



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

In vitro Untersuchungen zum Einfluss von
Lactobacillus delbrueckii und *Lactobacillus rhamnosus* GG auf
das Immunsystem

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Verfasserin:	Mag. Petra Klein
Matrikel-Nummer:	0106272
Dissertationsgebiet:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	o. Univ.-Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa

Wien, im Juli 2009

DANKSAGUNG:

Zu allererst möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Ibrahim Elmadfa für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die Bereitstellung des Themas sowie der finanziellen Mittel ganz herzlich danken. Außerdem möchte ich mich für Ihre Geduld und Ihr stets offenes Ohr bei diversen Problemen besonders bedanken, ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nie entstanden:

شكراً لصبرك وحسن اشرافك...DANKE!

Ganz besonderen Dank gilt auch Hrn. Günter Siebenhaar und meinem Mann Tibor Klein für die zahlreichen Blutabnahmen am Institut und daheim am Küchentisch ☺...

Weiters möchte ich hier auch die tapferen „Blutopfer“ nennen, die mir immer wieder genügend Material für meine Versuche lieferten: Mag. Agnes Hertel, Dr. Petra Rust und Dr. Elisabeth Fabian. Vielen lieben Dank auch an euch für euren wichtigen „Beitrag“.

Danke auch an alle Kolleginnen und Kollegen des gesamten Instituts für Ernährungswissenschaften für die gute Zusammenarbeit. Speziell euch, liebe Elisabeth und liebe Doris, möchte ich für eure große Unterstützung und Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Meinem Mann Tibor Klein: *Nagyon szépen köszönök mindent!*

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERBLICK	3
2.1 Probiotika - geschichtlicher Hintergrund und Begriffserklärung	3
2.2 Der menschliche Darm und seine Mikroflora	5
2.2.1 Kolonisierung und Zusammensetzung der Mikroflora	5
2.2.2 Aufgaben und Funktionen der Mikroflora	6
2.3 Gesundheitsfördernde Wirkung von Lactobacillen	8
2.3.1 Lactobacillen in der Behandlung und Prävention von akuten Durchfallerkrankungen mit verschiedenen Ursachen	8
2.3.1.1 Akute Diarrhöe	9
2.3.1.2 Antibiotika - assoziierte Diarrhöe	10
2.3.1.3 Laktoseintoleranz	11
2.3.2 Lactobacillen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	12
2.3.3 Lactobacillen in der Behandlung und Prävention von allergischen Erkrankungen	14
2.3.4 Empfehlungen für die klinische Anwendung von Probiotika Juli 2008	16
2.4 Immunologische Mechanismen	18
2.4.1 Der Einfluss von probiotischen Mikroorganismen auf dendritische Zellen	18

2.4.2	Der Effekt von Lactobacillen auf PBMC	21
2.4.3	Crosstalk zwischen Darmbakterien und dem Immunsystem	22
2.4.3.1	Caco-2 Transwell-System als <i>in vitro</i> Modell für humane Enterozyten	23
2.4.3.2	Crosstalk zwischen probiotischen Bakterien, Darmmukosa und Immunsystem	24
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Bakterienkultur	26
3.2	Zellkultur	27
3.2.1	Caco-2	27
3.2.2	Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	29
3.2.2.1	Isolation von PBMC durch Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation	29
3.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und des Vitalitätsindex mittels Trypanblau	30
3.2.3	Dendritische Zellen	31
3.2.3.1	Monozytenisolation aus PBMC durch magnetische Beads	31
3.2.3.2	Differenzierung von Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen	32
3.2.4	Inkubation mit Lactobacillen	33
3.3	RT-PCR	34
3.3.1	RNA-Isolierung und Reverse-Transkriptase	34
3.3.2	PCR	37
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.4	Durchflusszytometrie	40
3.4.1	Überprüfung des Reifegrades von dendritischen Zellen	41
3.4.2	Cytometric Bead Array	43
3.5	Statistik	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Ergebnisse der Vorversuche	45
4.1.1	Caco-2 Differenzierungsmuster und Monolayerintegrität	45
4.1.2	Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen	47

4.2	Der Einfluss von <i>L. delbrueckii</i> und <i>L. rhamnosus GG</i> auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen	48
4.2.1	Veränderungen der Oberflächenmarker	48
4.2.1.1	Expression von CD14 und CD11c	49
4.2.1.2	Expression von CD80, CD83, CD86 und CD54	51
4.2.1.3	Expression von CD209	55
4.2.1.4	Expression von HLA-DR	56
4.2.2	Bakterieninduzierte Zytokinsekretion	57
4.2.2.1	IL-1 β , TNF- α , IL-12 und IFN- γ	58
4.2.2.2	IL-10	60
4.3	Der Einfluss von <i>L. delbrueckii</i> und <i>L. rhamnosus GG</i> auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen im Transwell-System	62
4.4	Bakterieninduzierte Zytokinsekretion von PBMC	64
4.4.1	IL-1 β , TNF- α , IL-12, INF- γ	64
4.4.2	IL-10	66
4.5	Transwell-System versus direkter Kontakt zwischen Lactobacillen und PBMC	67
5	DISKUSSION UND SCHLUSSBETRACHTUNG	70
5.1	Beeinflussung des Reifegrades dendritischer Zellen durch <i>L. delbrueckii</i> und <i>L. rhamnosus GG</i>	70
5.2	Effekte von Lactobacillen auf dendritische Zellen im Transwell-System	72
5.3	Lactobacillus induzierte Zytokinsekretion in PBMC	74
5.4	Direkte Inkubation mit Lactobacillen versus Transwell-System bei PBMC	75
5.5	Schlussbetrachtung	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	78

7	ABSTRACT	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS:

Abbildung 1: Bakteriendichte im Gastrointestinaltrakt.....	5
Abbildung 2: Immunsystem des Darms	22
Abbildung 3: Design der Experimente (1)	33
Abbildung 4: Design der Experimente (2)	34
Abbildung 5: Dot-Plot Diagramm von dendritischen Zellen.....	41
Abbildung 6: Sucrase-Isomaltase und GAPDH Expression in Caco-2 Zellen ...	45
Abbildung 7: Caco-2 TEER-Verlauf	46
Abbildung 8: Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen (1)	47
Abbildung 9: Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen (2)	48
Abbildung 10: CD14 Expression	50
Abbildung 11: CD11c Expression	50
Abbildung 12: CD80 Expression	51
Abbildung 13: CD83 Expression	52
Abbildung 14: CD86 Expression	53

Abbildung 15: CD54 Expression	54
Abbildung 16: CD209 Expression	55
Abbildung 17: HLA-DR Expression.....	56
Abbildung 18: IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von DC.....	58
Abbildung 19: TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von DC.....	59
Abbildung 20: IL-12 Konzentration in Zellkulturüberständen von DC.....	60
Abbildung 21: IL-10 Konzentration in Zellkulturüberständen von DC.....	61
Abbildung 22: CD80, CD86, CD83, CD54, CD209 und HLA-DR Expression auf DC im Transwell-System.	63
Abbildung 23: IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC	64
Abbildung 24: TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC	65
Abbildung 25: IL-10 Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC	67
Abbildung 26: IL-1 β , IL-10 und TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC - direkte Inkubation und Transwell-System	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
bzw	Beziehungsweise
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of differentiation
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAO	Food and Agriculture Organization
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KbE	Kolonienbildende Einheit

