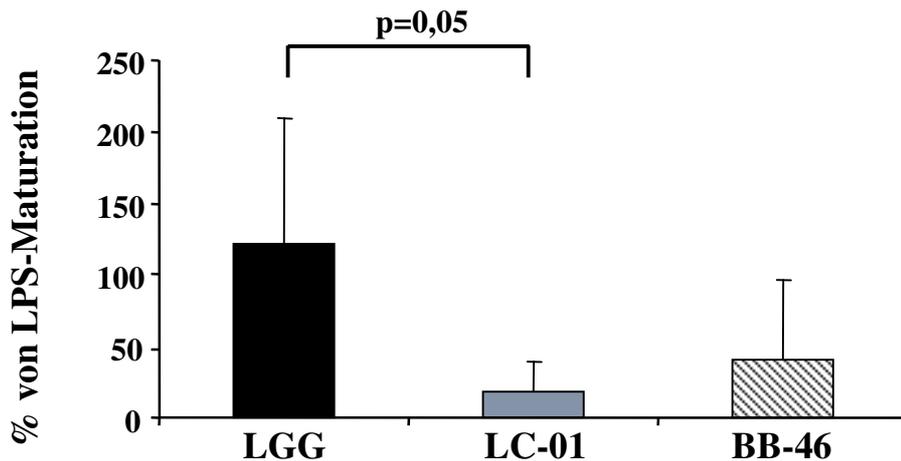


Abbildung 17: Die TNF- α Produktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1 ($p=0,05$, MWU)

4.2.5 Dosisabhängige Effekte der UV-inaktivierten Probiotika

Bei der Untersuchung der Wirkung von UV-inaktivierten, später auch lebenden Probiotika auf den Phänotyp und Funktionen der DZ stellte es sich heraus, dass viele Effekte der bakteriellen Stämmen dosisabhängig waren. Dabei handelte es sich in der Regel um die Verstärkung der Stimulation, wie z. B. höherer Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ und erhöhte Sekretion von Zytokinen unter der Steigerung der Probiotikadosis (Daten werden nicht gezeigt). Bei den einzelnen Probiotika bestand jedoch bei den Konzentrationen 100:1 und 1000:1 Bakterien pro DZ eine Herunterregulation der Oberflächenmarker und eine geringere Zytokinproduktion im Vergleich zu den niedrigeren Probiotikadosierungen. Um diese Effekte analysieren zu können, wurden statistische Berechnungen mit dem Friedman-Test für mehrere verbundene Proben durchgeführt. Dabei wurde für jeden Parameter innerhalb eines probiotischen Stammes ein p-Wert ermittelt. Signifikante Werte für UV-inaktivierte Bakterien ($p \leq 0,05$) sind in der Tabelle 19 aufgelistet. Um feststellen zu können, wo die ermittelten Unterschiede liegen, wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Dieser Test benötigt jedoch einen Stichprobenumfang von mindestens sechs pro Gruppe, um einen p-Wert $\leq 0,05$ annehmen zu dürfen. Diese Bedingung traf nur für UV-inaktivierte LA-5. Bei den restlichen UV-inaktivierten und lebenden Probiotika führte der Wilcoxon-Test zu nicht-signifikanten Ergebnissen, dies war auf einen Stichprobenumfang von weniger als sechs zurückzuführen.

	LR	BB-12	LA-5	LA-2	Bf. 420	LC-01	BB-46
CD83		0,029			0,029		
CD86		0,042					
CD80							
CD40		0,029	0,030		0,042	0,039	0,032
HLA-DR	0,05						
IL-1β	0,05	0,029	0,002	0,039		0,039	
IL-6		0,032	0,003				0,032
IL-8		0,042	0,016	0,018	0,029	0,042	0,044
IL-10		0,029	0,006			0,045	0,045
IL-12			0,002			0,029	0,032
IL-13							
IFN-γ		0,029	0,002		0,042	0,032	0,044
MIP-1α							
MIP-1β			0,006		0,029	0,029	
TNF-α	0,05	0,029	0,006	0,039	0,029	0,042	0,044

Tabelle 19: Signifikante dosisabhängige Stimulationseffekte innerhalb eines UV-inaktivierten Probiotikastammes ($p \leq 0,05$, Friedman-Test)

Der durchgeführte Wilcoxon-Test ergab mit den Daten aus den Stimulationsversuchen mit LA-5 folgende Befunde: der Prozentsatz CD40 exprimierender DZ war signifikant erhöht nach Stimulation in der Konzentration 100:1 Bakterien pro DZ im Vergleich zu 1:1 (Abbildung 18). Die Sekretion von IL-1 β und IL-6 war signifikant höher unter Stimulation mit LA-5 in der Konzentration 100:1 im Vergleich zu 10:1 ($p=0,028$ bzw. $0,042$), 10:1 zu 1:1 ($p=0,028$) und 100:1 im Vergleich zu 1:1 ($p=0,028$). Die höhere IL-8 Produktion unter 100 LA-5 pro DZ war im Vergleich zu der Dosierung 1:1 signifikant ($p=0,028$). Durch LA-5 in der Konzentration 100:1 stimulierte DZ sezernierten signifikant mehr IL-10, IL-12, IFN- γ ($p=0,028$) und TNF- α ($p=0,046$) als unter LA-5 im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1. Es bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen 10:1 und 1:1, 100:1 und 1:1 in der Produktion von diesen Zytokinen. Die MIP-1 β Sekretion war unter LA-5 in der Konzentration 1:1 signifikant niedriger als im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 und 100:1 ($p=0,028$).

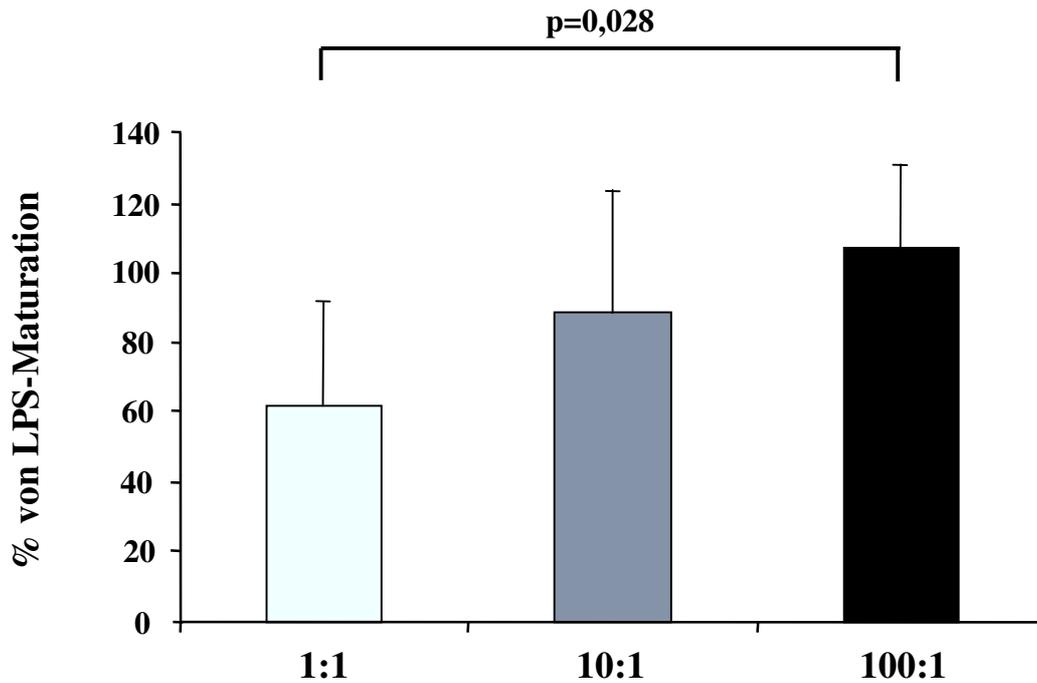


Abbildung 18: Dosisabhängig CD40 exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten LA-5 (p=0,028, Wilcoxon-Test)

4.2.6 Korrelationsanalyse und Clustering

Dr. P. Pagel (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, Technische Universität München und Institut für Bioinformatik und Systembiologie/MIPS, Helmholtz Zentrum München) überreichte uns freundlicherweise die Ergebnisse der Korrelationsanalysen in Bildform. Die Berechnungen wurden auf drei Konzentrationen (1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro DZ) beschränkt. IL-13 und das Verhältnis IL-10/IL-12 wurden nicht analysiert. Die Abbildung 19 zeigt exemplarisch je eine Korrelationsmatrix für die gemessenen Parameter und die UV-inaktivierten probiotischen Stämme in der Konzentration 10:1 Bakterien pro DZ und eine Farbmatrix der skalierten Werte mit dem hierarchischen Clustering der beiden Dimensionen (Stämme und Parameter).

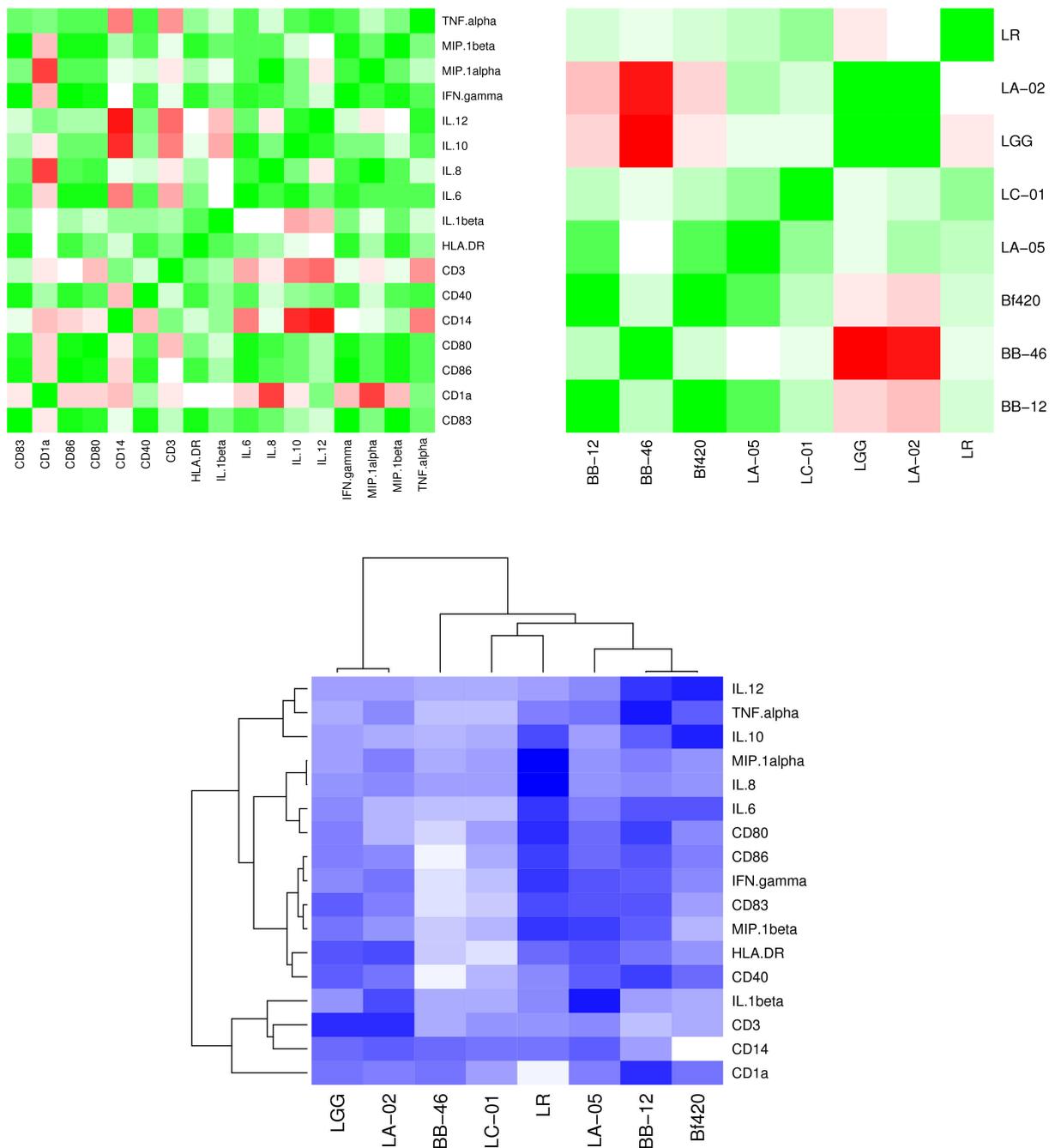


Abbildung 19: Korrelationsmatrix (Stämme und Parameter) und hierarchisches Clustering der UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1

Bei den Oberflächenmarkern CD1a, CD14 und CD3 könnte es sich um die Nonsens-Korrelationen bei allen Konzentrationen (Ergebnisse der Analysen 1:1 und 100:1 Dosierungen werden nicht gezeigt) handeln. Wir beobachteten, dass der Prozentsatz CD1a exprimierender DZ probandenvariabel und maturationsunabhängig war. Eine negative

Korrelation mit z. B. IL-8 im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 und 100:1 wäre in diesem Fall ohne Bedeutung. Der Prozentsatz CD14 exprimierender DZ war sehr gering oder nicht vorhanden, es handelte sich dabei um einen geringen Anteil von in Makrophagen differenzierten Monozyten. Der bei der Durchflusszytometrie festgestellte Prozentsatz CD3 exprimierender DZ ist durch eventuelle DZ-T-Zellkonglomerate zu erklären. Somit wäre eher eine positive statt eine negative Korrelation mit IL-12 festzustellen.

Korrelationsmatrix

Unter Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika in der Konzentration 10:1 bestand eine positive Korrelation zwischen allen Maturationsmarkern CD83, CD86, CD80, CD40 und HLA-DR. Diese Korrelation bestand auch bei den Dosierungen 1:1 und 100:1 Bakterien pro DZ in abgeschwächter Form. Inflammatorische Zytokine IL-6 und TNF- α , Chemokine IL-8, MIP-1 α und MIP-1 β , Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ korrelierten positiv untereinanderer unter der Dosierung 10:1 (Ausnahme: keine Korrelation zwischen IL-12 und MIP-1 β). Weiter bestand eine schwache positive Korrelation zwischen inflammatorischen Zytokinen und IL-10. Es zeigte sich eine schwache positive Korrelation zwischen IL-1 β und IFN- γ /MIP-1 β , diese Korrelation war stärker nach Stimulation mit Probiotika in den Konzentrationen 1:1 und 100:1 Bakterien pro DZ. Es bestand eine negative Korrelation zwischen IL-10 und IL-12 unter der Konzentration 1:1. IL-10 korrelierte positiv mit IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF- α unter Stimulation mit UV-inaktivierten Bakterien in der Konzentration 100:1. Zwischen den Maturationsmarkern und den Zytokinen IL-6, IFN- γ , MIP-1 β und TNF- α bestand eine positive Korrelation im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1, schwächer in den Konzentrationen 1:1 und 100:1 Bakterien pro DZ.

Bei den UV-inaktivierten probiotischen Stämmen in der Konzentration 10:1 bestand eine positive Korrelation zwischen BB-12, Bf. 420, LA-5 und eine negative Korrelation zwischen BB-46 und LGG, BB-46 und LA-2. LGG korrelierte positiv mit LA-2, LR zeigte eine schwache negative Korrelation mit LGG und eine schwache positive Korrelation mit den restlichen fünf Stämmen.

Bei den UV-inaktivierten probiotischen Stämmen in der Konzentration 1:1 bestand eine positive Korrelation zwischen BB-12, BB-46, Bf. 420 und LC-01. LGG zeigte eine schwache negative Korrelation mit BB-12, BB-46, Bf. 420, LC-01 und LR und eine positive mit LA-5. LR korrelierte positiv mit LA-5 und schwach positiv mit den anderen Stämmen außer LGG.

Bei den UV-inaktivierten probiotischen Stämmen in der Dosierung 100:1 Bakterien pro DZ bestand eine positive Korrelation zwischen BB-12 und Bf. 420, BB-12 und BB-46, BB-12 und LC-01, BB-46 und LC-01, Bf. 420 und LR, LGG und LA-2. Negativ korrelierten LGG

und BB-46, LA-2 und BB-46, LGG und LC-01, LA-2 und LC-01. Es bestand keine Korrelation zwischen Bf. 420 und BB-46, LA-2 und LR.

Hierarchisches Clustering

Verschiedene Blautöne dieser Farbmatrix geben die Werte aus den bereits beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen und Zytokinmessungen wieder. Dabei war z. B. der Prozentsatz HLA-DR exprimierender DZ nach Stimulation mit LA-2 bei 10:1 Bakterien pro DZ am höchsten. Dies wird durch eine dunkelblaue Zeile präsentiert. Bei dem Clustering bildeten UV-inaktivierte Probiotika in der Konzentration 10:1 folgende Gruppen: LGG und LA-2, LR und LC-01, Bf. 420 und BB-12. Die gemessenen Parameter wurden in folgende Gruppen eingeteilt: CD14/CD3 mit CD1a und IL-1 β , CD40/HLA-DR, CD83/MIP-1 β , CD86/IFN- γ , CD80/IL-6, MIP-1 α /IL-8, IL-12/TNF- α mit IL-10.

Bei dem Clustering bildeten UV-inaktivierte Probiotika in der Konzentration 1:1 folgende Gruppen: BB-46/LC-01 und Bf. 420/BB-12, LA-5/LR mit LA-2 und LGG. Oberflächenmarker und Zytokine wurden in mehrere Gruppen eingeteilt: IL-6/IL-12, IL-8/TNF- α , IFN- γ /MIP-1 β , CD80, CD40/HLA-DR, CD83/CD86, IL-10/CD14 mit CD3, MIP-1 α /IL-1 β mit CD1a. CD80, IL-8/TNF- α , IFN- γ /MIP-1 β bildeten zusammen mit CD40/HLA-DR, CD83/CD86 eine weitere Gruppe. IL-10/CD14 mit CD3, MIP-1 α /IL-1 β mit CD1a wurden zusammengefügt.

Hierarchisches Clustering in der Konzentration 100:1 zeigte folgende Bakterienkombinationen: LA-2 und LGG, BB-46 und LC-01 mit BB-12, Bf. 420 und LR mit LA-5. Die ermittelten Parameter wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt: IFN- γ /MIP-1 β , CD83/CD40, CD80/IL-6 mit IL-10 und CD86, CD3/HLA-DR mit CD14, MIP-1 α /TNF- α mit IL-12 und CD1a, IL-1 β .