L	Lactobacillus
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Master Mix
MRS	De Man Rogosa Sharp Broth
n.d.	nicht detektierbar
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate bufferes saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyllprotein
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcriptase
SSC	Side scatter
ssp	Subspecies
TBE	Tris Borat EDTA
TEER	Trans Epithelial Resistance
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VS	versus
WHO	World Health Organization

TABELLENVERZEICHNIS:

Tabelle 1: Richtlinie für die Anwendung von Probiotika	17
--	----

1 Einleitung und Fragestellung

Eine im Jahr 2004 am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien durchgeführte Studie hat neben anderen Studien gezeigt, dass oral aufgenommene Mikroorganismen, vor allem Milchsäurebakterien (Lactobacillen), einen stimulierenden Effekt auf das menschliche Immunsystem haben können, wobei konventionelle als auch probiotische Keime zu Veränderungen der zellulären Immunfunktion, sowie zur Anregung der Produktion von Zytokinen durch stimulierte Immunzellen führen [Meyer *et al.*, 2006]

Die Mechanismen, die den immunstimulierenden Wirkungen von Lactobacillen zugrunde liegen, sowie die Rolle des Darmepithels bei der Vermittlung dieser Effekte, sind bislang allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse diese immunmodulierenden Effekte anhand von *in vitro* Untersuchungen genauer zu charakterisieren.

Da dendritische Zellen wichtige antigenpräsentierende Zellen sind, die naive T-Zellen aktivieren und dadurch die Richtung der Immunantwort über das Darmassoziierte Immunsystem regulieren, könnten sie bei der Weitergabe der von Lactobacillen ausgelösten immunologischen Effekte eine zentrale Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konventioneller Lactobacillusstamm - *Lactobacillus delbrueckii* - und im Vergleich dazu ein probiotischer Lactobacillusstamm - *Lactobacillus rhamnosus GG* - in verschiedenen *in vitro* Modellen untersucht. Einerseits wurden dendritische Zellen direkt oder indirekt über eine enterozyten-ähnliche CaCo-2 Barriere mit *Lactobacillus delbrueckii* oder *Lactobacillus rhamnosus GG* inkubiert und anschließend auf die Expression von diversen Oberflächenmarkern und die Produktion von verschiedenen Zytokinen untersucht. Andererseits wurden mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) direkt und indirekt mit den zwei verschiedenen

Lactobacillusstämmen sowie einer 1:1 Mischung aus den beiden Bakterienstämmen inkubiert und deren Zytokinsekretion analysiert.

Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, welchen Einfluss *Lactobacillus delbrueckii* und *Lactobacillus rhamnosus GG* einerseits auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen einschließlich deren Zytokinsekretion und andererseits auf die Zytokinsekretion von PBMC haben. Dabei sollten mögliche Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen herausgearbeitet werden und die Rolle des Darmepithels anhand der Co-Kulturen von Caco-2 und dendritischen Zellen bzw. PBMC im Transwell-System erörtert werden.

2 Literaturüberblick

2.1 Probiotika - geschichtlicher Hintergrund und Begriffserklärung

Schon seit tausenden von Jahren werden Milchsäurebakterien, so genannte Lactobacillen, für die Fermentation von Lebensmitteln zur Haltbarmachung eingesetzt. 1907 wurde von Eli Metchnikoff erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen dem regelmäßigen Verzehr fermentierter Milchprodukte und einer verlängerten Lebensdauer in der kaukasischen Bevölkerung beschrieben [Metchnikoff, 1907]. Diese Beobachtung legte die Basis für rege wissenschaftliche Forschungstätigkeiten, die sich bis in die Gegenwart mit dem positiven Einfluss von Lactobacillen auf die Gesundheit des Menschen beschäftigt.

Der aus dem Griechischen stammende Begriff „Probiotika“ wurde zum ersten Mal 1954 von Werner Kollath verwendet. Als Gegenteil von Antibiotika sollten Probiotika („für das Leben“) aktive Substanzen, die essentiell für die gesunde Entwicklung von Leben sind, darstellen [Vergin, 1954]. Einige Jahre später wurden Probiotika als wachstumsfördernde Faktoren, die von Mikroorganismen produziert werden und andere Mikroorganismen stimulieren, beschrieben [Lilly and Stillwell, 1965]. Daraufhin folgten zahlreiche weitere Definitionen, die immer wieder überarbeitet und schließlich 2002 in einer Arbeitsgruppe der FAO neu formuliert wurden. Demnach sind Probiotika lebende Mikroorganismen, die wenn sie in adäquaten Mengen aufgenommen werden, einen positiven Nutzen für die Gesundheit des Wirtsorganismus haben können [Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.].

Um Mikroorganismen tatsächlich als „probiotisch“ bezeichnen zu können, sollten sie einige nachfolgende Anforderungen erfüllen [Borchers *et al.*, 2009]:

1. Identifizierbarkeit von Genus, Spezies und Stamm
2. Sicherheit für den Einsatz in der Ernährung und klinischen Anwendungen

3. Stabilität während der intestinalen Verdauungsvorgänge
4. Adhäsionsfähigkeit an der Oberflächen der Mukosa
5. Fähigkeit den menschlichen Darm oder die Vagina zumindest temporär zu kolonisieren
6. Produktion von antimikrobiellen Stoffen
7. Fähigkeit pathogene Bakterienstämme zu antagonisieren
8. Klinisch dokumentierte und validierte positive Effekte auf die Gesundheit
9. Stabilität während Verarbeitung und Lagerung

Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass jeder einzelne als probiotisch bezeichnete Keim all diesen Anforderungen entspricht, ist es dennoch notwendig, dass ein Bakterium, das als probiotisch deklariert wird, dokumentierte positive Effekte auf die Gesundheit des Menschen hat. Eine klar definierte Grenze zwischen probiotischen und konventionellen Bakterienstämmen zu ziehen, ist oft schwierig.

Unter den fermentierten Milchprodukten ist Joghurt das wichtigste Vehikel für die Aufnahme von probiotischen Mikroorganismen. Als probiotisches Produkt speziell vermarktetes Joghurt enthält neben den konventionellen Starterkulturen – *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* - zusätzlich probiotische Bakterienstämme wie zum Beispiel *Lactobacillus rhamnosus* GG. Derzeit sind weltweit mehr als hundert fermentierte Milchprodukte mit dem Zusatz „probiotisch“ erhältlich [Tamime *et al.*, 2007]. Diese sollten eine Konzentration von mindestens 10^6 Koloniebildenden Einheiten (KbE) probiotischer Bakterien pro Gramm Produkt zum Zeitpunkt des Ablaufdatums aufweisen, um einen positiven Effekt auf die Gesundheit, welcher ab einer Dosis von 10^8 - 10^9 KbE zu erwarten ist, ausüben zu können [Shah, 2000]. Probiotika sind in den letzten Jahrzehnten ein wichtiges und schnell wachsendes Segment der Lebensmittelindustrie geworden und stellen in Europa, Japan und Australien den größten Anteil an funktionellen Lebensmitteln dar, deren propagiertes Ziel es ist, die Balance und Aktivität der intestinalen Mikroflora zu verbessern [Mattila-Sandholm *et al.*, 2007].

2.2 Der menschliche Darm und seine Mikroflora

2.2.1 Kolonisierung und Zusammensetzung der Mikroflora

Der menschliche Darm stellt ein hoch spezialisiertes und zugleich dynamisches, bakterielles Ökosystem dar. Bis zur Geburt ist der Gastrointestinaltrakt des Menschen steril, erst danach beginnt vor allem in den ersten beiden Lebensjahren seine mikrobielle Kolonisierung, welche maßgeblich von der Art der Geburt (natürlich vs. Kaiserschnitt) [Salminen *et al.*, 2004; Huurre *et al.*, 2008a] sowie der darauf folgenden Ernährungsform (Muttermilch vs. Formulanahrung) [Harmsen *et al.*, 2000] beeinflusst wird und bleibt in gesunden Erwachsenen während des Lebens relativ stabil [Zoetendal *et al.*, 1998].

Magen, Dünndarm und Colon unterscheiden sich deutlich in der Dichte der Bakterienkolonisierung (Abb.:1), da Säure, Gallenflüssigkeit und Sekrete des Pankreas weitgehend die Kolonisierung von Magen und Duodenum verhindern. Im Jejunum und Ileum hingegen steigt die Dichte der Bakterien an und resultiert im Dickdarm in einer Anzahl von 10^{11} - 10^{12} Bakterien pro Gramm Darminhalt [O'Hara and Shanahan, 2006].

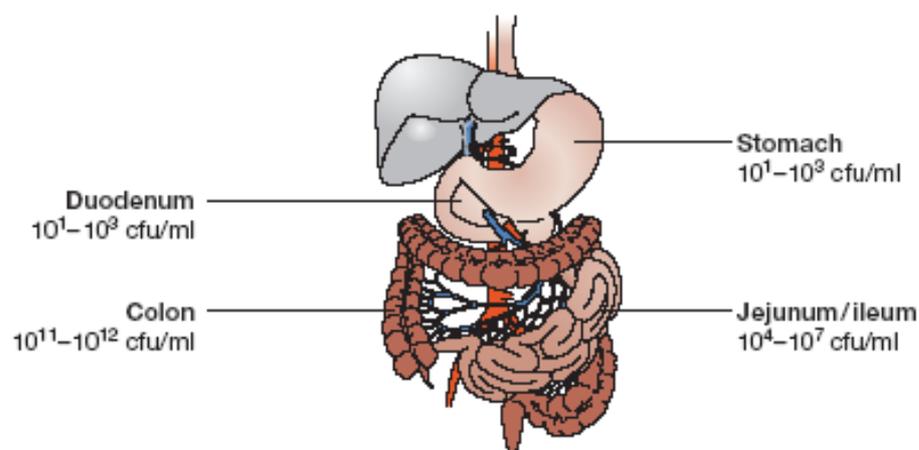


Abbildung 1: Bakteriendichte im Gastrointestinaltrakt (cfu: colony forming units) [O'Hara and Shanahan, 2006]

Der Großteil der Bakterien im Colon sind nicht-sporenbildende Anaerobier wie Bakteroides, Bifidobakterium, Eubakterium, Clostridium, Lactobacillus, Fusobakterium und verschiedene gram-positive Kokken [Salminen *et al.*, 1998]. Insgesamt enthält die intestinale Mikroflora eines Erwachsenen 300-500 verschiedene Bakterien, wobei 30-40 Gattungen 99 Prozent der Gesamtpopulation bilden und pathogene bzw. potentiell pathogene sowie apathogene Keime nebeneinander co-existieren [Guarner, 2006]. Jedes Individuum hat eine einzigartige charakteristische Mikroflora, sogar eineiige Zwillinge unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung [Zoetendal *et al.*, 2001].

2.2.2 Aufgaben und Funktionen der Mikroflora

Die Aktivität der intestinalen Mikroflora ist mit der Leber - dem stoffwechselaktivsten Organ – vergleichbar. Sie umfasst die Fermentation von Kohlenhydraten zu kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat, welches die Hauptenergiequelle für das intestinale Epithel darstellt und somit für die Aufrechterhaltung einer gesunden Darmmukosa von großer Bedeutung ist [Brouns *et al.*, 2002]. Zudem produziert die Darmflora verschiedene B Vitamine und Vitamin K. Dies konnte anhand von Studien mit keimfreien Tieren bestätigt werden, für die eine um 30 Prozent erhöhte Energiezufuhr sowie Vitamin B und K Supplemente in der Ernährung erforderlich waren, um ihr normales Körpergewicht aufrechterhalten zu können [Hooper *et al.*, 2002]. Diese Synthesetätigkeit ist zwar auch beim Menschen nachgewiesen, jedoch wird die tatsächliche Verfügbarkeit dieser bzw. deren Beitrag zur Versorgung des Menschen bislang noch kontrovers diskutiert.

Der anaerobe Abbau von Proteinen und Aminosäuren durch Darmbakterien kann mitunter zur Produktion von toxischen Substanzen welche eine negative Wirkung auf den Wirtsorganismus haben, führen [Mykkanen *et al.*, 1998].

Eine weitere wichtige Funktion der intestinalen Mikroflora ist der Schutz vor exogenen pathogenen Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere, die in einer keimfreien Umgebung gezüchtet werden, anfälliger für Infektionen sind.

Daher wird angenommen, dass die Mikroflora im Darm eine effektive Schutzfunktion als Barriere für pathogene Keime übernimmt. Dies wird auch als „Kolonisierungsresistenz“ bezeichnet und dadurch erreicht, dass Darmbakterien mit pathogenen Mikroorganismen um ihre Adhäsionsstelle am Darmepithel sowie die vorhandenen Nährstoffe konkurrieren. Zudem bilden manche Bakterien der gesunden Darmflora antimikrobielle Substanzen wie Bakteriocine, die das Wachstum von Pathogenen nachweislich inhibieren können [Adlerberth *et al.*, 2000]. Die intestinale Mikroflora spielt einerseits durch die direkte Interaktion mit pathogenen Bakterien und andererseits durch ihren Einfluss auf das Immunsystem eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen.

Teile der Darmflora sind wesentlich an der postnatalen Reifung des Immunsystems beteiligt, da sie den ersten Stimulus für die Entwicklung der lokalen und systemischen Immunabwehr bilden. Später stellen diese hingegen wichtige Komponenten mit regulatorischen und inhibitorischen Aufgaben dar, welche zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen mukosaler und systemischer Immunabwehr benötigt werden [Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2002].

Veränderungen in der Zusammensetzung und Stoffwechselfunktion der Mikroflora werden mit verschiedenen Krankheiten wie Diarrhöe und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht [Guarner and Malagelada, 2003]. Ebenso wird die Pathogenese von allergischen Erkrankungen mit Störungen in der Zusammensetzung der Darmflora assoziiert [Bjorksten *et al.*, 2001; Brandtzaeg, 2002].

Ein viel versprechender Ansatz für die Behandlung und Prävention von eben diesen Erkrankungen ist daher die Modifikation bzw. Wiederherstellung eines Gleichgewichts in der Darmflora durch Aufnahme von probiotischen Bakterien.