4.3 Stimulation durch lebende Probiotika

4.3.1 Auszählung der lebenden probiotischen Bakterien

Während der Etablierung von Versuchen mit lebenden Bakterien stellte Frau T. Binder fest, dass zwei probiotische Stämme nach der Vitalfärbung einen sehr hohen Prozentsatz toter Bakterien aufwiesen. Es handelte sich dabei um LA-2 ($73,3 \pm 11,3\%$, $n=6$) und LR ($64,7 \pm 4,5\%$, $n=3$). Die Wiederholung der Färbung in unserem Labor mit frischen Reagenzien durch Frau Bernatowicz ergab einen niedrigeren Prozentsatz toter Bakterien (LA-2 $3,8 \pm 1\%$, $n=3$, bzw. LR $13,0 \pm 6,5\%$, $n=3$). Fa. Chr. Hansen konnte sich zum hohen Prozentsatz von toten LA-2 nicht äußern, Fa. BioGaia war es dagegen bekannt, dass mindestens 10% von lyophilisierten LR (z. B. in der Folgemilch für Säuglinge von Fa. HIPPI) nach der 30-tägigen Lagerung nicht mehr lebensfähig waren (persönliche Information). Zusätzlich wurde es bei den wiederholten DAPI-Färbungen UV-inaktivierter LA-2 festgestellt, dass Bakterien ihre morphologische Form änderten. Dies hing vermutlich von den bereits geringen Schwankungen in den Inkubationsbedingungen ab. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse daraufhin, dass LA-2 und LR möglicherweise instabile und empfindliche Stämme sind. Deswegen wurden diese Probiotika aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Tabelle 20 zeigt den Anteil toter Bakterien in Prozent von der Gesamtbakterienzahl, welcher mit Hilfe von Vitalfärbung mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit ermittelt wurde.

Stamm	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
LGG	3	1,3	0,4	1,7	0,8
LA-5	2	1,9	0,3	3,5	2,3
LC-01	3	0,3	0,2	0,5	0,2
BB-12	4	1,4	0,7	2,2	0,6
Bf. 420	3	1,7	0,2	4,2	2,2
BB-46	3	2,1	0,8	3,9	1,6

Tabelle 20: Anzahl toter Probiotika (in % der Gesamtbakterienzahl) in den für die Stimulationsversuche verwendeten Bakteriensuspensionen

4.3.2 Charakterisierung der Zellpopulationen

Aus $93,6 \pm 17$ ml peripherem Blut ($n=7$) wurden $6,2 \pm 2 \times 10^7$ PBMZ isoliert und anschließend $4,6 \pm 3,8 \times 10^6$ immature DZ generiert (Ausbeute $8,6 \pm 9,8\%$). Pro Well einer 12-Well Platte wurden $3,7 \pm 3,4 \times 10^5$ immature DZ ausgesät und 24 h mit lebenden probiotischen Bakterien stimuliert. Die Mischpopulation im LPS-Well bestand aus $50 \pm 11,7\%$ DZ und $22,6 \pm 9\%$ kontaminierender Lymphozyten. Tabelle 21 zeigt den Anteil maturer CD83⁺ und CD1a⁺ DZ, CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ Zellen in Prozent von allen analysierten Zellen aus dem LPS-Well der 12-Well Platte 24 h nach Stimulation.

Marker	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
CD83	7	43,5	18,5	56,6	12,5
CD1a	7	21,1	7,8	41,3	11,7
CD3	7	8,8	1,2	16,2	5,8
CD14	7	1,6	0,1	4,1	1,6

Tabelle 21: Zellsubpopulationen (in % der LPS-stimulierten Zellen) in den Versuchen mit lebenden Probiotika

4.3.3 Maturationsmarker an der Oberfläche von DZ

DZ wurden mit lebenden LGG, BB-12, LA-5, Bf. 420, LC-01 und BB-46 in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle stimuliert. Die Ansätze mit BB-12 wurden viermal, mit den restlichen fünf Probiotika jeweils dreimal durchgeführt. Die Stimulationszeit der DZ betrug bei allen sechs probiotischen Bakterien 24 h.

Analog zu den UV-inaktivierten Probiotika wurden lebende Bakterien in Gruppen anhand vom Prozentsatz der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR exprimierenden DZ nach Stimulation arbiträr eingeteilt (Abbildung 20, Strichlinien teilen die Gruppen). Zu der ersten Gruppe gehörten wie bei der UV-Inaktivierung BB-12 und LA-5. Lebende Bf. 420 und LC-01 wurden auch der ersten Gruppe zugeordnet. Unter 100 von diesen Bakterien maturierten DZ vollständig (der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen $\geq 100\%$ der LPS-Maturation). Bei der Konzentration 10:1 Bakterien pro DZ betrug der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen $> 75\%$ in dieser Gruppe, bei der Konzentration eine Bakterie pro DZ $\geq 60\%$ der LPS-Maturation. Unter LGG im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 waren 98% DZ CD83-positiv. Dagegen betrug der Prozentsatz CD83 exprimierender DZ bei der Konzentration 100:1 nur 63% der Werte unter LPS-Maturation. Der Anteil CD40⁺ und HLA-DR⁺ Zellen lag

über 90% nach Stimulation mit LGG in allen Konzentrationen. Der Prozentsatz CD86 exprimierender DZ blieb unverändert, der Anteil von CD80⁺ Zellen war bei der Konzentration 1:1 niedriger als bei 100 Bakterien pro DZ. Da unter dem Einfluss von LGG im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 eine Maturation von DZ festgestellt wurde, gehörte LGG auch zu der ersten Probiotikagruppe. Die zweite Gruppe bestand aus einem Stamm: BB-46. Unter seiner Wirkung maturierten DZ nur in der Konzentration 100:1. Nach Stimulation mit 10 Bakterien pro dendritischer Zelle war der Prozentsatz von CD83⁺ Zellen < 60% der LPS-Maturation, bei der Konzentration 1:1 blieben DZ unstimuliert. Keines der lebenden Probiotika wurde der dritten Gruppe (geringe Maturation von DZ nach Stimulation in den Konzentrationen 1:1 und 10:1) zugeordnet.

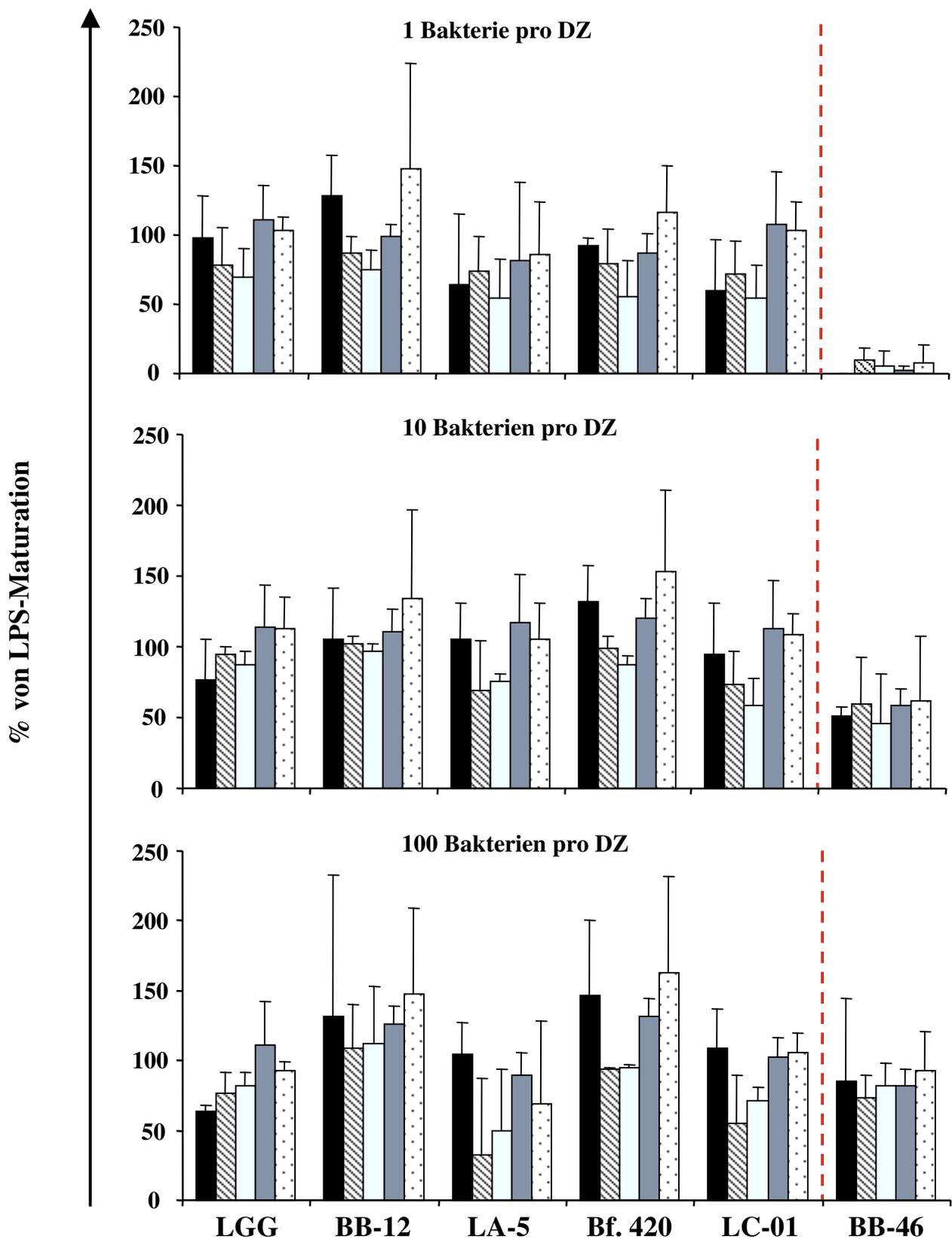


Abbildung 20: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1

■ CD83 ▨ CD86 □ CD80 ■ CD40 □ HLA-DR

4.3.3.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ

Unter Stimulation mit einer Bakterie pro DZ war der höchste Prozentsatz CD83, CD86, CD80 und HLA-DR exprimierender DZ unter BB-12, der niedrigste unter BB-46 zu beobachten (Tabelle 22). Der höchste Anteil CD40⁺ Zellen wurde nach Stimulation mit LGG, der niedrigste unter BB-46 festgestellt.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	97,8 ± 30,5 ^a	77,7 ± 28,2	69,9 ± 20,3	111,1 ± 24,2	102,9 ± 9,9
BB-12	128,2 ± 30 ^{a,c}	86,9 ± 12,6	75,5 ± 13,4	99,1 ± 8,1	147,8 ± 75,7
LA-5	64,6 ± 50,2 ^a	73,7 ± 25,4	54 ± 28,6	81,6 ± 56,2	86 ± 37,7
Bf. 420	91,9 ± 5,4 ^{a,d}	79,1 ± 25,5	55,9 ± 25,6	87,5 ± 13,8	116,3 ± 33,5
LC-01	59,8 ± 36,9 ^{a,d}	72,2 ± 23,7	54,2 ± 23,5	107,8 ± 38,3	103,5 ± 20
BB-46	0 ^b	9,9 ± 8,9	5,9 ± 10,2	2,1 ± 3,7	7,7 ± 13,3

Tabelle 22: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab und cd innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede (p<0,05, MWU).

4.3.3.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ war der höchste Prozentsatz CD86 und CD80 exprimierender DZ nach Stimulation mit BB-12, der niedrigste Anteil von CD83-, CD86- und CD80-positiven Zellen unter BB-46 zu beobachten (Tabelle 23). Der höchste Prozentsatz CD83, CD40 und HLA-DR exprimierender DZ wurde nach Stimulation mit Bf. 420 festgestellt. Unter der Wirkung von BB-46 exprimierten DZ am niedrigsten CD40 und HLA-DR.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	77,1 ± 28	94,3 ± 5,5 ^{a, c}	87,3 ± 9,8 ^a	114,2 ± 29,6	112,4 ± 23
BB-12	105,2 ± 36,3	102,1 ± 5,4 ^{a, c}	97,1 ± 5,2 ^{a, c}	110,5 ± 16,5	134,3 ± 62,6
LA-5	105,6 ± 25,7	68,7 ± 35,8	75,7 ± 5,2 ^d	117,1 ± 33,8	105,8 ± 25,5
Bf. 420	131,7 ± 25,6	99,2 ± 8 ^{a, c}	87,1 ± 6,3 ^{a, c}	120,2 ± 13,9	153,6 ± 57,5
LC-01	94,9 ± 35,8	73 ± 24,1 ^b	58,7 ± 18,9 ^d	113,3 ± 33,7	108,4 ± 14,7
BB-46	51 ± 6,9	59,9 ± 32,6 ^d	46 ± 35,4 ^b	58,2 ± 12,5	62 ± 45,5

Tabelle 23: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab und cd innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.3.3.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ war der höchste Prozentsatz CD86 und CD80 exprimierender DZ nach Stimulation mit BB-12, der niedrigste unter LA-5 zu beobachten (Tabelle 24). Der höchste Anteil CD83-, CD40- und HLA-DR-positiver Zellen wurde unter Bf. 420 festgestellt. Der niedrigste Prozentsatz von CD83⁺ DZ war nach Stimulation mit LGG zu beobachten, von CD40⁺ Zellen unter BB-46, von HLA-DR⁺ Zellen unter LA-5.

	CD83	CD86	CD80	CD40	HLA-DR
LGG	63,1 ± 4,8	76,8 ± 15,3	81,6 ± 9,7 ^a	111,3 ± 31,3	91,2 ± 6,1
BB-12	131,4 ± 101,5	108,6 ± 31,1	111,8 ± 41,4 ^c	126,6 ± 12,6	147,3 ± 61,9
LA-5	104,9 ± 22,4	32,5 ± 55,5	49,2 ± 44,4 ^a	89,7 ± 15,9	68,6 ± 60
Bf. 420	146,4 ± 54,1	94,1 ± 0,9	94,5 ± 2,9 ^b	131,8 ± 12,9	162,6 ± 69,5
LC-01	109,3 ± 27,4	55 ± 34	71,1 ± 9,4 ^{a, d}	102,2 ± 14	105,8 ± 14,3
BB-46	84,8 ± 59,5	73 ± 16,1	81,7 ± 16,6	82,4 ± 11,9	92,8 ± 28,3

Tabelle 24: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert ± Standardabweichung). Superscript-Paare ab und cd innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.3.4 Analyse der Zytokinproduktion

DZ wurden mit lebenden LGG, BB-12, LA-5, Bf. 420, LC-01 und BB-46 in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle stimuliert. Die Ansätze mit BB-12 wurden viermal, mit den restlichen fünf Probiotika jeweils dreimal durchgeführt. In den Zellkulturüberständen aus den Stimulationsversuchen wurden folgende Zytokine bestimmt: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF- α .

Analog zu den UV-inaktivierten Probiotika wurden lebende Bakterien in zwei Gruppen anhand vom Prozentsatz der Maturationsmarker nach Stimulation arbiträr eingeteilt. Die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen stimmten mit dieser Einteilung teilweise überein. Die Abbildung 21 zeigt die Reihenfolge probiotischer Bakterien, welche die Zytokinproduktion (vom höchsten zum niedrigsten Prozent der Werte unter LPS-Maturation) beeinflussten. Eine hohe Zytokinproduktion wurde unter Stimulation von lebenden BB-12, Bf. 420 und LA-5 in allen Konzentrationen festgestellt. Darüber hinaus war die Sekretion von einzelnen Zytokinen unter LA-5 sehr gering. LGG zeigten, wie bereits im UV-inaktivierten Zustand, eine moderate Wirkung auf die Zytokinproduktion. Nach Stimulation mit LC-01 wurde eine moderate bis schwache Zytokinantwort festgestellt. Unter BB-46 wurden in allen Konzentrationen die niedrigsten Mengen von Zytokinen (mit einzelnen Ausnahmen) gemessen. Somit wurden LC-01 und BB-46 anhand der Zytokinproduktion der dritten Gruppe (geringe Stimulationseffekt auf DZ in den Konzentrationen 1:1 und 10:1) zugeordnet.

1 Bakterien pro DZ

IL-1 β	LA-5	LGG	LC-01	BB-12	Bf. 420	BB-46
IL-6	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	LGG	BB-46
IL-8	BB-12	Bf. 420	LGG	LA-5	LC-01	BB-46
IL-10	BB-12	Bf. 420	LGG	LC-01	LA-5	BB-46
IL-12	BB-12	Bf. 420	LGG	LA-5	LC-01	BB-46
IL10/IL-12	BB-46	BB-12	Bf. 420	LGG	LC-01	LA-5
IL-13	BB-12	Bf. 420	LGG	LA-5	LC-01	BB-46
IFN- γ	BB-12	LGG	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
MIP-1 α	BB-12	Bf. 420	LGG	LC-01	LA-5	BB-46
MIP-1 β	BB-12	Bf. 420	BB-46	LC-01	LGG	LA-5
TNF- α	BB-12	LC-01	LA-5	LGG	Bf. 420	BB-46

10 Bakterien pro DZ

IL-1 β	LA-5	LGG	LC-01	BB-12	Bf. 420	BB-46
IL-6	BB-12	Bf. 420	LA-5	LGG	LC-01	BB-46
IL-8	BB-12	LGG	BB-46	Bf. 420	LC-01	LA-5
IL-10	BB-12	Bf. 420	LGG	LC-01	LA-5	BB-46
IL-12	LA-5	Bf. 420	BB-12	LC-01	LGG	BB-46
IL10/IL-12	BB-12	LGG	Bf. 420	BB-46	LC-01	LA-5
IL-13	BB-12	Bf. 420	LA-5	LGG	LC-01	BB-46
IFN- γ	LA-5	BB-12	Bf. 420	LGG	LC-01	BB-46
MIP-1 α	BB-12	Bf. 420	LC-01	LGG	LA-5	BB-46
MIP-1 β	Bf. 420	BB-46	BB-12	LGG	LC-01	LA-5
TNF- α	BB-12	LA-5	Bf. 420	LGG	LC-01	BB-46

100 Bakterien pro DZ

IL-1 β	BB-12	LGG	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-6	Bf. 420	BB-12	BB-46	LA-5	LGG	LC-01
IL-8	Bf. 420	BB-12	BB-46	LGG	LC-01	LA-5
IL-10	Bf. 420	BB-12	LGG	LA-5	LC-01	BB-46
IL-12	LA-5	Bf. 420	BB-12	LC-01	BB-46	LGG
IL10/IL-12	LGG	BB-12	Bf. 420	BB-46	LC-01	LA-5
IL-13	Bf. 420	BB-12	LA-5	LGG	BB-46	LC-01
IFN- γ	BB-12	LA-5	Bf. 420	LGG	LC-01	BB-46
MIP-1 α	BB-12	Bf. 420	LGG	LA-5	BB-46	LC-01
MIP-1 β	Bf. 420	BB-12	BB-46	LA-5	LGG	LC-01
TNF- α	Bf. 420	BB-12	LA-5	LGG	LC-01	BB-46



Abbildung 21: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1. Mit Kursivschrift sind die Stämme gekennzeichnet, die sich in ihrer Wirkung nicht unterscheiden.