2.3 Gesundheitsfördernde Wirkung von Lactobacillen

2.3.1 Lactobacillen in der Behandlung und Prävention von akuten Durchfallerkrankungen mit verschiedenen Ursachen

Der Begriff Diarrhöe umfasst diverse Durchfallerkrankungen und bedeutet im Allgemeinen die Abnahme der Stuhlkonsistenz, die gewöhnlich mit einer erhöhten Stuhlfrequenz und erhöhtem Fäkalgewicht einhergeht. Die WHO definiert Diarrhöe als drei- oder mehrmaligen wässrigen Stuhlgang an zwei oder mehr aufeinander folgenden Tagen.

Der positive Einfluss von Lactobacillen wurde bereits vielfach bei Diarrhöe mit unterschiedlichen Ätiologien beschrieben. Schon vor Jahrzehnten wurden verschiedene fermentierte Lebensmittel als gesundheitsfördernde Lebensmittel bei Durchfallerkrankungen eingesetzt. Obwohl seither sämtliche Bakterienstämme auf ihre tatsächliche positive Wirkung ausführlich untersucht wurden, können Schlussfolgerungen zum Thema aufgrund der Schwierigkeiten beim Vergleich von diversen Studien (unterschiedliche Bakterienstämme, Studiendesigns, Einflussvariablen) kaum gezogen werden.

1996 kam ein Review zu dem Schluss, dass die Aufnahme von bestimmten Mikroorganismen in der Behandlung und Prävention von intestinalen Infektionen zu keinen nachweisbaren Effekten führt [Elmer *et al.*, 1996]. Eine 10 Jahre später veröffentlichte Metaanalyse von 34 randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien ergab hingegen, dass Probiotika eine signifikante Reduktion von Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe bzw. Diarrhöe um 52 Prozent bewirken, sowie das Risiko für Reisediarrhöe um 8 Prozent und jenes für akute Diarrhöe mit diversen Ursachen um 34 Prozent vermindern können. Alle getesteten Mikroorganismen, darunter *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* zeigten allein oder auch in Kombinationen ähnliche Effekte. Für die Rolle von probiotischen Mikroorganismen in der Prävention von akuter Diarrhöe, speziell der Antibiotika-assoziierten Diarrhöe, gibt es ausreichend wissenschaftliche

Hinweise, wobei die günstigen Effekte bei Kindern stärker ausgeprägt zu sein scheinen als bei Erwachsenen. Dennoch sind weitere umfassende Studien zum besseren Verständnis der Wirkungsweise und zur Erarbeitung von entsprechenden Empfehlungen notwendig [Sazawal *et al.*, 2006].

2.3.1.1 Akute Diarrhöe

Akute Diarrhöe kann durch Infektionen mit Rotaviren verursacht werden und ist speziell in Entwicklungsländern ein ernstzunehmender Faktor in der Morbidität und Mortalität von Kindern. Mehrere Studien konnten eine signifikante Abnahme von Inzidenz und Dauer der Diarrhöe bei Kindern nach Aufnahme von lebenden Mikroorganismen wie *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus thermophilus* zeigen [Saavedra *et al.*, 1994; Guandalini *et al.*, 2000]. Eine Metaanalyse von Van Niel *et al.* ergab, dass die Probiotika-Gabe an Kinder generell zu einer Reduktion der Diarrhöe-Dauer um 0,7 Tage sowie der Stuhl-Häufigkeit auf 1,6 Stuhlgänge am zweiten Tag der Behandlung führt [Van Niel *et al.*, 2002]. Vergleiche unterschiedlicher Bakterienstämme zeigten, dass die Behandlung mit *Lactobacillus rhamnosus GG* zu einer signifikant höheren Reduktion der Diarrhöe-Dauer führte, als die Behandlung mit einer Kombination aus *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* [Majamaa *et al.*, 1995].

Weiters konnte festgestellt werden, dass *Lactobacillus rhamnosus GG* sowohl lebend als auch hitzeinaktiviert zu einer effektiven Verkürzung der durch Rotaviren induzierten Diarrhöe führt, wobei Rotavirus spezifische Serum IgA Levels bei Behandlung mit lebenden *Lactobacillus rhamnosus GG* höher waren als mit hitzeinaktivierten Keimen [Kaila *et al.*, 1995]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus rhamnosus* Stämme zwar in der Behandlung von Rotavirus-induzierter Diarrhöe bei Kindern wirksam sind, in der Behandlung von Durchfallerkrankungen mit anderer Ätiologie hingegen nicht [Szymanski *et al.*, 2006]. Dies wurde zusätzlich durch Studien untermauert, in

denen mit *Lactobacillus rhamnosus GG* weder bei der Behandlung von kindlichen nosokomialen Rotavirus Infektionen [Mastretta *et al.*, 2002] noch bei schwerer, dehydrierender Diarrhöe eine positive Wirkung erzielt werden konnte [Costa-Ribeiro *et al.*, 2003]. Basierend auf diesen Ergebnissen dürfte die therapeutische Wirkung von probiotischen Mikroorganismen bei schweren, infektiösen Durchfallerkrankungen unzureichend sein bzw. sich die durch Probiotika erzielbaren therapeutischen Effekte zu langsam entwickeln. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die therapeutische Wirkung von Probiotika bei Kindern mit akuter Diarrhöe moderat, Stamm- und Dosis-abhängig und deutlicher bei früher Applikation und bei wässriger Diarrhöe sowie viraler Gastroenteritis ausgeprägt ist, jedoch bei invasiver, bakterieller Diarrhöe als Therapeutikum nicht ausreichend effektiv zu sein scheint [Szajewska and Mrukowicz, 2005].

2.3.1.2 Antibiotika - assoziierte Diarrhöe

Störungen der intestinalen Mikroflora durch Behandlung mit Antibiotika führen oft zu Diarrhöe. Antibiotika – assoziierte Diarrhöe ist ein verbreitetes klinisches Problem, welches bei etwa 25 Prozent der Patienten auftritt und bei einem Viertel dieser Fälle durch Infektion mit *Clostridium difficile* verursacht wird [Katz, 2006]. Bei Kindern, die parallel zu einer Amoxicillin Behandlung Lactobacillen erhielten, konnte eine geringere Inzidenz für Diarrhöe beobachtet werden [Contardi, 1991]. Es gibt sogar Hinweise, dass Infektionen mit *Clostridium difficile* erfolgreich mit *Lactobacillus rhamnosus GG* behandelt werden können [Biller *et al.*, 1995].

Zwei Metaanalysen von 6 randomisierten Kontrollstudien konnten einen gegenüber der Placebogruppe signifikanten, positiven Effekt von Probiotika in der Behandlung von Antibiotika – assoziierter Diarrhöe nachweisen [Johnston *et al.*, 2006; Szajewska *et al.*, 2006]. *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus sporogens* und *Saccharomyces boulardii* erwiesen sich dabei mit einer Dosis von $5-40 \times 10^9$ KbE pro Tag als die effizientesten

Bakterienstämme. Weiters konnte gezeigt werden, dass für die Prävention von Antibiotika – assoziierter Diarrhöe insbesondere die Viabilität der Mikroorganismen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, da nur Patienten die *Lactobacillus rhamnosus GG* erhielten, nicht aber jene, die pasteurisiertes Joghurt bzw. inaktivierte Keime aufnahmen, positive Effekte zeigten [Siitonen *et al.*, 1990].