4.3.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ

Unter Stimulation mit einer Bakterie pro DZ war die IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , MIP-1 α und TNF- α Sekretion unter BB-12 am höchsten und unter BB-46 am niedrigsten (Tabelle 25). Das Verhältnis IL-10/IL-12 war unter BB-46 am höchsten und unter LA-5 und LC-01 am niedrigsten. Unter der Wirkung von LA-5 wurden die größten Mengen von IL- β , nach Stimulation mit BB-46 die niedrigsten bestimmt. MIP-1 β wurde am höchsten unter BB-12, am niedrigsten nach Stimulation mit LA-5 von DZ sezerniert.

	LGG	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	873,6 \pm 1137,7	461,9 \pm 677,9	1231 \pm 2007,2	101,6 \pm 113,4	858,3 \pm 1417,4	48,2 \pm 76,1
IL-6	13 \pm 14,5	70,6 \pm 58 ^a	26,8 \pm 40,8	26,7 \pm 20 ^a	15,4 \pm 23,6	1,2 \pm 1,7 ^b
IL-8	55 \pm 50,2	149,4 \pm 150,1	35,4 \pm 50,1	63,6 \pm 100,2	24,7 \pm 36	6,5 \pm 11,2
IL-10	16,6 \pm 14 ^a	97 \pm 97 ^{a,c}	3 \pm 3 ^{a,d,e}	25 \pm 25 ^{a,f}	6,5 \pm 6 ^{a,d}	0,23 \pm 0,2 ^b
IL-12	1037 \pm 594,3 ^a	2264,6 \pm 1493,3 ^a	887,7 \pm 1172,3 ^a	1391,3 \pm 1354 ^a	567,4 \pm 680,3 ^a	10 \pm 16,4 ^b
IL-10/IL-12	0,02 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,12 \pm 0,2
IL-13	56,8 \pm 56,1	114,2 \pm 82,7	33,8 \pm 34,6	61,7 \pm 106,8	16,3 \pm 28,2	7,9 \pm 13,7
IFN-γ	74,3 \pm 47 ^a	99 \pm 32,4 ^a	66,6 \pm 83 ^a	60,2 \pm 35 ^a	55,3 \pm 58	3,2 \pm 5,5 ^b
MIP-1α	42,2 \pm 32 ^a	110,3 \pm 70,1 ^a	23,2 \pm 29 ^a	64,2 \pm 78 ^a	31,1 \pm 26 ^a	0 ^b
MIP-1β	46,9 \pm 33,9	106,7 \pm 94,4	38 \pm 41,5	73,1 \pm 87,1	50,2 \pm 54,9	57,9 \pm 99,5
TNF-α	134,4 \pm 120,9 ^a	281 \pm 265 ^a	145,2 \pm 239,9	86,9 \pm 73 ^a	162,1 \pm 247	1,4 \pm 2,2 ^b

Tabelle 25: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.3.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ war die IL-6, IL-10, IL-13, MIP-1 α und TNF- α Sekretion unter BB-12 am höchsten und unter BB-46 am niedrigsten (Tabelle 26). Die IL-1 β , IL-12 und IFN- γ Produktion war nach Stimulation mit LA-5 am höchsten, unter BB-46 am niedrigsten. Durch BB-12 stimulierte DZ produzierten die höchsten Mengen von IL-8, unter LA-5 war IL-8 am niedrigsten. Das IL-10/IL-12 Verhältnis war unter BB-12 am größten, unter LA-5 am geringsten. MIP-1 β wurde in den höchsten Mengen von DZ nach Stimulation mit Bf. 420, in den geringsten Mengen unter LA-5 produziert.

	LGG	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	2288,6 \pm 2650,8	1017,1 \pm 1317,1	3150,4 \pm 4763,5	338,2 \pm 512,3	1819,9 \pm 5065,6	15,2 \pm 26,4
IL-6	34,4 \pm 38,2	149 \pm 86 ^a	36,6 \pm 30,8	85,6 \pm 59,7	26,7 \pm 36,4	14 \pm 17,4 ^b
IL-8	157,7 \pm 100	164,5 \pm 103,7	38,9 \pm 31,2	103,8 \pm 62,3	50,5 \pm 58,7	140 \pm 199,5
IL-10	135,2 \pm 111 ^a	555,5 \pm 520,8 ^a	40,6 \pm 50 ^a	193 \pm 178,3 ^a	40,8 \pm 48,1	3,5 \pm 2,6 ^b
IL-12	883 \pm 319,8 ^a	2760,5 \pm 2029,3 ^c	2828,9 \pm 723,6 ^{b,c}	2821,9 \pm 1973 ^c	992,2 \pm 775,4 ^a	104,7 \pm 76,3 ^{b,d}
IL-10/IL-12	0,13 \pm 0,09	0,22 \pm 0,23	0,02 \pm 0,03	0,07 \pm 0,04	0,03 \pm 0,02	0,05 \pm 0,04
IL-13	254,6 \pm 178,8 ^a	454,4 \pm 245,4 ^a	259,2 \pm 267,8 ^a	297,3 \pm 493,9	73,3 \pm 74,9	0 ^b
IFN-γ	105,6 \pm 47,7	164,9 \pm 72,2 ^a	183 \pm 179,7 ^a	116,8 \pm 53,5	83,7 \pm 67,2	24,1 \pm 33,6 ^b
MIP-1α	72,9 \pm 56	150,3 \pm 116,1	67,4 \pm 13,5	118,3 \pm 80,9	76,7 \pm 64,9	27,1 \pm 37
MIP-1β	75,9 \pm 28,1	102,8 \pm 61,4	57,1 \pm 6,3	114,1 \pm 86,4	70,9 \pm 57,7	104,6 \pm 164,4
TNF-α	309 \pm 332,9 ^a	687,3 \pm 596,3 ^a	483 \pm 685,6 ^a	360,3 \pm 358,5 ^a	240 \pm 324,5	15,1 \pm 14,3 ^b

Tabelle 26: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Superscript-Paare ab und cd innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.3.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ war die IL-1 β , IFN- γ und MIP-1 α Sekretion unter BB-12 am höchsten (Tabelle 27). Nach Stimulation mit BB-46 wurden IL-1 β , IL-10, TNF- α und IFN- γ von DZ am niedrigsten produziert. Unter Bf. 420 wurden die höchsten Werte von IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 β und TNF- α festgestellt. Die geringste IL-6, IL-13, MIP-1 α und MIP-1 β Produktion war unter LC-01 zu beobachten. Durch LA-5 stimulierten DZ produzierten die niedrigsten Mengen von IL-8. Unter LGG war IL-12 Produktion am niedrigsten, nach Stimulation mit LA-5 am höchsten. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war nach Stimulation mit LGG am höchsten, unter LA-5 am niedrigsten.

	LGG	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
IL-1β	4369,1 \pm 3498,5 ^a	5433,8 \pm 5341,8 ^a	3982,6 \pm 2015 ^a	2607 \pm 3424,6 ^a	1735,2 \pm 2019,8	63,7 \pm 57 ^b
IL-6	44 \pm 28 ^a	191,8 \pm 81,4 ^b	70 \pm 15 ^a	204,4 \pm 146	38,6 \pm 36 ^a	95,1 \pm 34,7
IL-8	237,2 \pm 39,7	375,1 \pm 209,8	128,4 \pm 78,1	376,3 \pm 201,4	139,5 \pm 92,2	238,9 \pm 54,1
IL-10	147,6 \pm 78,8 ^a	826,8 \pm 516,7 ^b	100 \pm 36 ^{a,c}	1049,4 \pm 1221,2 ^d	71,5 \pm 52 ^{a,c}	68 \pm 52 ^{a,c}
IL-12	15 \pm 3,7 ^a	529,2 \pm 340,3 ^{b,c}	3973,9 \pm 2481 ^{b,d}	775,3 \pm 485,2 ^{b,c}	336,5 \pm 364,6 ^{b,c}	268,8 \pm 314,7 ^{b,c}
IL-10/IL-12	9,4 \pm 3,64 ^a	3,15 \pm 4,16 ^c	0,05 \pm 0,05 ^{b,d}	1,07 \pm 0,76 ^{b,c}	0,33 \pm 0,36 ^{b,c}	0,39 \pm 0,26 ^{b,c}
IL-13	159,1 \pm 73,8	382,2 \pm 392,2	255 \pm 225,2	802,4 \pm 711,6	98,5 \pm 85,8	104,2 \pm 106,3
IFN-γ	114,2 \pm 34,7	237,6 \pm 72,1 ^a	197,9 \pm 74,7 ^c	181 \pm 68,8	87,6 \pm 47 ^b	86 \pm 24 ^{b,d}
MIP-1α	96,4 \pm 17 ^a	200,2 \pm 130 ^b	95,2 \pm 60,2	182,3 \pm 171	64,2 \pm 32 ^a	70,2 \pm 31 ^a
MIP-1β	64,4 \pm 12,6	112,1 \pm 58,9	68,5 \pm 53,6	117,2 \pm 73,3	54,3 \pm 21,3	78,3 \pm 58,2
TNF-α	232,3 \pm 38,1 ^{a,c}	1015,3 \pm 573,4 ^d	943,3 \pm 904,7 ^b	1216,1 \pm 940,4 ^e	171,4 \pm 127,2 ^{a,c}	105,6 \pm 93,5 ^{a,c,f}

Tabelle 27: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Superscript-Paare ab, cd, ef innerhalb einer Zeile zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, MWU).

4.3.5 Dosisabhängige Effekte der lebenden Probiotika

Analog zu dem Vorgehen mit Daten aus den Stimulationsansätzen mit UV-inaktivierten Probiotika wurden statistische Berechnungen mit dem Friedman-Test für verschiedene Konzentrationen (verbundene Proben) eines probiotischen Stammes durchgeführt. Signifikante Werte für lebende Bakterien ($p \leq 0,05$) sind in der Tabelle 28 aufgelistet. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben ergaben bei allen lebenden Probiotika keine signifikanten Unterschiede, dies war auf einen zu kleinen (<6) Stichprobenumfang zurückzuführen.

	LGG	BB-12	LA-5	Bf. 420	LC-01	BB-46
CD83					0,05	
CD86						
CD80						0,05
CD40				0,05		0,05
HLA-DR						
IL-1β	0,05	0,018				
IL-6		0,039		0,05	0,05	0,05
IL-8					0,05	
IL-10		0,039	0,05	0,05	0,05	0,05
IL-12		0,05				
IL-13						
IFN-γ		0,018		0,05		
MIP-1α						0,05
MIP-1β						
TNF-α		0,039	0,05	0,05		0,05

Tabelle 28: Signifikante dosisabhängige Stimulationseffekte innerhalb eines lebenden Probiotikastammes ($p \leq 0,05$, Friedman-Test)

4.3.6 Korrelationsanalyse und Clustering

Die Analysen wurden auf drei Konzentrationen (1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle) beschränkt. IL-13 und das Verhältnis IL-10/IL-12 wurden nicht in die Berechnungen einbezogen. Die Abbildung 22 zeigt exemplarisch je eine Korrelationsmatrix für die gemessenen Parameter und die lebenden probiotischen Stämme in der Konzentration

10:1 Bakterien pro dendritischer Zelle und eine Farbmatrix der skalierten Werte mit dem hierarchischen Clustering der beiden Dimensionen (Stämme und Parameter).

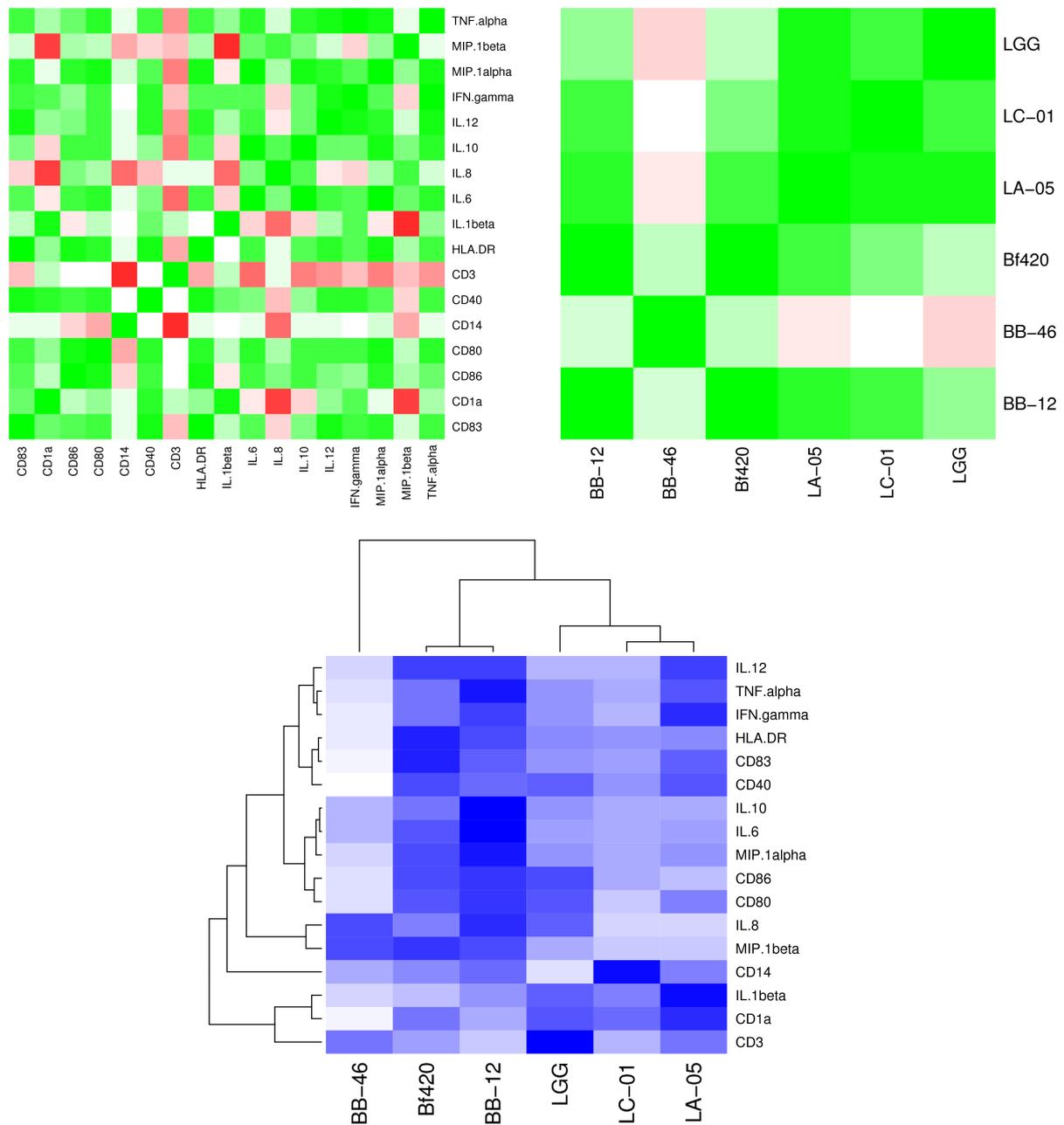


Abbildung 22: Korrelationsmatrix (Stämme und Parameter) und hierarchisches Clustering der lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1

Korrelationsmatrix

Es bestand eine positive Korrelation zwischen allen Maturationsmarkern unter Stimulation mit lebenden Probiotika in drei Konzentrationen. Alle analysierten Zytokine außer IL-1 β korrelierten positiv untereinander bei Stimulation in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro dendritischer Zelle. Weiter bestand eine schwache negative Korrelation zwischen IL-8 und IL-12, IL-8 und IFN- γ , MIP-1 β und IFN- γ in der Konzentration 10:1, zwischen IL-12 und IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 β in der Konzentration 100:1. Im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 wurde eine negative Korrelation zwischen IL-1 β und MIP-1 β festgestellt.

Bei den lebenden probiotischen Stämmen in der Konzentration 10:1 bestand eine positive Korrelation unter LGG, LC-01, LA-5, Bf. 420 und BB-12. BB-46 und LC-01 korrelierten nicht, zwischen BB-46 und LA-5/LGG bestand eine schwache negative Korrelation.

Eine positive Korrelation zwischen allen sechs Probiotika wurde in der Konzentration 1:1 festgestellt.

In der Dosierung 100:1 bestand eine positive Korrelation zwischen LGG, LC-01, LA-5, Bf. 420 und BB-12. BB-46 korrelierte negativ mit LGG, schwach positiv mit LC-01, LA-5 und Bf. 420, mit BB-12 bestand keine Korrelation.

Hierarchisches Clustering

Lebende Probiotika in der Konzentration 10:1 bildeten beim Clustering folgende Gruppen: BB-12 und Bf. 420, LC-01 und LA-5 mit LGG. Die gemessenen Parameter wurden in mehrere Gruppen eingeteilt: IL-1 β /CD1a mit CD3, IL-8/MIP-1 β , CD86/CD80, IL-6/IL-10 und MIP-1 α , HLA-DR/CD83 mit CD40, TNF- α /IFN- γ und IL-12, CD14 bildete eine eigene Gruppe.

Probiotische Bakterien in der Konzentration 1:1 wurden in folgende Gruppen eingeteilt: Bf. 420 und BB-12, LC-01 und LGG mit LA-5, BB-46. Die gemessenen Parameter wurden in zwei Gruppen eingeteilt: CD40/CD86/CD80/HLA-DR/CD1a mit CD83/IFN- γ und IL-12/MIP-1 α mit IL-8, IL-6/IL-10, TNF- α , MIP-1 β .

Wie bei den Dosierungen 1:1 und 10:1 bildete BB-46 beim Clustering in der Konzentration 100:1 eine eigene Gruppe. Die zweite Gruppe bestand aus zwei kleineren (LGG und LA-5, LC-01 und BB-12 mit Bf. 420). Die untersuchten Parameter bildeten mehrere Gruppen: CD3/IL-12, CD14/HLA-DR, CD80/CD86, TNF- α /IFN- γ mit CD83, CD1a/IL- β , IL-10/MIP-1 α , IL-6/IL-8 mit MIP-1 β , CD40.