Um jedoch wirklich konkrete Empfehlungen für Routineanwendungen von Probiotika in der Prävention bzw. Behandlung von Antibiotika – assoziierter Diarrhöe abgeben zu können, bedarf es allerdings noch weiteren Studien.

2.3.1.3 Laktoseintoleranz

Der am besten untersuchte Effekt von fermentierten Milchprodukten auf den menschlichen Organismus ist die Verbesserung der Laktoseverdauung und die Linderung der gastrointestinalen Symptome bei Personen mit Laktoseintoleranz. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch die in fermentierten Milchprodukten enthaltene bakterielle β -Galaktosidase, die die Laktosehydrolyse im Dünndarm unterstützen kann, verursacht. Außerdem bewirkt Joghurt eine Verkürzung der intestinalen Transitzeit, wodurch kommt es im Darm zu einer langsameren Aufnahme von Laktose und folglich zu einer verbesserten Aktivität der residualen β -Galaktosidase sowie zu einer Herabsetzung der osmotischen Belastung durch Laktose kommt [de Vrese *et al.*, 2001; Labayen *et al.*, 2001]. Aufgrund der, verglichen mit konventionellen Keimen, geringeren β -Galaktosidase Aktivität probiotischer Bakterien werden diese in Hinblick auf die Verbesserung der Laktoseabsorption als weniger wirksam angesehen. Es wird jedoch angenommen, dass Probiotika die Symptome der Laktoseintoleranz direkt im Dickdarm vermeiden können. Dieser Effekt ist jedoch Stamm-, Präparat- und Konzentrationsabhängig [Levri *et al.*, 2005]. Für die Abklärung welche Rolle Probiotika in Zukunft bei der Behandlung von Laktosemalabsorption spielen könnten und welcher Stamm zur Anwendung kommen sollte, müssen noch weitere, gezielte Studien durchgeführt werden.

2.3.2 Lactobacillen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die zwei Hauptformen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Obwohl die Ätiologie dieser Erkrankungen nicht bekannt ist, wird angenommen, dass in beiden Fällen sowohl die genetische Prädisposition als auch die intestinale Mikroflora eine entscheidende Rolle spielen [Elson, 2000; Shanahan, 2000]. Die Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt in der Bevölkerung der Industrieländer bei ca. 0,1-0,5 Prozent.

Colitis ulcerosa zählt zu einer der häufigsten Erkrankungsformen und ist durch Entzündungen mit oberflächlichen Ulzerationen der Colon-Mukosa charakterisiert. Die Entzündung beginnt vorwiegend im Rectum und breitet sich danach kontinuierlich im gesamten Dickdarm aus.

Morbus Crohn hingegen ist durch ein diskontinuierliches Entzündungsmuster charakterisiert und kann nicht nur den Dickdarm, sondern durchaus den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen. Im Gegensatz zu Colitis Ulcerosa gehen die Entzündungen bei Morbus Crohn Patienten mit erheblichen Ulzerationen und fallweise auch mit Granulomen einher [Sheil *et al.*, 2007]. Hohe Level an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , Interleukin (IL-) 1 β , und IL-8 in der Darmmukosa sind sowohl für Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa Patienten charakteristisch.

Der Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber der eigenen intestinalen Mikroflora scheint in der Entwicklung von beiden Erkrankungen ein entscheidender Faktor zu sein. Stuhl-Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, zeigen eine geringere Anzahl an Bifidobakterien und Lactobacillen, die Anzahl an Enterokokken und Bakteroides hingegen, ist in der entzündeten Mukosa dieser Patienten deutlich erhöht [Tamboli *et al.*, 2004]. Mit Hilfe eines Mausmodells konnte herausgefunden werden, dass IL-10 defiziente Mäuse eine Fehlfunktion der Darmbarriere und eine Th1-Typ Immunreaktion gegen die eigene Darmflora entwickeln [Madsen *et al.*, 1999a]. Gleichzeitig weisen diese Mäuse eine verminderte Anzahl an

Lactobacillen im Darm auf, wobei eine Normalisierung der Mikroflora durch Lactobacillen-Gabe eine intestinale Entzündung verhindern konnte [Madsen *et al.*, 1999b].

Da gewisse probiotische Bakterienstämme nachweislich einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Darmflora haben, die Barrierefunktion der Mukosa verbessern und das Immunsystem modulieren können, wurden bereits zahlreiche randomisierte, klinische Kontrollstudien mit Probiotika Supplementen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass bestimmte Probiotika, darunter *E. coli Nissle 1917*, *Lactobacillus rhamnosus GG* und VSL#3 (eine Mischung von verschiedenen probiotischen Mikroorganismen) mitunter in der Induzierung oder Aufrechterhaltung der Remission bei Colitis ulcerosa sowie der Aufrechterhaltung der Remission bei Morbus Crohn genauso wirksam sind wie eine Mesalazin Standardtherapie [Rolfe *et al.*, 2006; Jonkers and Stockbrugger, 2007; Mallon *et al.*, 2007; Zigra *et al.*, 2007]. Die meisten bisher getesteten probiotischen Mikroorganismen zeigten allerdings keinen höheren Effekt in der Induzierung und Aufrechterhaltung der Remission bei Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn als Placebopräparate. Lediglich einzelne kleine Studien weisen auf eine positive Wirkung von verschiedenen Kombinationen aus Bifidobakterien bei der Prävention von Colitis ulcerosa Rückfällen hin. Ishikawa *et al.* konnten durch den Einsatz von fermentierten Milchprodukten mit *Bifidobacterium breve* und *Bifidobacterium bifidum* eine Reduktion der Rückfallrate von 9 aus 10 in der Kontrollgruppe auf 3 aus 11 in der Probiotika - Gruppe erreichen [Ishikawa *et al.*, 2003]. Generell muss allerdings festgestellt werden, dass es in Hinblick auf die Behandlung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bislang keinen Hinweis auf einen zusätzlichen Nutzen, wenn Probiotika gemeinsam mit einer Standardtherapie eingesetzt werden, gibt. Um über die tatsächliche Wirksamkeit der Probiotika in der Therapie von Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn aussagekräftigere Schlussfolgerungen ziehen zu können, bedarf es noch umfangreicher klinischer Studien.

2.3.3 Lactobacillen in der Behandlung und Prävention von allergischen Erkrankungen

In den vergangenen Jahrzehnten konnte ein deutlicher Anstieg der Inzidenz von atopischen Erkrankungen in industrialisierten Ländern beobachtet werden. Gemäß der „Hygiene Hypothese“ soll neben anderen Einflussfaktoren, der relative Verlust an mikrobiellen Stimuli im Säuglingsalter und in früher Kindheit durch verbesserte Hygienebedingungen zu einem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Typ Immunreaktionen im Körper führen, welches die Entstehung von IgE-medierten Allergien begünstigt [Strachan, 1989]. Diese Hypothese wird insbesondere durch den permanenten Anstieg von Erkrankungen, die überwiegend durch Th1-polarisierte Immunreaktionen charakterisiert sind, unterstützt. Während Studien vor allem die frühe Exposition als wichtigen Atopie-präventiven Faktor definieren, wurde insbesondere in den letzten Jahren vermehrt festgestellt, dass die intestinale Mikroflora, welche die erste und bedeutendste Quelle für mikrobiellen Kontakt darstellt, nicht nur in der Th1/Th2-Polarisierung, sondern auch in der Induzierung der entsprechenden regulatorischen Mechanismen eine zentrale Rolle spielt. Untersuchungen zeigten bereits, dass die Zusammensetzung der Darmflora indirekt mit einem Risiko für die Entstehung allergischer Erkrankungen bei Kindern in Verbindung gebracht werden kann. Je größer dabei der Anteil an Lactobacillen in der intestinalen Mikroflora ist, desto geringer ist die Prävalenz für Allergien [Sepp *et al.*, 1997; Bjorksten *et al.*, 1999]. Eine prospektive Studie zeigte außerdem, dass der Fäzes von Kindern, welche allergische Erkrankungen entwickeln im Vergleich zu Kindern die keine Allergien entwickeln, weniger Enterokokken und Bifidobakterien, dafür jedoch mehr Clostridien und Staphylokokken während dem ersten Lebensjahr enthält [Bjorksten *et al.*, 2001; Kalliomäki *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003]. Erhöhte Fäzes-Gehalte an von *Clostridium difficile* abgeleiteter Capronsäure, sind somit vor allem für allergische Kinder charakteristisch [Bottcher *et al.*, 2000].

Die Möglichkeit das Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora verändern und dadurch die Polarisierung der Immunreaktion von Th-Zellen beeinflussen zu

können, veranlasste etliche Studien, die sich mit der Rolle von probiotischen Mikroorganismen in der Primärprävention oder Behandlung von atopischen Erkrankungen beschäftigten.

Die Nahrungsmittelallergie ist die am häufigsten vorkommende Manifestation von atopischen Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern. Sie wird durch eine Störung der oralen Toleranz hervorgerufen und verheilt meist spontan im zweiten Lebensjahr, was darauf hinweist, dass die Reifung des Darmassoziierten Immunsystems durch das Lebensalter, die Entwicklung der oralen Toleranz begünstigt [Chehade and Mayer, 2005]. Mit Hilfe von Tierversuchen konnte herausgefunden werden, dass die im Darm angesiedelten Mikroorganismen auch die Immunantwort der Mukosa gegenüber Nahrungsmittelallergenen beeinflussen können und dadurch die intestinale Kolonisierung nach der Geburt essentiell für die Entwicklung der oralen Toleranz ist [Sudo *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 2000]. Weiters konnte gezeigt werden, dass eine kurzfristige Störung der Toleranz gegenüber Ovalbumin, durch die gezielte Behandlung mit Lactobacillen wieder regeneriert werden konnte [Gaboriau-Routhiau and Moreau, 1996]. Aus diesen Ergebnissen entwickelte sich die Hypothese, dass Probiotika während der ersten Lebensjahre hilfreich in der Prävention von Nahrungsmittelallergien oder anderen atopischen Erkrankungen sein könnten. Hurre *et al.* fanden heraus, dass Kinder von Müttern mit Allergie, speziell wenn sie über 2,5 Monate ausschließlich oder insgesamt 6 Monate gestillt wurden, ein höheres Risiko für eine Sensibilisierung im Alter von 12 Monaten haben und dieses Risiko durch die Anwendung von Probiotika während der Schwangerschaft und Stillzeit gesenkt werden konnte [Huurre *et al.*, 2008b]. Supplementierung von Babynahrung mit *Lactobacillus casei* und *Bifidobacterium lactis* hingegen konnte keine verbesserte Toleranz gegen Kuhmilch bei Kindern, die an einer entsprechenden Allergie leiden, bewirken [Hol *et al.*, 2008].

Bei perinataler Aufnahme von *Lactobacillus rhamnosus GG* konnte in Studien eine Reduktion der Inzidenz von atopischen Ekzemen bei Kindern mit einem hohen Risiko für Atopie während der ersten 2-4 Lebensjahre beobachtet werden [Kalliomäki *et al.*, 2003; Kalliomäki *et al.*, 2007]. Im Gegensatz dazu

fürte eine Supplementierung mit *Lactobacillus rhamnosus GG* während der Schwangerschaft und frühen Kindheit in einer doppel-blind, Placebo-kontrollierten, prospektiven Studie von Kopp et al. weder zu einer Reduktion der Prävalenz, noch zu einer Veränderung im Schweregrad von atopischer Dermatitis bei den betroffenen Kindern [Kopp et al., 2008]. Eine weitere Studie zeigte jedoch auf, dass es zu einer geringeren Inzidenz von IgE-assoziierten Ekzemen während der ersten beiden Lebensjahre, wenn Mütter täglich *Lactobacillus reuteri* ab der 36. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt erhielten, und anschließend die Babys von Geburt an bis zum 12 Lebensmonat dasselbe Produkt verabreicht bekamen [Abrahamsson et al., 2007].

Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse von Studien, die sich mit der Prävention und Behandlung von atopischer Dermatitis durch prä- und postnatale Probiotika Supplementierung auseinandersetzte, kam zu dem Schluss, dass die Effizienz von Probiotika bei der Prävention von atopischer Dermatitis überzeugender ist, als bei der Behandlung derselben [Lee et al., 2008]. Ein Review von Betsi et al. hingegen fordert weitere randomisierte Kontrollstudien für die Abklärung, ob Probiotika in der Behandlung und Prävention von atopischer Dermatitis wirklich nützlich sind [Betsi et al., 2008].

Die Rolle von Probiotika in der Prävention von allergischen Erkrankungen wird somit weiterhin Gegenstand von kontroversen Diskussionen bleiben.

2.3.4 Empfehlungen für die klinische Anwendung von Probiotika Juli 2008

Basierend auf klinischen Studien, Abstracts von Meetings, und dem Fachwissen einer Gruppe von Experten wurden im Juli 2008 Empfehlungen für die klinische Anwendung von Probiotika für Mediziner veröffentlicht (Tabelle 1). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass ausreichend Daten den Einsatz von Probiotika bei der Behandlung von akuter Diarrhöe bei Kindern, bei der Prävention von Antibiotika - assoziierter Diarrhöe, bei Pouchitis, für die Stimulierung der Immunantwort und bei atopischer Dermatitis unterstützen.

Ferner könnten probiotische Mikroorganismen bei der Behandlung von weiteren Erkrankungen wie *Clostridium difficile* – assoziierter Colitis, strahleninduzierter Enteritis, Colitis ulcerosa und Reizdarmsyndrom hilfreich sein. Generell werden die Empfehlungen für spezifische Probiotika gegeben, wobei auf die Bedeutung von Stamm- und Dosis- Abhängigkeit sowie der Applikationsart hingewiesen wird. Der Einsatz von Probiotika bei immunsupprimierten Personen wird nicht für die Routine empfohlen [Floch *et al.*, 2008].