4.4 Vergleich UV-inaktivierter versus lebende Probiotika

Der Vergleich der Modulation von DZ durch UV-inaktivierte und lebende Probiotika wurde mit folgenden Stämmen in den Konzentrationen 1:1, 10:1 und 100:1 Bakterien pro DZ durchgeführt: LGG, BB-12, LA-5, Bf. 420, LC-01 und BB-46.

4.4.1 Stimulation mit einer Bakterie pro DZ

Unter Stimulation mit einer Bakterie war der Prozentsatz CD83, CD80 und CD40 exprimierender DZ nach Stimulation mit lebenden LGG höher als unter UV-inaktivierten Probiotika (Abbildung 23). Der Anteil CD86⁺ Zellen war gleich (77%), unter Stimulation mit UV-inaktivierten Bakterien wurden mehr HLA-DR-positive DZ detektiert. Tendenzen bestanden zwischen lebenden und UV-inaktivierten LGG im Prozentsatz von CD80 und CD40 exprimierenden DZ ($p=0,083$, MWU).

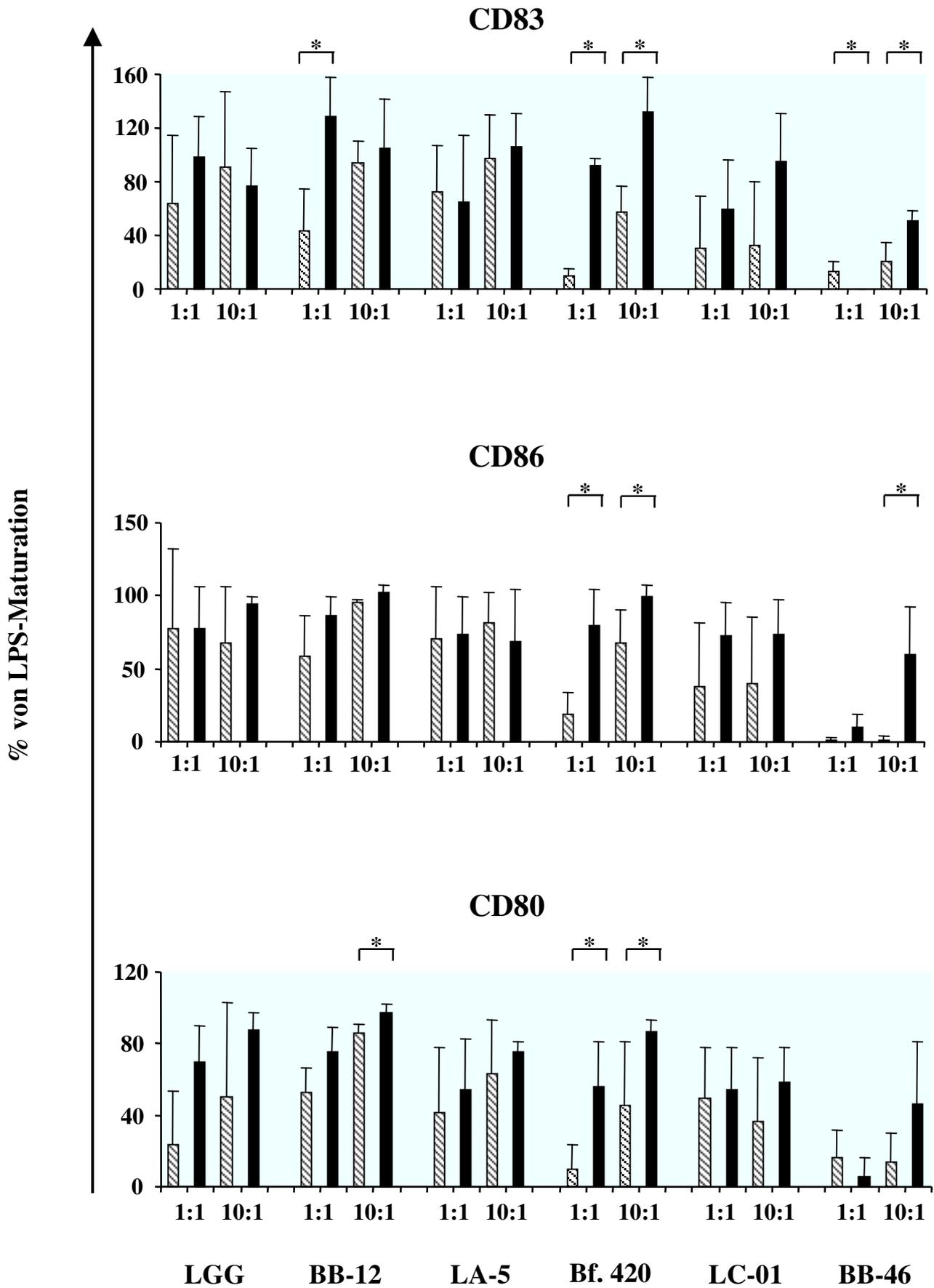
Nach Stimulation mit lebenden BB-12 wurde ein signifikant höherer Prozentsatz CD83, CD40 und HLA-DR exprimierender DZ im Vergleich zu dem UV-inaktivierten Stamm festgestellt. Tendenzen wurden im Anteil von CD80⁺ Zellen beobachtet ($p=0,077$, MWU).

Durch lebende LA-5 stimulierte DZ exprimierten mehr CD80 und CD40, weniger CD83 als unter den UV-inaktivierten Bakterien, diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Unter Stimulation mit lebenden Bf. 420 wurde ein signifikant höherer Anteil Maturationsmarker exprimierender DZ festgestellt.

Nach Stimulation mit lebenden LC-01 exprimierten DZ mehr CD83, CD86, CD80, CD40 und HLA-DR.

Unter dem Einfluss UV-inaktivierter BB-46 war der Prozentsatz CD83 exprimierender DZ signifikant höher als unter lebenden Bakterien. Der Anteil CD80- und HLA-DR-positiver Zellen war ebenfalls höher nach Stimulation mit toten BB-46, CD86-positiver Zellen niedriger.



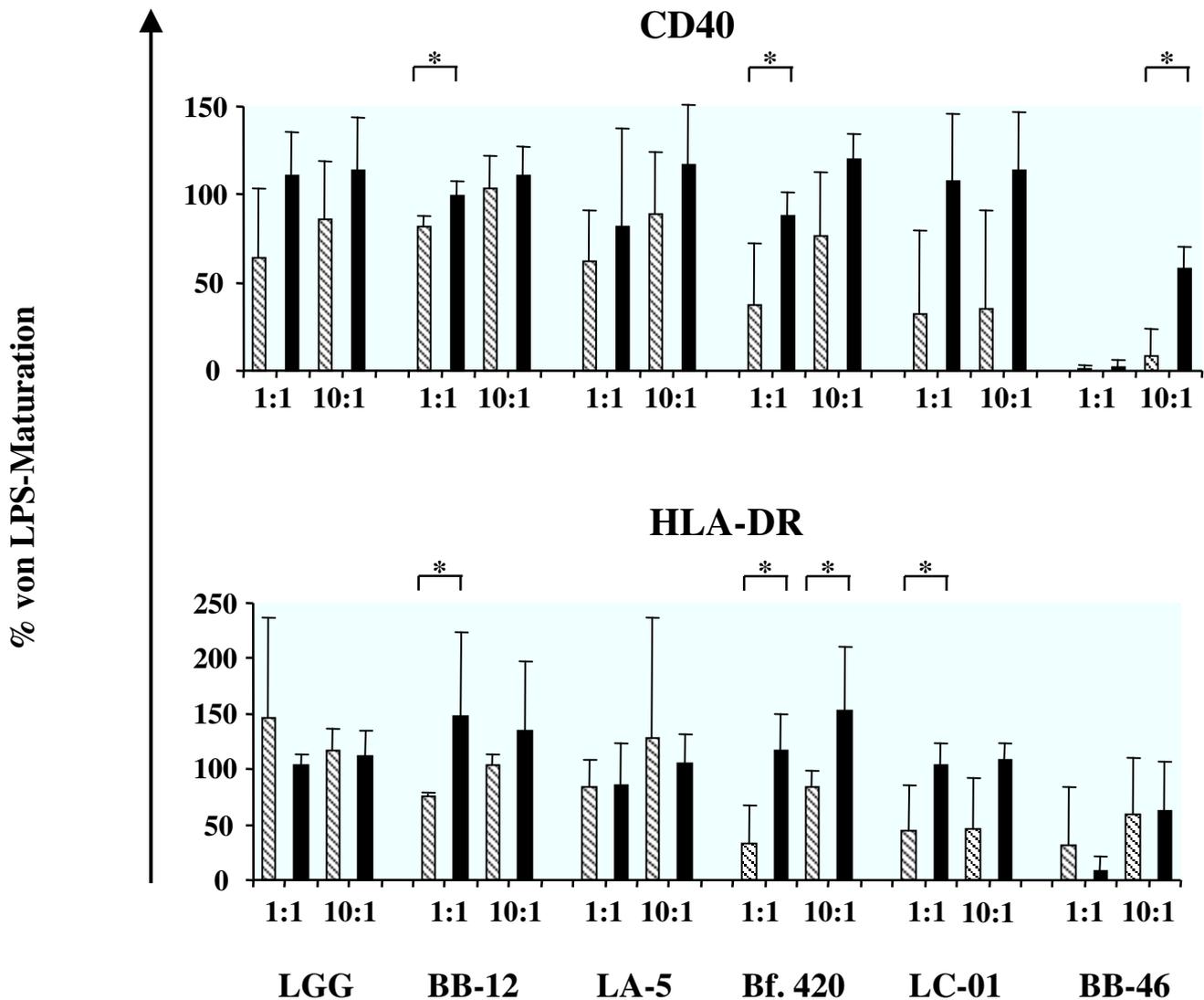


Abbildung 23: Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1 und 10:1 (*p<0,05, MWU) ▨ UV-inaktivierte Probiotika ■ lebende Probiotika

Unter Stimulation mit lebenden LGG produzierten DZ alle gemessenen Zytokine in höheren Mengen, das Verhältnis IL-10/IL-12 war auch erhöht (0,01 bei den UV-inaktivierten versus 0,02 bei den lebenden Laktobazillen, $p=0,564$, MWU). Tendenzen bestanden in der Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , MIP-1 β und TNF- α ($p=0,083$, MWU).

Durch lebende BB-12 stimulierte DZ sezernierten in höheren Mengen alle Zytokine außer MIP-1 α , das Ratio IL-10/IL-12 war höher im Vergleich zu den UV-inaktivierten Bifidobakterien (0,05 versus 0,03, $p=0,480$, MWU). Signifikante Unterschiede wurden in der

Sekretion von IL-10, IFN- γ und MIP-1 β ($p=0,034$, MWU) und Tendenzen in der Produktion von IL-1 β , IL-12, IL-13 und TNF- α ($p=0,077$, MWU) beobachtet.

Unter Stimulation mit lebenden LA-5 wurde eine höhere Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu den UV-inaktivierten Laktobazillen festgestellt. Das Verhältnis IL-10/IL-12, IL-13 und die MIP-1 α Sekretion waren niedriger, IL-10 und MIP-1 β Werte waren fast gleich. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Nach Stimulation mit lebenden Bf. 420 produzierten DZ alle Zytokine in höheren Mengen, das Ratio IL-10/IL-12 war 0,03 (bei den toten Bf. 420 Null, $p=0,046$, MWU). Signifikante Unterschiede wurden in der Sekretion von IL-10, IFN- γ und MIP-1 β beobachtet.

Unter dem Einfluss von lebenden LC-01 sezernierten DZ signifikant mehr IL-12 und TNF- α als unter UV-inaktivierten Bakterien. Das Ratio IL-10/IL-12 war bei den lebenden Laktobazillen niedriger (0,01 versus 0,39, $p=0,507$, MWU), ebenso wie MIP-1 α Produktion. Die Sekretion der restlichen Zytokine war nach Stimulation mit lebenden Probiotika höher.

Durch lebende BB-46 stimulierte DZ produzierten signifikant mehr TNF- α und signifikant weniger MIP-1 α ($p=0,046$ bzw. $p=0,037$, MWU) als unter UV-inaktivierten Bakterien. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war bei den lebenden Bifidobakterien 0,12, bei den UV-inaktivierten 0,06 ($p=0,487$, MWU). Die Sekretion der restlichen Zytokine war unter Stimulation mit lebenden Bakterien höher im Vergleich zu den toten Bakterien, es bestand kein signifikanter Unterschied.

4.4.2 Stimulation mit 10 Bakterien pro DZ

Zusammenfassend bestanden die größten Unterschiede in dem Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ nach Stimulation mit lebenden Bf. 420, LC-01 und BB-46 im Vergleich zu den UV-inaktivierten Stämmen (Abbildung 23). Unter Stimulation mit lebenden LGG exprimierten DZ weniger CD83 als unter UV-inaktivierten Bakterien. Unter der Wirkung von toten LA-5 wurde ein höherer Anteil CD86- und HLA-DR- positiver Zellen im Vergleich zu lebenden Laktobazillen beobachtet.

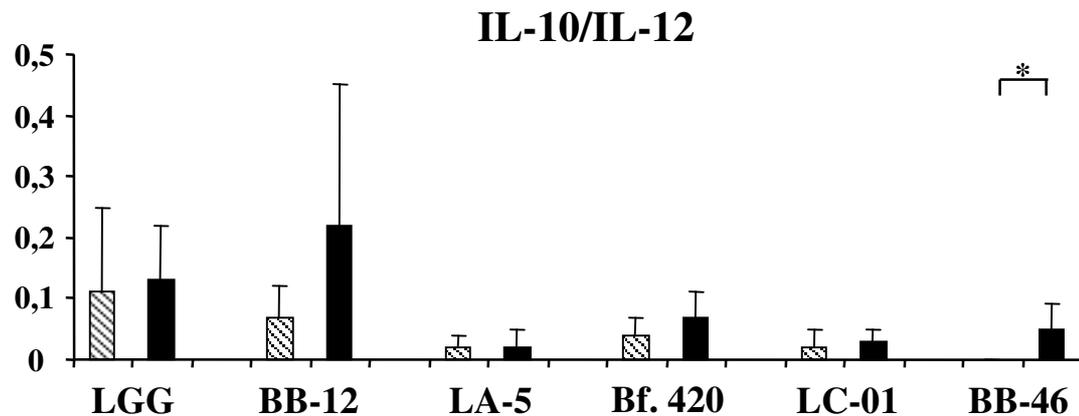
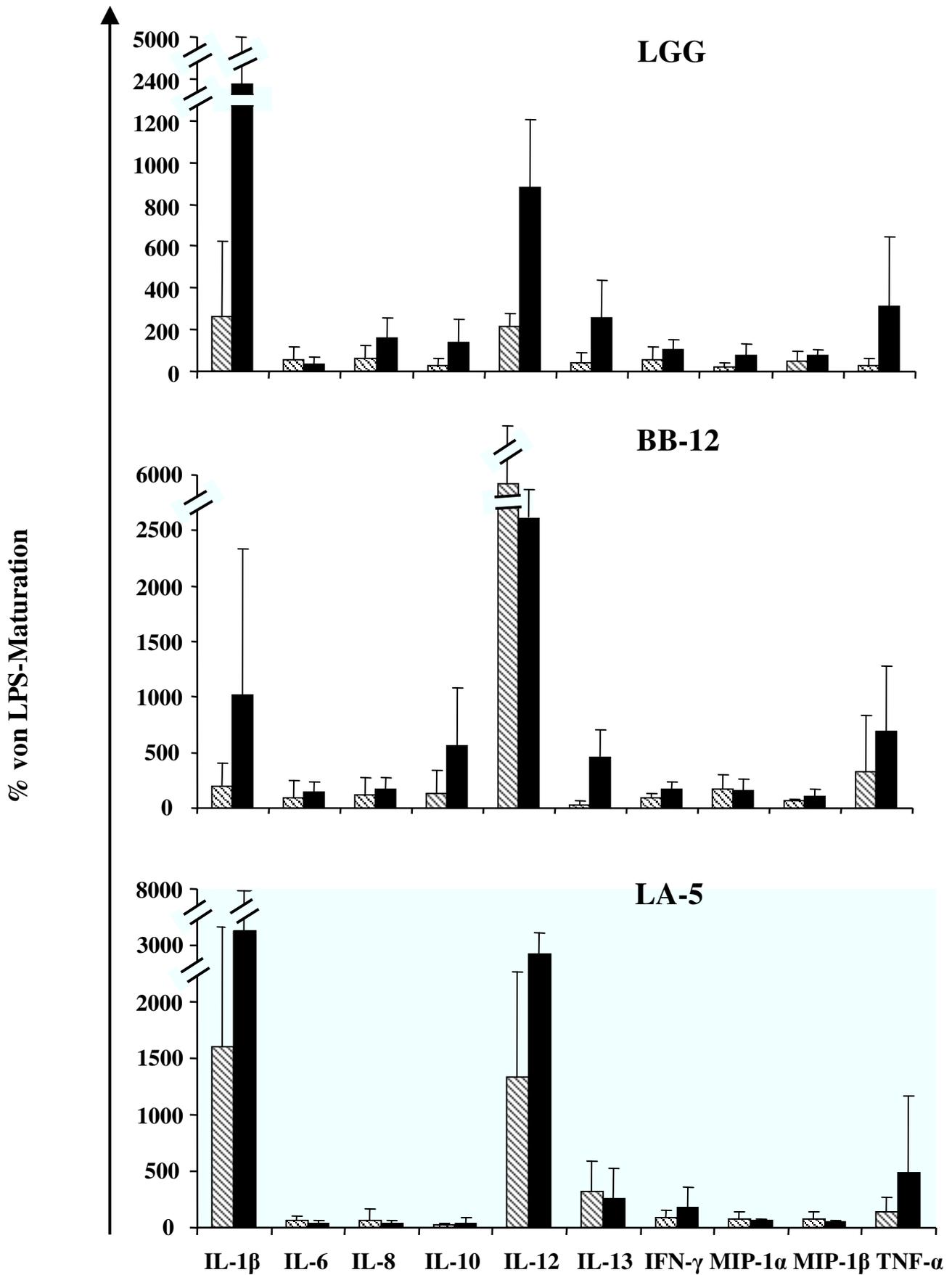


Abbildung 24: Das IL-10/IL-12 Ratio nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (*p=0,037, MWU)

▨ UV-inaktivierte Probiotika ■ lebende Probiotika

Das Verhältnis IL-10/IL-12 war am höchsten unter UV-inaktivierten LGG und lebenden BB-12 (Abbildung 24). Den stärksten Unterschied zwischen den toten und lebenden Bakterien zeigten BB-12 und BB-46, den geringsten LGG, LA-5 und LC-01.

Die Abbildung 25 zeigt den Vergleich der Zytokinproduktion in Prozent von LPS-Maturation nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika in der Konzentration 10:1 Bakterien pro DZ.



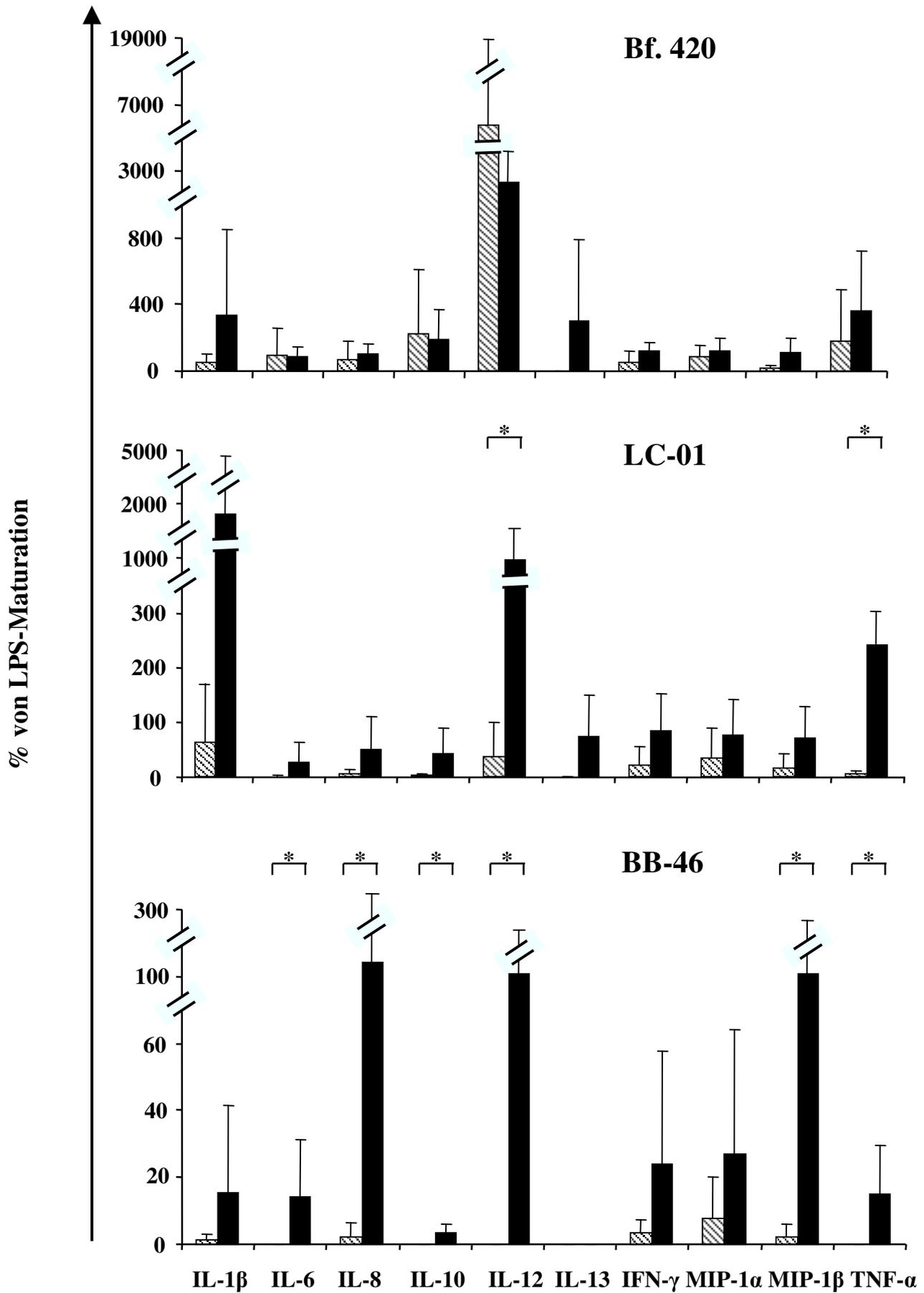


Abbildung 25: Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (* $p \leq 0,05$, MWU)

▨ UV-inaktivierte Probiotika ■ lebende Probiotika

Zusammenfassend bestanden die größten Unterschiede in der Zytokinproduktion analog zum Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ zwischen UV-inaktivierten und lebenden BB-46, LC-01 und Bf. 420. Die IL-12 Produktion war unter der Wirkung von lebenden BB-12 und Bf. 420 geringer als unter UV-inaktivierten Bakterien. LGG zeigte Tendenzen in der IL-12, MIP-1 α und TNF- α Sekretion ($p=0,083$, MWU).

4.4.3 Stimulation mit 100 Bakterien pro DZ

Unter Stimulation mit lebenden LGG exprimierten DZ weniger CD83, CD86 ($p=0,05$, MWU) und HLA-DR als unter UV-inaktivierten Probiotika. Der Prozentsatz CD80 und CD40 exprimierender DZ war dagegen höher. Unter Stimulation mit lebenden LGG produzierten DZ alle gemessenen Zytokine außer IL-12 in höheren Mengen, das Verhältnis IL-10/IL-12 war auch erhöht (9,4 bei lebenden Laktobazillen versus 0,11 bei UV-inaktivierten, $p=0,05$, MWU). Signifikante Unterschiede bestanden in der Sekretion von IL-1 β , IL-8, IL-12, MIP-1 β und TNF- α ($p=0,05$, MWU).

Nach Stimulation mit lebenden BB-12 wurde ein höherer Anteil Maturationsmarker exprimierender DZ im Vergleich zum UV-inaktivierten Stamm festgestellt. Durch lebende BB-12 stimulierte DZ sezernierten in höheren Mengen alle Zytokine außer IL-12, MIP-1 α und TNF- α . Das Ratio IL-10/IL-12 war höher im Vergleich zu den UV-inaktivierten Bifidobakterien (3,15 versus 0,48).

Durch lebende LA-5 stimulierte DZ exprimierten weniger Maturationsmarker als unter UV-inaktivierten Bakterien. Eine höhere Produktion von IL-10, IL-12 und MIP-1 α , eine geringere Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-13, MIP-1 β und TNF- α wurde im Vergleich zu den UV-inaktivierten Laktobazillen festgestellt. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war höher, die IL-8 und IFN- γ Werte waren fast gleich.

Unter Stimulation mit lebenden Bf. 420 wurde ein höherer Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ festgestellt, signifikante Unterschiede bestanden im Anteil von CD80- und HLA-DR-positiven Zellen ($p=0,05$, MWU). Nach Stimulation mit lebenden Bf. 420 produzierten DZ alle Zytokine außer IL-12 in höheren Mengen, das Ratio IL-10/IL-12 war

1,07, bei den toten Bf. 420 0,08 ($p=0,05$, *MWU*). Ein signifikanter Unterschied wurde in der Sekretion von IL-1 β ($p=0,05$, *MWU*) beobachtet.

Nach Stimulation mit lebenden LC-01 exprimierten DZ mehr CD83, CD40 und HLA-DR und weniger CD86 und CD80. Unter dem Einfluss von lebenden LC-01 sezernierten DZ signifikant mehr IL-6 als unter UV-inaktivierten Bakterien ($p=0,05$, *MWU*). Das Verhältnis IL-10/IL-12 war bei lebenden Laktobazillen signifikant höher (0,33 versus 0,03, $p=0,05$, *MWU*). Die Sekretion von IL-13 war unter Stimulation mit lebenden Probiotika geringer, die von den restlichen Zytokinen höher.

Unter dem Einfluss lebender BB-46 war der Prozentsatz CD86 und CD80 exprimierender DZ signifikant höher als unter UV-inaktivierten Bakterien ($p=0,05$, *MWU*). Der Anteil von CD83-, CD40- und HLA-DR-positiven Zellen war ebenfalls höher nach Stimulation mit lebenden Probiotika. Durch lebende BB-46 stimulierte DZ produzierten signifikant mehr IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , MIP-1 β und TNF- α ($p=0,05$, *MWU*) als unter UV-inaktivierten Bakterien. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war bei den lebenden Bifidobakterien 0,39, bei den UV-inaktivierten 0,12. Die Sekretion von den restlichen Zytokinen war unter Stimulation mit lebenden Bakterien höher im Vergleich zu den toten Bakterien.

5. DISKUSSION

5.1 Auswahl der Methoden

5.1.1 Generierung dendritischer Zellen

Immature DZ wurden aus Monozyten generiert, welche aus PBMZ gesunder Spender gewonnen wurden. Diese DZ wurden sowohl mit UV-inaktivierten als auch mit lebenden Probiotika stimuliert. Die PBMZ wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem peripheren Blut isoliert, um eine Lagerung der Zellen bis zur Verarbeitung und eine eventuell damit verbundene Aktivierung der Monozyten zu vermeiden. Zunächst wurden die Thrombozyten durch eine schwache Zentrifugation entfernt, da diese sich später an die Monozyten binden und die Zellen aktivieren können¹⁵². Anschließend erfolgte eine Anreicherung der Monozyten mittels Plastikadhärenz, welches eine einfache und kostensparende Methode ist. Im Vergleich zur positiven oder negativen Selektion CD14⁺ Monozyten, zwei weit verbreitete, immunomagnetische Methoden, wurden einige Nachteile der Isolation von Monozyten durch Plastikadhärenz beschrieben¹⁵³. Einer dieser Nachteile besteht in der Kontamination der aus Monozyten generierten DZ durch Lymphozyten (vor allem B- und T-Zellen). Das Verhältnis beider Populationen war in unseren Versuchen sehr variabel und spenderabhängig. In Vorversuchen wurden die kontaminationsrelevante Faktoren, wie Dauer der Adhärenz und Anzahl und Stärke der Waschschrte, um nicht-adhärenz Zellen zu entfernen¹⁵⁴, optimal angepasst.

Die Generierung immaturer DZ aus Monozyten erfolgte nach dem Protokoll von Sallusto und Lanzavecchia unter Zugabe von GM-CSF und IL-4, welche eine etablierte und häufig angewandte Methode darstellt⁸⁶. Der Anteil maturer CD83⁺ DZ nach LPS-Stimulation entsprach den Daten von Romani et al.⁷⁴. Auch die Morphologie und der Phänotyp der in unseren Versuchen generierten immaturen und maturen DZ waren mit publizierten Ergebnissen von etablierten DZ-Studien^{140;155} in Übereinstimmung.

5.1.2 CD3-, CD14- und CD1a-positive Zellen

Es ist bekannt, dass DZ in der Lage sind, spontan Cluster mit ruhenden T-Zellen zu bilden¹⁵⁶. Dieses durch Kontamination von T-Zellen bedingte Phänomen beobachteten wir auch in unseren DZ Kulturen. Die Auswertungen von einigen durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass der Anteil von CD3⁺ T-Zellen nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika in den hohen Bakterienkonzentrationen bis zu 20% anstieg. Wir vermuten, dass es sich um die beginnende DZ-T-Zellen Interaktion handelte,

wobei wir eine Polarisierung und Proliferation spezifischer T-Zellklone aufgrund der dafür zu kurzen Stimulationszeit (24 h anstatt zwei Wochen) ausschließen würden.

Ein Anstieg CD14-positiver Zellen wurde ebenfalls unter Stimulation mit probiotischen Bakterien in den hohen Konzentrationen beobachtet. Braat et al. berichteten, dass 27% maturaer DZ CD14 nach der Kultivierung mit *Klebsiella pneumoniae*, einem gram-negativen kommensalen Keim aus dem GIT, exprimierten¹⁵⁷. Die Autoren verbinden diese Expression mit der Aktivierung von LPS-Signalkaskade und TLR4 durch Klebsiella. Da Laktobazillen und Bifidobakterien gram-positive Mikroorganismen sind, ist der erhöhte Anteil von CD14⁺ Zellen möglicherweise durch die Wirkung von Lipoteichonsäure und die daraus resultierende TLR2-Aktivierung zu erklären.

Da CD1a ein charakteristischer DZ-Marker ist, wurde der durchflusszytometrische Nachweis seiner Expression als Bestätigung für das Vorhandensein dieser Zellen verwendet.

5.1.3 Zytokinbestimmung (Bio-Plex)

Zur Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen wurde ein Bio-Plex Zytokinassay angewandt. Der gleichzeitige Nachweis verschiedener Zytokine in einer Probe ist essentiell für die Bestimmung des Zytokinmusters der untersuchten Zellpopulation. Ein und dasselbe Zytokin und/oder Chemokin kann von verschiedenen Zelltypen produziert werden. Da es sich in unseren Versuchen um eine aus DZ und kontaminierenden Lymphozyten bestehende Mischpopulation handelte, ist es anzunehmen, dass die gemessenen Zytokinkonzentrationen überwiegend von DZ, T- und NK-Zellen stammen. Humane NK-Zellen sezernieren IFN- γ in großen Mengen⁵⁷ und außerdem Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β und IL-8¹⁵⁸. Der Anteil von CD16⁺ Zellen betrug nur 3,8% der LPS-stimulierten Zellen in unseren Vorversuchen. Deswegen war vermutlich die Beteiligung von NK-Zellen an der Zytokinproduktion nicht relevant. Es ist bekannt, dass IFN- γ von Th1- und IL-13 von Th2-Effektorzellen sezerniert werden⁵⁹. Während wir eine sehr geringe IL-13 Produktion beobachteten, stiegen die IFN- γ Werte auf bis zu ca. 2500 pg/ml in einzelnen Versuchen. Es wäre möglich, dass die Sekretion dieses Zytokins durch DZ induziert wurde. Banchereau beschrieb in einem Review DZ-Subpopulationen, welche IFN- γ und IL-13 produzieren können⁵⁷. IL-10 wird sowohl von DZ als auch von Treg gebildet⁹³. Hierfür kann die intrazelluläre Färbung und die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden, um die Zytokinquelle zu identifizieren¹⁵⁹, wozu weitere Ansätze mit DZ benötigt würden. Alternativ wäre die immunomagnetische Isolierung einer hoch aufgereinigten

Monozytenpopulation (CD14⁺ Zellen über 90%), aus welcher eine DZ-Population (fast) ohne kontaminierenden Lymphozyten generiert werden kann¹⁵³.

Die DZ-Polarisation *in vivo* wird durch viele immunkompetenten Zellen und Mikromilieufaktoren beeinflusst. Deswegen glauben wir, dass die Anwesenheit von Lymphozyten in unseren DZ-Kulturen die Polarisationsrichtung (=Zytokinmuster) von DZ nach Stimulation durch UV-inaktivierte und lebende Probiotika verstärken, aber nicht verändern kann. In unserer Arbeitsgruppe sollen die T-Zell-Antworten in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

5.1.4 Probiotische Kulturen

Unser Vorgehen bei der Lagerung und Auszählung UV-inaktivierter und lebender probiotischer Bakterien und bei der Durchführung der Stimulationsansätze mit DZ unterschied sich deutlich von den aus der Literatur bekannten Versuchen. Probiotika wurden nach der UV-Bestrahlung im PBS bei +4°C für wenige Wochen aufbewahrt, unmittelbar vor dem Ansetzen abzentrifugiert und direkt im Zellkulturmedium mittels DAPI-Färbung ausgezählt. Die Zahl der lebenden Bakterien wurde ebenfalls direkt vor der Kultivierung mit DZ durch Vitalfärbung bestimmt. Der einzige Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit, bakterielle Stämme für jede Stimulation neu ansetzen zu müssen und somit eventuell das Risiko der Variabilität zwischen den wiederholten Untersuchungen eines Stammes zu erhöhen. Um dieses Risiko zu reduzieren, könnten die Bakterien nach dem Anzichten bei -20°C oder bei -80°C aliquotiert eingefroren werden^{159;160}. In unseren Experimenten zeigten jedoch die eingefrorenen und anschließend aufgetauten Probiotika keine Wirkung. Ein weiterer Unterschied bestand in der Bestimmung der Bakterienzahlen. Oft wurde nur die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen, welche mit einer definierten Anzahl der koloniebildenden Einheiten korrespondieren soll¹⁶¹. Diese Methode liefert jedoch vergleichsweise ungenaue Ergebnisse. Andere Autoren bevorzugten lyophilisierte Stämme, welche nach ihrem Trockengewicht eingesetzt wurden^{162;163}. Dies erlaubt aber keine Aussage über das Verhältnis von Bakterien pro DZ. Die am häufigsten angewandte Methode war die Ausplattierung und Auszählung von CFU. Die Ergebnisse der CFU Auszählung zeigten signifikant niedrigere Bakterienzahlen als bei der Färbung mit dem LIVE/DEAD Kit¹⁶⁴. Es wird vermutet, dass sich einige bakterielle Zellen in einer Ruhephase befinden und nicht teilungsfähig sind¹⁶⁴. Trotzdem sind sie prinzipiell in der Lage, DZ zu stimulieren und müssen daher mitgezählt werden. Zusätzlich konnte die Anwendung des LIVE/DEAD Kits sicher stellen, dass in unseren Versuchen der Anteil angesetzter Bakterien über 97% vital war. Der

letzte und sehr wichtige Unterschied unserer Ansätze betraf die Stimulation von DZ mit lebenden Probiotika. In fast allen uns bekannten Arbeiten (mit einer Ausnahme¹³²) wurde die Zugabe von verschiedenen Antibiotika zum Zellkulturmedium für DZ, welche sporadisch vorkommende kontaminierende Keime abtöten sollen, beschrieben. In unseren Versuchen fand die Penizillinzugabe vier Stunden nach Stimulation mit Probiotika statt. Ziel war hier, eine möglichst lange antibiotikafreie Zeitspanne zu erreichen, um den Metabolismus der Bakterien minimal zu stören und so der Situation *in vivo* näher zu kommen.

5.2 Phänotyp und Funktionen der DZ

5.2.1 Maturation durch UV-inaktivierte Probiotika

Zuerst wurden die DZ-Antworten auf UV-inaktivierte Probiotika untersucht. Diese Bakterien sind einerseits nicht mehr teilungsfähig, können also die DZ-Kultur nicht überwachen, benötigen keine Zugabe von Penizillin und besitzen andererseits eine konservierte Strukturintegrität¹⁶⁵. Wir teilten die UV-inaktivierten Bakterien anhand ihrer Fähigkeit, Maturationsmarker zu indizieren, in drei Gruppen ein. Zur ersten Gruppe gehörten LGG, LR, BB-12, LA-5 und LA-2, welche in allen Konzentrationen eine Maturation von DZ induzierten. Bf. 420 wurde in die zweite Gruppe eingeteilt und stimulierte die Maturation von DZ nur in einer Konzentration von 100:1 Bakterien pro DZ. Die dritte Gruppe bildeten LC-01 und BB-46, welche in der Dosierung 1 bis 100 Bakterien keine Maturation von DZ hervorrufen konnten. Die Erhöhung der Bakterienkonzentration auf 1000 pro DZ führte bei der Stimulation mit LC-01 zum erhöhten Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ. Vermutlich wird bei dieser Dosierung ein anderer intrazellulärer Signalweg aktiviert als nach Stimulation mit 1 bis 100 Bakterien pro DZ¹⁶⁶. Um signifikante Unterschiede zwischen allen untersuchten bakteriellen Stämmen ermitteln zu können, wurde ein multipler Test (Kruskal-Wallis) angewandt. Anschließend wurden mehrere 2-Stichproben-Vergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei wurde bewusst keine Adjustierung des p-Wertes verwendet, welche bei multiplen Testen der Reduzierung des α -Fehlers dient. Durch unsere Untersuchungen sollten neue Hypothesen bezüglich DZ-Probiotika-Interaktion gewonnen werden. Um potenzielle Mechanismen dieser Interaktion nicht zu übersehen, verzichteten wir auf die Adjustierung.

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob ein stammspezifisches Muster der Zytokinproduktion von DZ unter Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika bestand. Die Ergebnisse der Zytokinmessungen stimmten mit den durchflusszytometrischen Daten nicht vollständig überein. Die höchste Zytokinproduktion wurde je nach Konzentration der

eingesetzten Bakterien unter der Wirkung von LR, BB-12, LA-5, LA-2 und Bf. 420 beobachtet. Dagegen führte die Stimulation mit LGG in allen Konzentrationen zu einer moderaten Antwort. BB-46 induzierte mit einzelnen Ausnahmen die niedrigste Produktion aller Zytokine. Das Zytokinmuster der anderen Probiotika war dosisabhängig mit einer dominierenden Th1-Antwort verbunden. Eine isolierte Th2-Polarisation wurde nicht festgestellt, jedoch sezernierten LA-2 stimulierte DZ mehr IL-13 als IL-12. Die Produktion von regulatorischem IL-10 wurde von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α und MIP-1 β und Th1-Zytokinen, wie IL-12 und IFN- γ begleitet. Das Verhältnis IL-10/IL-12 war am höchsten unter LR Stimulation.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen und des Clusterings (insbesondere die Einteilung von Bakterien in die Gruppen) waren ebenfalls stark von den Probiotikakonzentrationen abhängig und stimmten mit unseren Schlussfolgerungen nur bedingt überein.

Unsere Feststellungen bezüglich unterschiedlicher Maturationskapazitäten von UV-inaktivierten Probiotika bestätigten die Daten aus den Versuchen mit DZ, welche aus dem Knochenmark der Maus generiert wurden¹⁶². Die Stimulation mit sechs verschiedenen gamma-bestrahlten Laktobazillen in den Konzentrationen 1 bis 100 μ g vom Trockengewicht pro ml für 12 h führte zu einer unterschiedlich ausgeprägten Expression von CD86 und HLA-DR. Dabei produzierten DZ, welche die niedrigste Expression der Maturationsmarker aufwiesen, die geringsten Mengen von IL-12 und TNF- α . Dieses Phänomen beobachteten wir ebenfalls. Die Sekretion aller gemessener Zytokine war, wie in unseren Versuchen, vor allem von der Probiotikadosis abhängig. In einer anderen Arbeit mit humanen DZ wurden UV-inaktivierte probiotische Stämme (u. a. LGG und BB-12) anhand der IL-12 und TNF- α Produktion in zwei Gruppen eingeteilt¹⁶³. Die unterschiedlichen Ergebnisse unserer Versuche und denen von Zeuthen bezüglich der Wirkung von LGG und BB-12 lassen sich durch methodische Differenzen, wie Isolation von Monozyten mittels positiver Selektion, Einfrieren von UV-inaktivierten Bakterien, unklares Verhältnis Bakterien pro DZ und eine kürzere Stimulationszeit (18 h versus 24 h in unseren Versuchen) erklären. Auch die Feststellung der Autoren, dass sehr hohe Bakterienkonzentrationen zu einer schwachen Zytokinproduktion führen, widersprach unseren Ergebnissen der Stimulation mit UV-inaktivierten LGG, LC-01 und BB-46 im Verhältnis Bakterien pro DZ = 1000:1. Zwei weitere Forschergruppen berichteten, dass UV-inaktivierte gram-positive *L. planatarum* und *B. adolescentis* im Vergleich zu gram-negativen kommensalen Bakterien humane DZ weder in Th1- noch in Th2-Richtung stimulieren konnten^{159;165}. Es wurde vermutet, dass diese beiden Stämme lokale Entzündungsreaktionen in der Darmmukosa überwachen. In unseren Versuchen zeigten zwei

probiotische Stämme, LC-01 und BB-46, kaum eine Wirkung auf DZ, welche mit der Erhöhung der Bakterienkonzentration anstieg. In den Experimenten von Smits et al. maturierten DZ durch gleichzeitige Stimulation mit Probiotika und den Maturationsfaktoren IL-1 β und TNF- α . In unseren Versuchen wurden DZ nur mit Bakterien behandelt, deswegen sind diese Ergebnisse nicht vergleichbar. Es wurde festgestellt, dass verschiedene hitzeinaktivierte Bifidobakterien DZ, die aus Nabelschnurblut generiert wurden, unterschiedlich stimulierten und eine variable Produktion von IL-10 induzierten¹⁶⁷. Der Vorteil der Verwendung von DZ aus Nabelschnurblut besteht darin, dass eine vorherige Exposition zu den Antigenen der untersuchten Bakterien äußerst unwahrscheinlich ist.

5.2.2 Vergleich der Effekte lebender und UV-inaktivierter Probiotika auf DZ

Für die Stimulationsansätze mit lebenden Probiotika wurden sechs aus acht Stämmen ausgewählt. Da diese Bakterien teilungsfähig sind und unterschiedlich große Mengen Milchsäure produzieren, wurde die Zugabe von Penizillin und den pH-Wert-regulierenden HEPES-Puffer zum Zellkulturmedium benötigt. Im Vergleich zu UV-inaktivierten Probiotika wurden lebende Keime anhand ihrer Maturationsfähigkeit nur in zwei Gruppen bestehend aus LGG, BB-12, LA-5, Bf. 420, LC-01 (Gruppe 1) und BB-46 (Gruppe 2) eingeteilt. Dies wurde durch die Ergebnisse des Clusterings bestätigt. Generell wurde ein erhöhter Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ nach Stimulation mit lebenden Probiotika festgestellt. Am geringsten war dieser Effekt beim Vergleich der LA-5 Wirkung zu beobachten. Die nach Stimulation mit lebenden BB-46 beschriebene DZ-Maturation war unter dem Einfluss des UV-inaktivierten Stamms nicht nachweisbar. Ähnlich verhielt sich die Zytokinproduktion (s. Abbildungen 24 und 25). Zusammenfassend waren die Effekte lebender versus toter Probiotika auf die Zytokinsynthese von DZ in variabler Weise sehr unterschiedlich.

Die modulierende Wirkung von inaktivierten versus lebenden Probiotika wurde bisher kaum verglichen. Bekannt ist, dass die Inaktivierung von Probiotika zu einer reduzierten DZ-Maturation und einer verminderten Produktion von Zytokinen und Chemokinen nach Stimulation mit Bakterien führte^{168;169}. Unsere Versuche zeigten dies ebenfalls. Andere Autoren stellten fest, dass kein Unterschied in der Th1-polarisierenden Wirkung von UV-inaktivierten und lebenden *L. gasseri*, *L. jonsonii* und *L. reuteri* bestand¹⁷⁰. Nach Stimulation mit einem anderen Stamm von *L. reuteri* und *L. casei* modulierten DZ die regulatorischen Antworten. Dabei sezernierten Effektorzellen große Mengen von IL-10 und inhibierten die Proliferation von peripheren CD4⁺ Lymphozyten¹⁶¹. Bei Ansätzen mit UV-inaktivierten Bakterien wurden identische Ergebnisse festgestellt. Dies würde bedeuten, dass die

Polarisationsrichtung von naiven T-Zellen durch Probiotika-stimulierte DZ unabhängig von der Bakterienvitalität ist. Unsere Ergebnisse widersprechen dieser Hypothese, da wir einen erhöhten Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ und einen Anstieg in der Zytokinproduktion nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Vergleich zu inaktivierten feststellten. Daraus ergibt sich die Frage, welche bakterielle Komponenten diesen Unterschied erklären könnten und ob die gleichen Substanzen oder Strukturen für die stammspezifische Wirkung von Probiotika auf DZ verantwortlich sind. Bei gram-positiven Keimen besteht die Bakterienwand aus einer massiven Schicht von Peptidoglykan (bei gram-negativen Bakterien ist diese Schicht sehr dünn) und Lipoteichonsäure, welche den TLR2 Ligand darstellt. Die Aktivierung einer Signalkaskade über diesen Rezeptor könnte stammabhängig stattfinden, erklärt jedoch nicht den Unterschied zwischen der Wirkung UV-inaktivierter und lebender Probiotika. Es wurde gezeigt, dass bakterielle DNA, welche CpG Motive enthält, die IL-10 Produktion von PBMZ¹⁷¹ induzieren kann. Dieser Mechanismus ist jedoch von der Bakterienvitalität unabhängig. Wir vermuten, dass lebende Probiotika lösliche Faktoren produzieren und damit sowohl die DZ-Maturation als auch die Polarisation von naiven T-Zellen beeinflussen können. Diese Hypothese wurde vor kurzem durch die festgestellte modulierende Wirkung vom Kulturüberstand des *Bifidobacterium brevis* auf DZ bestätigt¹⁷². Dabei induzierte der aufkonzentrierte und lyophilisierte Überstand die Maturation und IL-10 Synthese der DZ und verlängerte die Überlebenszeit der Zellen durch die Aktivierung von TLR2. Es wurde nicht untersucht, welche Substanzen dabei eine Rolle spielen könnten.

5.2.3 Tolerogene Wirkung der Probiotika

Die Effekte von lebenden Probiotika auf die Maturation und Zytokinproduktion von DZ wurden von mehreren Autoren beschrieben. Dabei zeigten nur wenige Stämme unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. 1000 Bakterien pro DZ und 72 h Stimulation, eine Th1-polarisierende Wirkung¹⁷⁰. Zahlreiche Untersuchungen bestätigten, dass die Stimulation von DZ mit lebenden probiotischen Bakterien zur Induktion der für die mukosale Homeostase wichtigen regulatorischen Antworten führte^{161;169;173-176}. Dabei spielte IL-10, welches vor allem von DZ sezerniert wurde, eine entscheidende Rolle, nämlich die Unterstützung der Entwicklung von TGF- β produzierenden T-Zellen⁴⁶. Die Produktion von beiden regulatorischen Zytokinen, IL-10 und TGF- β , erklärt vermutlich die in klinischen Studien beobachteten protektiven Effekte von Probiotika.

Unsere Ergebnisse bezüglich den tolerogenen Eigenschaften von Probiotika sind nur bedingt mit den erwähnten Untersuchungen vergleichbar. Erstens, handelt es sich dabei um

unterschiedliche Bakterienstämme und Konzentrationen mit verschiedenen Kultivierungs-, Aufbewahrungsbedingungen und Zählmethoden. Zweitens, wurden immature DZ entweder aus humanen Monozyten oder dem Knochenmark der Maus nach verschiedenen Protokollen generiert und anschließend mit Bakterien pur oder in Kombination mit IL-1 β und TNF- α stimuliert. Und drittens, wurden in allen benannten Arbeiten die T-Zell-Antworten untersucht, um das polarisierende Zytokinmuster von DZ bestätigen zu können.

In unseren Versuchen bestand die Schwierigkeit, die Ergebnisse zu interpretieren, da DZ parallel zu IL-10 auch andere Zytokine und Chemokine produzierten. Deswegen wurde das IL-10/IL-12 Verhältnis als Maß für die tolerogene Wirkung von UV-inaktivierten und lebenden Probiotika in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Wir stellten fest, dass dieses Verhältnis höher bei der Stimulation mit lebenden Keimen (mit Ausnahme von LA-5) im Vergleich zu inaktivierten Bakterien und außerdem dosisabhängig war. Nach Stimulation mit lebenden LGG im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 zeigten DZ die stärksten tolerogenen Effekte, welche mit einer verminderten Anzahl von CD83-positiven Zellen verbunden waren. Damit besaß LGG in dieser Konzentration die höchste Potenz, die Proliferation von regulatorischen T-Zellen zu induzieren⁹³.

Zum Schluss sollte erwähnt werden, dass aus Monozyten generierte DZ ein sensitives Screeningmodell für die Untersuchung der Wirkung von Probiotika darstellen¹⁷⁷. Jedoch werden oft Modelle, welche die Darmmukosa imitieren, bevorzugt⁴⁹, da sie der Situation *in vivo* mit den zahlreichen Mikromilieufaktoren näher kommen. Die mukosale Subpopulation von DZ in GIT besteht vor allem aus myeloiden (monozytäre Herkunft) Zellen. Aus diesem Grund und ferner wegen des einfacheren Handlings entschieden wir uns für die Generierung von DZ aus peripheren Monozyten.

Zu den Vorteilen dieser Arbeit gehören die hohe Anzahl der untersuchten probiotischen Stämme und die präzise Quantifizierung der Bakterien.

5.3 Ausblick: weitere geplante Untersuchungen

Unsere Ergebnisse sollen geprüft und vervollständigt werden, um die Wirkungsmechanismen der Probiotika besser verstehen zu können. Die weiteren Untersuchungen sind geplant, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Resultieren die Veränderungen der DZ uner dem Einfluss von UV-inaktivierten und lebenden probiotischen Bakterien wirklich immer in unterschiedlichen T-Zell-Antworten?

2. Was sind die spezifischen intrazellulären Signaltransduktionswege, die bei DZ nach Stimulation mit Probiotika in verschiedenen Konzentrationen an- bzw. abgeschaltet werden?
3. Wie würde sich die gleichzeitige Anwesenheit von kommensalen bzw. pathogenen Darmbakterien und Probiotika auf die Signalgebung dendritischer Zellen auswirken?
4. Womit sind die Unterschiede in der Wirkung UV-inaktivierter und lebender Probiotika und die stammspezifische Effekte zu erklären?
4. Führt die Stimulation von mukosalen DZ mit ausgewählten UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Vergleich zu den Versuchen mit aus Monozyten generierten DZ zu den unterschiedlichen Ergebnissen?

6. ZUSAMMENFASSUNG

Probiotika sind nicht-pathogene lebende Mikroorganismen, die mit der Nahrung aufgenommen werden und positive Effekte auf die Gesundheit des Wirtes ausüben sollen. Bekannte Vertreter sind Laktobazillen und Bifidobakterien. Es wird angenommen, dass bestimmte probiotische Stämme zur Prävention und Therapie allergischer Erkrankungen beitragen. Die Ergebnisse der zahlreichen experimentellen und klinischen Studien sind kontrovers und der genaue Wirkungsmechanismus der Probiotika ist bis heute nicht bekannt. Dendritische Zellen (DZ) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und initiieren adaptive Immunantworten. Sie treten u. a. in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes mit Pathogenen bzw. Antigenen in Kontakt und übersetzen die daraus abgeleitete Information in ein Signal, welches die Entwicklung naiver T-Zellen steuert. Wesentliche messbare Komponenten des Signals sind die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle und die Synthese von Zytokinen bzw. Chemokinen. Abhängig von der Zusammensetzung dieser Signalkomponenten erwerben T-Zellen unterschiedliche Effektorfunktionen, z. B. Inflammation oder Toleranz.

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass definierte probiotische Bakterienstämme Komponenten der Signalgebung von DZ unterschiedlich modulieren. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Laktobazillen- (LGG, LA-2, LA-5, LR, LC-01) und Bifidobakterienstämme (Bf. 420, BB-12, BB-46) mit UV-Licht inaktiviert und mittels DAPI-Färbung ausgezählt. Anschließend wurden sie mit immaturren DZ, die aus Monozyten gesunder Spender generierten wurden, im Verhältnis 1-1000:1 für 24 h koinkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden immature DZ mit lebenden Bakterien stimuliert. Dabei wurde die Zahl und die Vitalität der Probiotika mit dem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit ermittelt. Nach bakterieller Stimulation wurden DZ durchflusszytometrisch analysiert und zehn verschiedene Zytokine und Chemokine in den Zellkulturüberständen mittels Bio-Plex quantifiziert. Die durchflusszytometrischen Daten und die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen wurden auf die in den Stimulationsansätzen verwendete Positivkontrolle, LPS, normalisiert.

Wir stellten fest, dass UV-inaktivierte LGG, LR, BB-12, LA-5 und LA-2 die Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR in allen Konzentrationen induzierten. Dagegen wirkten Bf. 420 nur im Verhältnis Bakterien pro DZ = 100:1. Probiotika BB-46 und LC-01 konnten keine DZ-Maturation hervorrufen. Das Zytokinmuster zeigte dosisabhängig eine Th1-Antwort mit regulatorischen Komponenten. Nach Stimulation mit lebenden Bakterien wurden ein erhöhter Prozentsatz Maturationsmarker exprimierender DZ

und eine höhere Sekretion der meisten gemessenen Zytokine festgestellt. Dabei maturierten DZ auch unter Bf. 420 und LC-01 vollständig. Darüber hinaus veränderte sich das Zytokinmuster in Richtung einer gemischten Th1/Th2-Antwort.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass UV-inaktivierte und lebende probiotische Bakterien den Phänotyp und Funktionen von DZ unterschiedlich modulieren. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen DZ-abhängigen Signale auch in unterschiedlichen T-Zell-Antworten resultieren. Weiter muss geprüft werden, wie sich die gleichzeitige Anwesenheit verschiedener Bakterienspezies, wie sie in der normalen Darmflora vorkommen, auf die Signalgebung dendritischer Zellen auswirkt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Fuller,R. 1989. Probiotics in man and animals. *J.Appl.Bacteriol.* 66:365-378.
2. Reid,G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. *Appl.Environ.Microbiol.* 65:3763-3766.
3. Collins,M.D. and G.R.Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am.J.Clin.Nutr.* 69:1052S-1057S.
4. Howell,T.H. 1988. Metchnikoff and prolongation of life. *Age Ageing* 17:420-421.
5. Klein,G., A.Pack, C.Bonaparte, and G.Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int.J.Food Microbiol.* 41:103-125.
6. Senesi,S., F.Celandroni, A.Tavanti, and E.Ghelardi. 2001. Molecular characterization and identification of Bacillus clausii Strains marketed for use in oral bacteriotherapy. *Appl.Environ.Microbiol.* 67:834-839.
7. McFarland,L.V., C.M.Surawicz, R.N.Greenberg, R.Fekety, G.W.Elmer, K.A.Moyer, S.A.Melcher, K.E.Bowen, J.L.Cox, Z.Noorani, and . 1994. A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease. *JAMA* 271:1913-1918.
8. Parvez,S., K.A.Malik, K.S.Ah, and H.Y.Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J.Appl.Microbiol.* 100:1171-1185.
9. O'Sullivan,D.J. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J.Agric.Food Chem.* 49:1751-1760.
10. Marteau,P.R., M.de Vrese, C.J.Cellier, and J.Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am.J.Clin.Nutr.* 73:430S-436S.
11. Szajewska,H., M.Kotowska, J.Z.Mrukowicz, M.Armanska, and W.Mikolajczyk. 2001. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J.Pediatr.* 138:361-365.
12. Guandalini,S., L.Pensabene, M.A.Zikri, J.A.Dias, L.G.Casali, H.Hoekstra, S.Kolacek, K.Massar, D.Micetic-Turk, A.Papadopoulou, J.S.de Sousa, B.Sandhu, H.Szajewska, and Z.Weizman. 2000. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 30:54-60.
13. Armuzzi,A., F.Cremonini, F.Bartolozzi, F.Canducci, M.Candelli, V.Ojetti, G.Cammarota, M.Anti, A.De Lorenzo, P.Pola, G.Gasbarrini, and A.Gasbarrini. 2001. The effect of oral administration of Lactobacillus GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during Helicobacter pylori eradication therapy. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 15:163-169.
14. Gorbach,S.L., T.W.Chang, and B.Goldin. 1987. Successful treatment of relapsing Clostridium difficile colitis with Lactobacillus GG. *Lancet* 2:1519.
15. Guslandi,M., G.Mezzi, M.Sorghi, and P.A.Testoni. 2000. Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig.Dis.Sci.* 45:1462-1464.

16. Kruis,W., E.Schutz, P.Fric, B.Fixa, G.Judmaier, and M.Stolte. 1997. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 11:853-858.
17. Gionchetti,P., F.Rizzello, A.Venturi, P.Brigidi, D.Matteuzzi, G.Bazzocchi, G.Poggioli, M.Miglioli, and M.Campieri. 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119:305-309.
18. Gionchetti,P., F.Rizzello, U.Helwig, A.Venturi, K.M.Lammers, P.Brigidi, B.Vitali, G.Poggioli, M.Miglioli, and M.Campieri. 2003. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124:1202-1209.
19. Canducci,F., A.Armuzzi, F.Cremonini, G.Cammarota, F.Bartolozzi, P.Pola, G.Gasbarrini, and A.Gasbarrini. 2000. A lyophilized and inactivated culture of Lactobacillus acidophilus increases Helicobacter pylori eradication rates. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 14:1625-1629.
20. Goldin,B.R., L.J.Gualtieri, and R.P.Moore. 1996. The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr.Cancer* 25:197-204.
21. Ouwehand,A.C., S.Salminen, and E.Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:279-289.
22. de Vrese,M., P.Winkler, P.Rautenberg, T.Harder, C.Noah, C.Laue, S.Ott, J.Hampe, S.Schreiber, K.Heller, and J.Schrezenmeir. 2005. Effect of Lactobacillus gasseri PA 16/8, Bifidobacterium longum SP 07/3, B. bifidum MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clin.Nutr.* 24:481-491.
23. Turchet,P., M.Laurenzano, S.Auboiron, and J.M.Antoine. 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J.Nutr.Health Aging* 7:75-77.
24. Goldin,B.R. and S.L.Gorbach. 2008. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin.Infect.Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
25. Strachan,D.P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299:1259-1260.
26. Rautava,S., O.Ruuskanen, A.Ouwehand, S.Salminen, and E.Isolauri. 2004. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 38:378-388.
27. Shaternikov,V.A., I.D.Kuvaeva, K.S.Ladodo, N.G.Orlova, and O.L.Veselova. 1982. [General and local humoral immunity and intestinal microflora in children with skin manifestations of food allergy]. *Vopr.Pitan.*51-56.
28. Bjorksten,B., E.Sepp, K.Julge, T.Voor, and M.Mikelsaar. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108:516-520.

29. Kalliomaki,M., S.Salminen, H.Arvilommi, P.Kero, P.Koskinen, and E.Isolauri. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079.
30. Kalliomaki,M., S.Salminen, T.Poussa, H.Arvilommi, and E.Isolauri. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361:1869-1871.
31. Kalliomaki,M., S.Salminen, T.Poussa, and E.Isolauri. 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119:1019-1021.
32. Taylor,A.L., J.A.Dunstan, and S.L.Prescott. 2007. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119:184-191.
33. Kukkonen,K., E.Savilahti, T.Haahtela, K.Juntunen-Backman, R.Korpela, T.Poussa, T.Tuure, and M.Kuitunen. 2007. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119:192-198.
34. Abrahamsson,T.R., T.Jakobsson, M.F.Bottcher, M.Fredrikson, M.C.Jenmalm, B.Bjorksten, and G.Oldaesus. 2007. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119:1174-1180.
35. Kopp,M.V., I.Hennemuth, A.Heinzmann, and R.Urbaneck. 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation. *Pediatrics* 121:e850-e856.
36. Majamaa,H. and E.Isolauri. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 99:179-185.
37. Isolauri,E., T.Arvola, Y.Sutas, E.Moilanen, and S.Salminen. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin.Exp.Allergy* 30:1604-1610.
38. Rosenfeldt,V., E.Benfeldt, S.D.Nielsen, K.F.Michaelsen, D.L.Jeppesen, N.H.Valerius, and A.Paerregaard. 2003. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111:389-395.
39. Weston,S., A.Halbert, P.Richmond, and S.L.Prescott. 2005. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch.Dis.Child* 90:892-897.
40. Helin,T., S.Haahtela, and T.Haahtela. 2002. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, Lactobacillus rhamnosus (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57:243-246.
41. Ivory,K., S.J.Chambers, C.Pin, E.Prieto, J.L.Arques, and C.Nicoletti. 2008. Oral delivery of Lactobacillus casei Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin.Exp.Allergy* 38:1282-1289.

42. Peng,G.C. and C.H.Hsu. 2005. The efficacy and safety of heat-killed *Lactobacillus paracasei* for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatr.Allergy Immunol.* 16:433-438.
43. Kirjavainen,P.V., S.J.Salminen, and E.Isolauri. 2003. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 36:223-227.
44. Penders,J., E.E.Stobberingh, P.A.van den Brandt, and C.Thijs. 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 62:1223-1236.
45. Prescott,S.L. and B.Bjorksten. 2007. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 120:255-262.
46. Boirivant,M. and W.Strober. 2007. The mechanism of action of probiotics. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 23:679-692.
47. Marco,M.L., S.Pavan, and M.Kleerebezem. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr.Opin.Biotechnol.* 17:204-210.
48. Agostoni,C., I.Axelsson, C.Braegger, O.Goulet, B.Koletzko, K.F.Michaelsen, J.Rigo, R.Shamir, H.Szajewska, D.Turck, and L.T.Weaver. 2004. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 38:365-374.
49. Delcenserie,V., D.Martel, M.Lamoureux, J.Amiot, Y.Boutin, and D.Roy. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr.Issues Mol.Biol.* 10:37-54.
50. Janeway,C.A. Jr. 2005. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th edition. Garland Science Publishing.
51. Banchereau,J. and R.M.Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
52. Steinman,R.M. and Z.A.Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp.Med.* 137:1142-1162.
53. Langerhans,P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch [A]* 44: 325-337.
54. Schuler,G. and R.M.Steinman. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J.Exp.Med.* 161:526-546.
55. Inaba,K., M.Inaba, M.Deguchi, K.Hagi, R.Yasumizu, S.Ikehara, S.Muramatsu, and R.M.Steinman. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:3038-3042.
56. Steinman,R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9:271-296.

57. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
58. MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D. N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512-4520.
59. de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:289-307.
60. Inaba, K., R. M. Steinman, M. W. Pack, H. Aya, M. Inaba, T. Sudo, S. Wolpe, and G. Schuler. 1992. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175:1157-1167.
61. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.
62. Reid, C. D., A. Stackpoole, A. Meager, and J. Tikerpae. 1992. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.* 149:2681-2688.
63. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.
64. Jansen, J. H., G. J. Wientjens, W. E. Fibbe, R. Willemze, and H. C. Kluin-Nelemans. 1989. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 170:577-582.
65. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.
66. Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83-93.
67. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10-16.
68. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400.
69. Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541-548.

70. Reis e Sousa, P.D.Stahl, and J.M.Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J.Exp.Med.* 178:509-519.
71. Reis e Sousa, A.Sher, and P.Kaye. 1999. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr.Opin.Immunol.* 11:392-399.
72. Jullien,D., S.Stenger, W.A.Ernst, and R.L.Modlin. 1997. CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells. *J.Clin.Invest* 99:2071-2074.
73. Porcelli,S.A. and R.L.Modlin. 1995. CD1 and the expanding universe of T cell antigens. *J.Immunol.* 155:3709-3710.
74. Romani,N., D.Reider, M.Heuer, S.Ebner, E.Kampgen, B.Eibl, D.Niederwieser, and G.Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J.Immunol.Methods* 196:137-151.
75. Zhou,L.J. and T.F.Tedder. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J.Immunol.* 154:3821-3835.
76. Zlotnik,A. and O.Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127.
77. Lebre,M.C., T.Burwell, P.L.Vieira, J.Lora, A.J.Coyle, M.L.Kapsenberg, B.E.Clausen, and E.C.de Jong. 2005. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol.Cell Biol.* 83:525-535.
78. Reis e Sousa. 2001. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity.* 14:495-498.
79. Medzhitov,R. and C.Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *N.Engl.J.Med.* 343:338-344.
80. Medzhitov,R. and C.A.Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
81. Medzhitov,R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 1:135-145.
82. Takeda,K., T.Kaisho, and S.Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
83. Gordon,S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
84. Creagh,E.M. and L.A.O'Neill. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27:352-357.
85. Sato,K., X.L.Yang, T.Yudate, J.S.Chung, J.Wu, K.Luby-Phelps, R.P.Kimberly, D.Underhill, P.D.Cruz, Jr., and K.Ariizumi. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J.Biol.Chem.* 281:38854-38866.

86. Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat.Rev.Immunol.* 3:984-993.
87. O'Hagan, D.T. and N.M.Valiante. 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2:727-735.
88. Kalinski, P., C.M.Hilkens, E.A.Wierenga, and M.L.Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20:561-567.
89. Schulz, O., A.D.Edwards, M.Schito, J.Aliberti, S.Manickasingham, A.Sher, and Reis e Sousa. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 13:453-462.
90. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3:133-146.
91. Hilkens, C.M., P.Kalinski, M.de Boer, and M.L.Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90:1920-1926.
92. Trinchieri, G., S.Pflanz, and R.A.Kastelein. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 19:641-644.
93. Smits, H.H., E.C.de Jong, E.A.Wierenga, and M.L.Kapsenberg. 2005. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 26:123-129.
94. Vukmanovic-Stejic, M., B.Vyas, P.Gorak-Stolinska, A.Noble, and D.M.Kemeny. 2000. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 95:231-240.
95. Abbas, A.K., K.M.Murphy, and A.Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.
96. Farrar, J.D., H.Asnagli, and K.M.Murphy. 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J.Clin.Invest* 109:431-435.
97. Romagnani, S. 2004. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:395-400.
98. Bluestone, J.A. and A.K.Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 3:253-257.
99. Groux, H., A.O'Garra, M.Bigler, M.Rouleau, S.Antonenko, J.E.de Vries, and M.G.Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
100. Chen, Y., V.K.Kuchroo, J.Inobe, D.A.Hafler, and H.L.Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
101. Shevach, E.M. 2000. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr.Biol.* 10:R572-R575.

102. Bettelli,E., Y.Carrier, W.Gao, T.Korn, T.B.Strom, M.Oukka, H.L.Weiner, and V.K.Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
103. Reis e Sousa, A.D.Edwards, S.P.Manickasingham, and O.Schulz. 2001. Conditioning of dendritic cells by pathogen-derived stimuli. *Immunobiology* 204:595-597.
104. Murphy,K.M. and S.L.Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2:933-944.
105. Delves,P.J. and I.M.Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:37-49.
106. Fanaro,S., R.Chierici, P.Guerrini, and V.Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.Suppl* 91:48-55.
107. Berg,R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
108. Eckburg,P.B., E.M.Bik, C.N.Bernstein, E.Purdom, L.Dethlefsen, M.Sargent, S.R.Gill, K.E.Nelson, and D.A.Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
109. Hart,A.L., A.J.Stagg, M.Frame, H.Graffner, H.Glise, P.Falk, and M.A.Kamm. 2002. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 16:1383-1393.
110. Rastall,R.A. 2004. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J.Nutr.* 134:2022S-2026S.
111. Guarner,F. and J.R.Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
112. Sansonetti,P.J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat.Rev.Immunol.* 4:953-964.
113. Artis,D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat.Rev.Immunol.* 8:411-420.
114. Shen,L. and J.R.Turner. 2006. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 290:G577-G582.
115. Neutra,M.R. 1999. M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 236:17-32.
116. Rescigno,M., M.Urbano, B.Valzasina, M.Francolini, G.Rotta, R.Bonasio, F.Granucci, J.P.Kraehenbuhl, and P.Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* 2:361-367.
117. Niess,J.H., S.Brand, X.Gu, L.Landsman, S.Jung, B.A.McCormick, J.M.Vyas, M.Boes, H.L.Ploegh, J.G.Fox, D.R.Littman, and H.C.Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated

- dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
118. Kagnoff, M.F. and L.Eckmann. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J.Clin.Invest* 100:6-10.
119. Pickard, K.M., A.R.Bremner, J.N.Gordon, and T.T.MacDonald. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 18:271-285.
120. Isolauri, E., J.Joensuu, H.Suomalainen, M.Luomala, and T.Vesikari. 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13:310-312.
121. Link-Amster, H., F.Rochat, K.Y.Saudan, O.Mignot, and J.M.Aeschlimann. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 10:55-63.
122. Haller, D., C.Bode, W.P.Hammes, A.M.Pfeifer, E.J.Schiffrin, and S.Blum. 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47:79-87.
123. Tien, M.T., S.E.Girardin, B.Regnault, L.Le Bourhis, M.A.Dillies, J.Y.Coppee, R.Bourdet-Sicard, P.J.Sansonetti, and T.Pedron. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J.Immunol.* 176:1228-1237.
124. Perdigon, G., M.E.de Macias, S.Alvarez, G.Oliver, and A.P.Ruiz Holgado. 1988. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 63:17-23.
125. Schiffrin, E.J., D.Brassart, A.L.Servin, F.Rochat, and A.Donnet-Hughes. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am.J.Clin.Nutr.* 66:515S-520S.
126. Takeda, K., T.Suzuki, S.I.Shimada, K.Shida, M.Nanno, and K.Okumura. 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin.Exp.Immunol.* 146:109-115.
127. Dev, S., H.Mizuguchi, A.K.Das, C.Matsushita, K.Maeyama, H.Umehara, T.Ohtoshi, J.Kojima, K.Nishida, K.Takahashi, and H.Fukui. 2008. Suppression of histamine signaling by probiotic Lac-B: a possible mechanism of its anti-allergic effect. *J.Pharmacol.Sci.* 107:159-166.
128. Pochard, P., P.Gosset, C.Grangette, C.Andre, A.B.Tonnel, J.Pestel, and A.Mercenier. 2002. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110:617-623.
129. Chuang, L., K.G.Wu, C.Pai, P.S.Hsieh, J.J.Tsai, J.H.Yen, and M.Y.Lin. 2007. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J.Agric.Food Chem.* 55:11080-11086.

130. Prioult,G., I.Fliss, and S.Pecquet. 2003. Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 10:787-792.
131. von der,W.T., C.Bulliard, and E.J.Schiffrin. 2001. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 8:695-701.
132. Peluso,I., D.Fina, R.Caruso, C.Stolfi, F.Caprioli, M.C.Fantini, G.Caspani, E.Grossi, L.Di Iorio, F.M.Paone, F.Pallone, and G.Monte Leone. 2007. Lactobacillus paracasei subsp. paracasei B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect.Immun.* 75:1730-1737.
133. Blumer,N., S.Sel, S.Virna, C.C.Patrascan, S.Zimmermann, U.Herz, H.Renz, and H.Garn. 2007. Perinatal maternal application of Lactobacillus rhamnosus GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin.Exp.Allergy* 37:348-357.
134. Feleszko,W., J.Jaworska, R.D.Rha, S.Steinhausen, A.Avagyan, A.Jaudszus, B.Ahrens, D.A.Groneberg, U.Wahn, and E.Hamelmann. 2007. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin.Exp.Allergy* 37:498-505.
135. Kopp,M.V., M.Goldstein, A.Dietschek, J.Sofke, A.Heinzmann, and R.Urbanek. 2008. Lactobacillus GG has in vitro effects on enhanced interleukin-10 and interferon-gamma release of mononuclear cells but no in vivo effects in supplemented mothers and their neonates. *Clin.Exp.Allergy* 38:602-610.
136. Rakoff-Nahoum,S., J.Paglino, F.Eslami-Varzaneh, S.Edberg, and R.Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-241.
137. Coombes,J.L. and F.Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat.Rev.Immunol.* 8:435-446.
138. Rescigno,M. and G.Matteoli. 2008. Lamina propria dendritic cells: for whom the bell TOLLs? *Eur.J.Immunol.* 38:1483-1486.
139. Bennett,W.E. and Z.A.Cohn. 1966. The isolation and selected properties of blood monocytes. *J.Exp.Med.* 123:145-160.
140. Thurner,B., C.Roder, D.Dieckmann, M.Heuer, M.Kruse, A.Glaser, P.Keikavoussi, E.Kampgen, A.Bender, and G.Schuler. 1999. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J.Immunol.Methods* 223:1-15.
141. Kapuscinski,J. and B.Skoczylas. 1977. Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay. *Anal.Biochem.* 83:252-257.
142. Porter,K and Y.Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25(5):943-948.

143. Jonuleit,H., U.Kuhn, G.Muller, K.Steinbrink, L.Paragnik, E.Schmitt, J.Knop, and A.H.Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur.J.Immunol.* 27:3135-3142.
144. Leuko,S., A.Legat, S.Fendrihan, and H.Stan-Lotter. 2004. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. *Appl.Environ.Microbiol.* 70:6884-6886.
145. Carson,R.T. and D.A.Vignali. 1999. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J.Immunol.Methods* 227:41-52.
146. Prabhakar,U., E.Eirikis, and H.M.Davis. 2002. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *J.Immunol.Methods* 260:207-218.
147. de Jager,W., V.H.te, B.J.Prakken, W.Kuis, and G.T.Rijkers. 2003. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 10:133-139.
148. Baud,M. 1993. Data analysis, mathematical modeling in *Methods of Immunological Analysis Volume 1: Fundamentals* (Masseyeff R.F. et al., eds): 656-671, VCH Publishers, Inc., New York, NY
149. Cella,M., M.Salio, Y.Sakakibara, H.Langens, I.Julkunen, and A.Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J.Exp.Med.* 189:821-829.
150. Rouas,R., P.Lewalle, F.El Ouriaghli, B.Nowak, H.Duvillier, and P.Martiat. 2004. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *Int.Immunol.* 16:767-773.
151. Verdijk,R.M., T.Mutis, B.Esendam, J.Kamp, C.J.Melief, A.Brand, and E.Goulmy. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J.Immunol.* 163:57-61.
152. Weyrich,A.S., M.R.Elstad, R.P.McEver, T.M.McIntyre, K.L.Moore, J.H.Morrissey, S.M.Prescott, and G.A.Zimmerman. 1996. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J.Clin.Invest* 97:1525-1534.
153. Meyer-Wentrup,F. and S.Burdach. 2003. Efficacy of dendritic cell generation for clinical use: recovery and purity of monocytes and mature dendritic cells after immunomagnetic sorting or adherence selection of CD14+ starting populations. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 12:289-299.
154. de Almeida,M.C., A.C.Silva, A.Barral, and N.M.Barral. 2000. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 95:221-223.
155. Zobywalski,A., M.Javorovic, B.Frankenberger, H.Pohla, E.Kremmer, I.Bigalke, and D.J.Schendel. 2007. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J.Transl.Med.* 5:18.

156. Pickl, W.F., O.Majdic, P.Kohl, J.Stockl, E.Riedl, C.Scheinecker, C.Bello-Fernandez, and W.Knapp. 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J.Immunol.* 157:3850-3859.
157. Braat, H., E.C.de Jong, J.M.van den Brande, M.L.Kapsenberg, M.P.Peppelenbosch, E.A.van Tol, and S.J.Van Deventer. 2004. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J.Mol.Med.* 82:197-205.
158. Kim, C.H. 2004. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* 4:343-361.
159. Smits, H.H., A.J.van Beelen, C.Hessle, R.Westland, E.de Jong, E.Soeteman, A.Wold, E.A.Wierenga, and M.L.Kapsenberg. 2004. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur.J.Immunol.* 34:1371-1380.
160. Niers, L.E., H.M.Timmerman, G.T.Rijkers, G.M.van Bleek, N.O.van Uden, E.F.Knol, M.L.Kapsenberg, J.L.Kimpen, and M.O.Hoekstra. 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin.Exp.Allergy* 35:1481-1489.
161. Smits, H.H., A.Engering, K.D.van der, E.C.de Jong, K.Schipper, T.M.van Capel, B.A.Zaat, M.Yazdanbakhsh, E.A.Wierenga, Y.van Kooyk, and M.L.Kapsenberg. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115:1260-1267.
162. Christensen, H.R., H.Frokiaer, and J.J.Pestka. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J.Immunol.* 168:171-178.
163. Zeuthen, L.H., H.R.Christensen, and H.Frokiaer. 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin.Vaccine Immunol.* 13:365-375.
164. Lahtinen, S.J., M.Gueimonde, A.C.Ouwehand, J.P.Reinikainen, and S.J.Salminen. 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol.* 23:571-577.
165. Karlsson, H., P.Larsson, A.E.Wold, and A.Rudin. 2004. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect.Immun.* 72:2671-2678.
166. Madsen, K. 2006. Probiotics and the immune response. *J.Clin.Gastroenterol.* 40:232-234.
167. Young, S.L., M.A.Simon, M.A.Baird, G.W.Tannock, R.Bibiloni, K.Spencely, J.M.Lane, P.Fitzharris, J.Crane, I.Town, E.Addo-Yobo, C.S.Murray, and A.Woodcock. 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell

- surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 11:686-690.
168. Veckman,V., M.Miettinen, J.Pirhonen, J.Siren, S.Matikainen, and I.Julkunen. 2004. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 75:764-771.
 169. Baba,N., S.Samson, R.Bourdet-Sicard, M.Rubio, and M.Sarfati. 2008. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J.Leukoc.Biol.* 84:468-476.
 170. Mohamadzadeh,M., S.Olson, W.V.Kalina, G.Ruthel, G.L.Demmin, K.L.Warfield, S.Bavari, and T.R.Klaenhammer. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:2880-2885.
 171. Lammers,K.M., P.Brigidi, B.Vitali, P.Gionchetti, F.Rizzello, E.Caramelli, D.Matteuzzi, and M.Campieri. 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 38:165-172.
 172. Hoarau,C., C.Lagaraine, L.Martin, F.Velge-Roussel, and Y.Lebranchu. 2006. Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:696-702.
 173. Braat,H., B.J.van den, E.van Tol, D.Hommes, M.Peppelenbosch, and S.van Deventer. 2004. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am.J.Clin.Nutr.* 80:1618-1625.
 174. Foligne,B., G.Zoumpopoulou, J.Dewulf, A.Ben Younes, F.Chareyre, J.C.Sirard, B.Pot, and C.Grangette. 2007. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS.ONE.* 2:e313.
 175. Drakes,M., T.Blanchard, and S.Czinn. 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect.Immun.* 72:3299-3309.
 176. Hart,A.L., K.Lammers, P.Brigidi, B.Vitali, F.Rizzello, P.Gionchetti, M.Campieri, M.A.Kamm, S.C.Knight, and A.J.Stagg. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53:1602-1609.
 177. Fink,L.N., L.H.Zeuthen, G.Ferlazzo, and H.Frokiaer. 2007. Human antigen-presenting cells respond differently to gut-derived probiotic bacteria but mediate similar strain-dependent NK and T cell activation. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 51:535-546.

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
APZ	antigenpräsentierende Zellen
ATCC	American Type Culture Collection
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CXCL	CXC chemokine ligand
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit(s) (koloniebildende Einheiten)
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
DZ	dendritische Zellen
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	Fragment, crystallizable (Rezeptor)
g	Gramm
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	Hour(s) (Stunde(n))
IEC	intestinal epithelial cells
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin-
KDa	Kilodalton
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
μ g	Mikrogramm
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 beta
μ l	Mikroliter

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	ein Millimeter Quecksilbersäule
mM	Millimolar
MWU	Mann-Whitney- <i>U</i> Test
NK	natural killer (Zellen)
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PBMZ	periphere mononukleäre Blutzellen
pg	Pikogramm
PG E ₂	Prostaglandin E ₂
Poly (I:C)	doppelsträngige RNA (Polyriboinosinic polyribocytidylic acid)
PRRs	pattern recognition receptors
rcf	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
TCR	T-cell receptor
TLR	Toll-like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha

8.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.** Zusammenstellung der für die Zellkultur verwendeten Stimulantien
- Tabelle 2.** Zusammenstellung der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper
- Tabelle 3.** Verwendete Fluorochrome
- Tabelle 4.** 2-Farben Ansatz
- Tabelle 5.** 4-Farben Ansatz
- Tabelle 6.** DZ und Kontaminanten (in % der LPS-stimulierten Zellen)
- Tabelle 7.** Vergleich der Oberflächenmarker bei 2- bzw. 4-Farben Kombination (in % der unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen)
- Tabelle 8.** Zellsubpopulationen (in % der LPS-stimulierten Zellen) in den Versuchen mit UV-inaktivierten Probiotika
- Tabelle 9.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 10.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 11.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 12.** Der Vergleich Maturationsmarker exprimierender DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 50:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 13.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 14.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 15.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)

- Tabelle 16.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 17.** Der Vergleich der Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten BB-12 und Bf. 420 im Verhältnis Bakterien : DZ = 50:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 18.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 19.** Signifikante dosisabhängige Stimulationseffekte innerhalb eines UV-inaktivierten Probiotikastammes
- Tabelle 20.** Anzahl toter Probiotika (in % der Gesamtbakterienzahl) in den für die Stimulationsversuche verwendeten Bakteriensuspensionen
- Tabelle 21.** Zellsubpopulationen (in % der LPS-stimulierten Zellen) in den Versuchen mit lebenden Probiotika
- Tabelle 22.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 23.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 24.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 25.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterie : DZ = 1:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 26.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)
- Tabelle 27.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 100:1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Tabelle 28. Signifikante dosisabhängige Stimulationseffekte innerhalb eines lebenden Probiotikastammes

8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.** Die Polarisierung von T-Zellen benötigt drei DZ-vermittelte Signale (modifiziert nach O'Hagan, Valiante und Kapsenberg)
- Abbildung 2.** Das mukosale Immunsystem (nach D. Artis)
- Abbildung 3.** DAPI-gefärbte LGG
- Abbildung 4.** *Lactobacillus rhamnosus GG* (Vitalfärbung)
- Abbildung 5.** FCS/SSC Einstellungen für immature (links) und mature (rechts) DZ nach LPS-Stimulation
- Abbildung 6.** Isotyp-Kontrollen
- Abbildung 7.** Darstellung CD83- und CD1a-positiver Zellen
- Abbildung 8.** Darstellung CD86- und CD80-positiver Zellen
- Abbildung 9.** Darstellung CD14-negativer und CD40-positiver Zellen
- Abbildung 10.** Darstellung CD3-negativer und HLA-DR-positiver Zellen
- Abbildung 11.** 9-plex Assay vom 21.03.07, IL-12-Standardkurve (high PMT settings)
- Abbildung 12.** Charakteristische Morphologie von aus peripherem Blut isolierten Monozyten (A) und immaturren DZ (B) (Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung)
- Abbildung 13.** LPS-Stimulation: charakteristische Morphologie von maturaen DZ und kontaminierenden Lymphozyten (Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung)
- Abbildung 14.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1
- Abbildung 15.** CD86 exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1
- Abbildung 16.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1

- Abbildung 17.** Die TNF- α Produktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1000:1
- Abbildung 18.** Dosisabhängig CD40 exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten LA-5
- Abbildung 19.** Korrelationsmatrix (Stämme und Parameter) und hierarchisches Clustering der UV-inaktivierten Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1
- Abbildung 20.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1
- Abbildung 21.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1, 10:1 und 100:1
- Abbildung 22.** Korrelationsmatrix (Stämme und Parameter) und hierarchisches Clustering der lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1
- Abbildung 23.** Maturationsmarker exprimierende DZ (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 1:1 und 10:1
- Abbildung 24.** Das IL-10/IL-12 Ratio nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1
- Abbildung 25.** Zytokinproduktion (in % der Werte unter LPS-Maturation) nach Stimulation mit UV-inaktivierten und lebenden Probiotika im Verhältnis Bakterien : DZ = 10:1

8.4 Danksagung

Diese Arbeit ist ein Bestandteil des Vernetzungsprojektes „Allergien und Allergene“ des Helmholtz Zentrums München und wurde innerhalb der Klinischen Kooperationsgruppe „Immunregulation im Kindesalter“ (Leiter: Frau PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann) durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas, ihre kontinuierliche Unterstützung, Vorschläge bei der Planung von Versuchen, engagierte Betreuung und Hilfestellungen bei der Interpretation der Ergebnisse. Vielen Dank für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Veranstaltungen teilnehmen zu dürfen und meine Arbeit präsentieren zu können.

Bei Frau Prof. Dr. D.J. Schendel möchte ich mich für das Privileg, meine Arbeit im Rahmen der Kooperation zwischen dem Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München und dem Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, durchführen zu können, bedanken. Ihr stetiges Interesse an dem Thema, ihre Ratschläge und Diskussionen bei den gemeinsamen Treffen mit anderen Teilnehmern des Vernetzungsprojektes trugen zum Gelingen meiner Arbeit entscheidend bei.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit im Kubus – Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Herrn Prof. Dr. A. Hartmann und allen Kollegen der Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen, Helmholtz Zentrum München, möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen mit Probiotika danken. Mein besonderer Dank gilt Frau T. Binder für das Etablieren zahlreicher Methoden, viele fruchtbare Diskussionen und ihre allzeit freundliche Hilfestellung. Bei Frau K. Buddrus möchte ich mich für die Bereitstellung der UV-inaktivierten Bakterien bedanken.

Mein sehr persönlicher Dank gilt Frau Dr. biol. hum. A. Zobywalski für das Einarbeiten in die Methoden der Kultivierung und Stimulation der dendritischen Zellen, ihre stetige freundliche Unterstützung und Ratschläge, die Bereitstellung des Humanserums und der Stimulantien und für den emotionalen und wissenschaftlichen Beistand während der letzten Jahre.

Meiner ehemaligen Mitdotorandin Frau Dr. R. Shadid möchte ich für ihre freundliche Betreuung bei der Etablierung und Durchführung zahlreicher durchflusszytometrischer Versuche, die Einführung in Bio-Plex, ihre Hilfe bei diversen Fragestellungen meiner Arbeit und viele gemeinsamen Stunden im Labor danken.

Bei Frau R. Bernatowicz (Dotorandin und studentische Hilfskraft in der KKG) möchte ich mich für die Bereitstellung der lebenden Probiotika für die Stimulationsversuche bedanken.

Frau PD Dr. C. Falk (ehemalige Gruppenleiterin der Arbeitsgruppe „Immunregulation“, Institut für Molekulare Immunologie) und Frau B. Mosetter (BTA, Institut für Molekulare Immunologie) danke ich für die Unterstützung bei der Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen (Bio-Plex).

Herrn Dr. P. Pagel (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, Technische Universität München und Institut für Bioinformatik und Systembiologie/MIPS, Helmholtz Zentrum München) möchte ich für die Durchführung der Korrelationsanalysen und des hierarchisches Clusterings danken.

Meiner Mitdotorandin Frau S. Zimmermann danke ich für ihre Hilfe im Laboralltag und das Korrekturlesen. Meinen Kollegen der KKG „Immunregulation im Kindesalter“ und im Kubus möchte ich für die freundliche Atmosphäre und ihre Hilfe bei methodischen und immunologische Fragestellungen danken.

Bei meiner ehemaligen Betreuerin und guten Freundin Dr. rer. nat. A.-G. Lenz, Institut für Lungenbiologie, Helmholtz Zentrum München, möchte ich mich für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und tiefgreifende wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Meiner Familie und meinen Eltern möchte ich ganz besonderes für ihre Fürsorge, motivierende Gespräche, ihre Geduld und Verständnis und vor allem ihr Glauben an mich herzlichst danken.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anastasia Schneider, geb. Tchessalova
 Geburtsdatum: 23.04.1974
 Geburtsort: Moskau
 Familienstatus: verheiratet, 1 Kind (12 Jahre)
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Berufserfahrung

Seit 10/2008 Assistenzärztin, Department Klinische Chemie
 Städtisches Klinikum München GmbH

Akademische Ausbildung

09/2004 – 09/2008 Klinische Kooperationsgruppe (KKG) „Immunregulation im Kindesalter“, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Molekulare Immunologie, und Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU
 Anfertigung der Dissertation „Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Signalgebung dendritischer Zellen“

07/2006 Approbation als Ärztin

03/2003 – 07/2004 KKG „Immunregulation im Kindesalter“
 Forschungsprojekt „Molekulare Analyse von GM-CSF und der beta-Kette des GM-CSF/IL-3/IL-5 - Rezeptors bei pulmonalen Alveolarproteinosen“

1998 - 2002 Studium der Humanmedizin an der LMU
 08/2001 2. Staatsexamen
 10/2001 – 08/2002 Praktisches Jahr
 Anästhesiologie, Klinikum Großhadern
 Innere Medizin (Gastroenterologie, Onkologie),
 Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach
 Chirurgie, Krankenhaus Dritter Orden

12/2002 3. Staatsexamen

12/1995 - 1997 Wissenschaftliche Arbeit im Helmholtz Zentrum München, Institut für Inhalationsbiologie, und in der Asklepios Klinik, Gauting
 Forschungsprojekt „Expression von Zytokinen in den BAL-Zellen von Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen“

10/1995 – 09/1996 Gaststudentin an der medizinischen Fakultät der LMU
 Stipendium vom Bezirk Oberbayern

09/1990 – 09/1995 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen I. M. Setschenow-Akademie Moskau

Schulbildung

09/1980 – 06/1990

Allgemeinbildende Schule Nr. 914 in Moskau

Sprachkenntnisse

Deutsch	sehr gut
Englisch	fließend
Russisch	Muttersprache

8.6 Publikationen und Poster

A.-G. Lenz, A. Schneider, and K.L. Maier. **Expression of cytokine mRNA in a monocytic cell line upon incubation with sulphite and nitrite.** European Respiratory Society annual congress, Berlin, 1997

A.-G. Lenz, A. Schneider, H. Hinze, G. Beringer, K. Häußinger, S. Heindl, F. Stanzel, K.L. Maier. **Differential cytokine expression in bronchoalveolar lavage cells from patients with interstitial lung diseases.** European Respiratory Society annual congress, Geneva, 1998

A.-G. Lenz, H. Hinze-Heyn, A. Schneider, J. Behr, K. Häußinger, S. Heindl, F. Stanzel, K. L. Maier. **Influence of inflammatory mechanisms on the redox balance in interstitial lung diseases.** Respiratory Medicine 2004, 98:737-745

C. Prell, A. Schneider, D. Hartl, A. Hector, D. Reinhardt, T. Nicolai, M. GRIESE und S. Krauss-Etschmann. **mRNA Expression von PPAR-gamma und CD36 bei Kindern mit pulmonalen Alveolarproteinosen.** 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg, 2004, publiziert in: Atemwegs- und Lungenkrankheiten 2004, 30/3:141

A. Schneider, A. Zobywalski, K. Buddrus, T. Binder, R. Shadid, L. James, C. Falk, A. Hartmann, D.J. Schendel, S. Krauss-Etschmann. **Modulation of human dendritic cells by seven different probiotic strains.** 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, Paris 2006

A. Schneider, T. Binder, R. Bernatowicz, A. Zobywalski, C. Falk, A. Hartmann, D.J. Schendel, S. Krauss-Etschmann. **Modulation of human dendritic cells by UV-inactivated and live probiotic bacteria.** 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg 2007

R. Bernatowicz, T. Binder, A. Schneider, D.J. Schendel, A. Hartmann, S. Krauss-Etschmann. **Effects of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-sensing molecule N-3-Oxododecanoyl homoserine lactone on human dendritic cells.** Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), Vienna 2008