Klinik	Effizienz	Bakterienstamm	Referenzen
Diarrhöe			
Infektiös, Kindheit - Behandlung	A	<i>Saccharomyces boulardii</i> , LGG, <i>Lactobacillus reuteri</i>	2-7
Prävention der Infektion	B	<i>S. boulardii</i> , LGG	3
Prävention der AAD	A	<i>S. boulardii</i> , LGG, combination of <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S.</i> <i>thermophilus</i>	8,9
Behandlung wiederkehrender CDAD	B	<i>S. boulardii</i> , LGG	8,9
Prävention der CDAD	B	<i>S. boulardii</i> , LGG	8-12
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen			
Pouchitis			
Prävention und Erhaltung der Remission	A	VSL#3	13-15
Induzierung der Remission	C	VSL#3	16
Colitis ulcerosa			
Induzierung der Remission	C	<i>Escherichia coli</i> Nissle, VSL#3	17-19
Aufrechterhaltung der Remission	C	<i>E. coli</i> Nissle, VSL#3	20-22
Morbus Crohn	C	<i>E. coli</i> Nissle, <i>S. boulardii</i> , LGG	23-26
Reizdarmsyndrom	B	<i>Bifidobacterium infantis</i>	27-29
	C	<i>B. animalis</i> , VSL#3, <i>L. plantarum</i>	30-34
Immunantwort	A	LGG, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. johnsonii</i>	35-36
Allergie			
Atopische Ekzeme die mit Kuhmilchallergie assoziiert sind			
Behandlung	A	LGG, <i>B. lactis</i>	37-43
Prävention	A	LGG, <i>B. lactis</i>	44-48
Strahlungsinduzierte Enteritis	C	VSL#3, <i>L. acidophilus</i> ,	49-52
Vaginose und Vaginitis	C	<i>L. acidophilus</i> , LGG, <i>L. reuteri</i>	53-55

Tabelle 1: Richtlinie für die Anwendung von Probiotika modifiziert nach Floch *et al.* 2008; A: starke Hinweise; B: sinnvolle Hinweise, C: inadäquate Studien um zuverlässige Empfehlungen abgeben zu können; exakte Dosierungen sind den dazugehörigen Referenzen zu entnehmen; AAD: Antibiotika - assoziierte Diarrhöe; CDAD: *Colstridium difficile* - assoziierte Diarrhöe; VSL#3: Mischung aus *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* und *Streptococcus salivarius*. [Floch *et al.*, 2008]

2.4 Immunologische Mechanismen

Die Mechanismen, die zu den immunstimulierenden Effekten von spezifischen Mikroorganismen führen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Lokale sowie systemische Reaktionen dürften dabei jedoch eine entscheidende Rolle spielen. Mögliche lokale durch spezifische Mikroorganismen ausgelöste Reaktionen sind die Induktion von sekretorischem Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin M [Kaila *et al.*, 1992; Majamaa *et al.*, 1995], die Inhibierung der Adhärenz und Translokation von pathogenen Bakterien [Malchow, 1997], sowie die Bereitstellung von Nahrungsfaktoren für das intestinale Epithel und dadurch Reduktion deren Permeabilität für Allergene und Pathogene [Isolauri *et al.*, 1993]. Zu den, durch spezifische Mikroorganismen ausgelösten, systemischen Effekten zählen unter anderen die Stimulierung der Antikörperproduktion, vor allem der IgA-Produktion in B-Zellen von Menschen und Mäusen [Gronlund *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2005], Veränderungen von dendritischen Zellen hinsichtlich Phänotyp und Zytokinsekretion sowie die Modulierung der Zytokinproduktion von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).

2.4.1 Der Einfluss von probiotischen Mikroorganismen auf dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind wichtige antigenpräsentierende Zellen, die naive T-Zellen aktivieren und dadurch die Richtung der Immunantwort regulieren können. Sie spielen daher sowohl in der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Das Zytokinmuster und die Hochregulierung von Oberflächenmarkern mit co-stimulatorischer Funktion sind auf dendritischen Zellen, die eine Th1 oder eine Th2 Immunreaktion hervorrufen, unterschiedlich ausgeprägt [Banchereau *et al.*, 2000]. IL-12 in Verbindung mit Interferon γ (IFN- γ) lenkt die Immunantwort Richtung Th1 Reaktion, welche durch eine verstärkte IFN- γ Sekretion charakterisiert ist und die Entwicklung der zellmedierten, zytotoxischen Immunität fördert.

Prostaglandin 2 kombiniert mit IL-4 begünstigt hingegen die Entwicklung der Typ 2 Immunantwort, welche mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sowie Th2 Helferzellen einhergeht und speziell durch die Produktion von Antikörpern die Immunantwort in Richtung Immunglobulin E vermittelte Immunreaktion induziert.

Weiters gibt es Hinweise darauf, dass dendritische Zellen T-Zellen zu einer regulatorischen Funktion polarisieren und dadurch orale Toleranz induzieren können [Mowat, 2003; Bilsborough and Viney, 2004]. Der am besten erforschte Mechanismus zur Induktion dieser regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) durch dendritische Zellen, ist die Freisetzung von IL-10 und Transforming growth factor β (TGF- β), welche zu einer Bildung von Tr1 und Th3 regulatorischen T-Zellen führt, die ihrerseits wiederum eine Sekretion von IL-10 und TGF- β bewirken.

Im Zuge des Reifungsprozesses verwandeln sich dendritische Zellen von antigenprozessierenden Zellen in antigenpräsentierenden Zellen. Unreife dendritische Zellen zeichnen sich durch eine hohe Bereitschaft Antigene aufzunehmen auf [Banchereau *et al.*, 2000] und exprimieren vermehrt CD209, einen für humane dendritische Zellen spezifischen Adhäsionsrezeptor [Geijtenbeek *et al.*, 2000]. Nach der Antigenaufnahme kommt es zur funktionellen Reifung, die mit einer Herabregulierung der Endozytosefähigkeit, einer erhöhten Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse 2 und costimulatorischen Molekülen wie CD54, CD80, CD83 und CD86 sowie einer vermehrten Zytokinsekretion einhergeht. Im Zuge des Reifungsprozesses wandern dendritische Zellen zu sekundären lymphoiden Organen, wo sie die zuvor aufgenommenen Antigene den naiven T-Zellen präsentieren und dadurch die Richtung der Immunantwort beeinflussen. Reife dendritische Zellen proliferieren nicht mehr und gehen nach der Antigenpräsentation in die Apoptose über [Banchereau and Steinman, 1998].

Aufgrund der Tatsache, dass dendritische Zellen eine richtungweisende Rolle bei der Immunantwort spielen, wird angenommen, dass probiotische

Mikroorganismen die Immunreaktion durch Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen modulieren können.

Christensen et al. konnten zeigen, dass diverse inaktivierte Lactobacillusstämme die Reifung von aus dem Knochenmark abgeleiteten, murinen dendritischen Zellen induzieren. Im Rahmen dieser Studie wurde weiters festgestellt, dass *L. casei subsp. alactus* die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, 6 und TNF- α in dendritischen Zellen bewirkt, *L. reuteri* hingegen ein schwacher Stimulator von IL-12 zu sein scheint [Christensen et al., 2002]. In einer weiteren Studie fanden Zeuthen et al. heraus, dass verschiedene UV-inaktivierte Lactobacillen und gram-negative Bakterien die Reifung humaner dendritischer Zellen unterschiedlich beeinflussen. Während unterschiedliche Lactobacillen stark in ihrer Fähigkeit IL-12 und TNF- α zu induzieren variierten, zeigten inaktivierte gram-negative Mikroorganismen einheitlich einen schwachen Effekt auf die Produktion dieser Zytokine. Alle in dieser Studie getesteten Bakterienstämme konnten jedoch einen signifikanten Anstieg der IL-10 Produktion bewirken, wobei gram-negative Bakterien in dieser Hinsicht effizienter als Lactobacillen waren [Zeuthen et al., 2006]. Weitere Untersuchungen ergaben hingegen, dass einige Lactobacillusstämme zwar zu einer Sekretion hoher Mengen an IL-12 und IL-18, aber nicht IL-10 in dendritischen Zellen führen können und dadurch die T-Zellantwort in Richtung Th1 Immunantwort regulieren [Mohamadzadeh et al., 2005].

Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass Lactobacillen bestimmte stammspezifische Reifungs- und Zytokinmuster in dendritischen Zellen induzieren können und sich somit in ihrer immunmodulierenden Wirkung unterscheiden.

2.4.2 Der Effekt von Lactobacillen auf PBMC

Sowohl *in vitro* Studien als auch *in vivo* konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass bestimmte Bakterienstämme speziell Lactobacillen und Bifidobakterien, eine Änderung des Zytokinmusters von PBMC bewirken.

Pochard et al. entdeckten, dass Präinkubation von PBMC (von Hausstaubmilbenallergikern gewonnen) mit Lactobacillen vor Stimulierung derselben mit *Dermatophagoides pteronyssinus* und Staphylokokken Superantigen, die Sekretion der Th2 Zytokine IL-4 und IL-5 signifikant senken konnte. Gleichzeitig kam es zu einer verstärkten Produktion von IFN- γ und IL-12 [Pochard et al., 2002]. Eine weitere Studie konnte eine starke Induktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-18, sowie eine moderate Erhöhung von IL-10 und IL-12 in PBMC nach *in vitro* Stimulierung mit Lactobacillen nachweisen, was auf eine Modulierung der unspezifischen Immunantwort durch diese Keime schließen lässt [Miettinen et al., 1998].

Entgegen diesen Studienergebnissen konnte jedoch auch festgestellt werden, dass Lactobacillen die Produktion von IL-10, welches antiinflammatorisch wirkt und überwiegend die Th1 Immunantwort inhibiert, begünstigen. Niers et al. fanden heraus, dass verschiedene Lactobacillus- und Bifidobakterienstämme die IL-10 Produktion von PBMC induzieren, welche hauptsächlich auf die Zytokinproduktion von Monozyten zurückzuführen ist. Durch den Anstieg der IL-10 Synthese kam es gleichzeitig zu einer Unterdrückung der Produktion von Th1 und Th2 Zytokinen, was darauf hinweist, dass Lactobacillen ihre immunmodulierende Wirkung durch Beeinflussung von Th1 sowie Th2 Subpopulationen entfalten [Niers et al., 2005].

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Lactobacillen prinzipiell das Th1 und Th2 Zytokinmuster modulieren können - die Wirkungen scheinen jedoch stammspezifisch zu sein, wobei je nach Bakterienstamm sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte auf das Immunsystem beobachtet werden können.

2.4.3 Crosstalk zwischen Darmbakterien und dem Immunsystem

Für die Aufnahme von Antigenen aus dem Darmlumen durch die Mukosa existieren mindestens drei unterschiedliche Wege: über dendritische Zellen, spezialisierte M-Zellen der Peyer's Patches sowie über individuelle M-Zellen, die sich in den Mikrovilli des Epithels befinden [Kraehenbuhl and Neutra, 2000; Jang *et al.*, 2004] (Abb. 2).

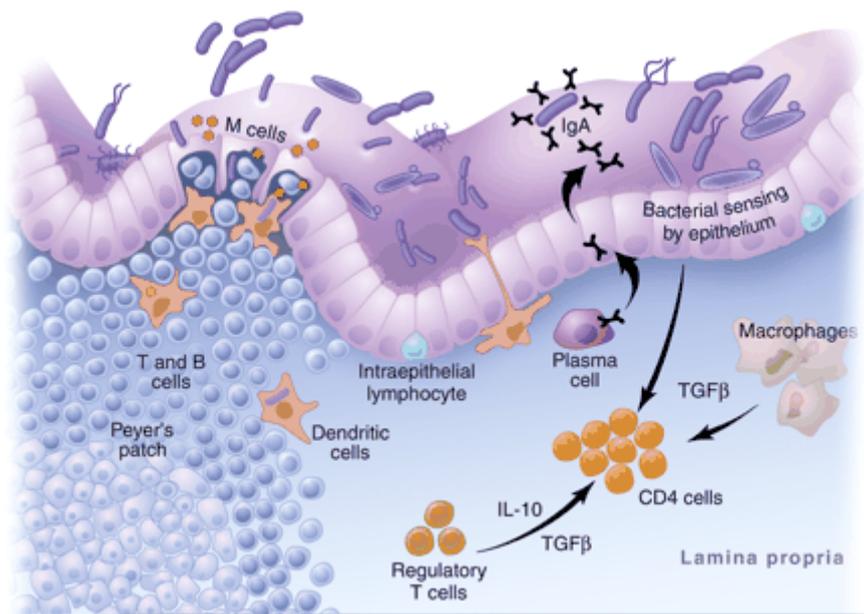


Abbildung 2: Immunsystem des Darms [MacDonald and Monteleone, 2005]

Dendritische Zellen überwachen ständig ihr Umfeld hinsichtlich der Anwesenheit von Antigenen [Mellman, 2005]. Sie sind in der Lage die Zellschicht des Darmepithels mit Periskop-artigen Fortsätzen zu durchdringen und dadurch die Umgebung des Darmlumens wahrzunehmen [Rescigno *et al.*, 2001b; Niess *et al.*, 2005]. Außerdem können dendritische Zellen Tight junctions öffnen, dadurch nichtinvasive Bakterien aufnehmen und auf die basolaterale Seite des Epithels transportieren, wo diese entweder wiederum von subepithelialen dendritischen Zellen aufgenommen oder direkt von den

transportierenden dendritischen Zellen selbst zu den lokalen Lymphknoten gebracht werden [Rimoldi *et al.*, 2005].

Nichtinvasive Bakterien können die intestinale Barriere auch via Adhäsion an M-Zellen überwinden und anschließend das lokale Immunsystem beeinflussen. M-Zellen sind spezielle Epithelzellen mit der Fähigkeit Makromoleküle und Mikroorganismen in Vesikel durch die Zelle zu transportieren und auf der anderen Seite der Darmmukosa zu präsentieren [Kucharzik *et al.*, 2000], wo sie von subepithelialen dendritischen Zellen aufgenommen und zu den lokalen Lymphknoten gebracht werden. Dort wird die lokale Immunantwort, wie die Sekretion von IgA, welches das Eindringen von Bakterien unterdrückt, induziert [Macpherson and Uhr, 2004].

2.4.3.1 Caco-2 Transwell-System als *in vitro* Modell für humane Enterozyten

Caco-2 Zellen stellen eine permanente, adhärent wachsende Zelllinie dar, welche ihren Ursprung in einem humanen Colon-Adenokarzinom hat. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie nach Erreichen der Konfluenz spontan differenzieren und dabei morphologisch, strukturell und funktionell Differenzierungsmerkmale reifer Enterozyten ausbilden. Neben Mikrovilli auf der apikalen Seite, bilden differenzierte Caco-2 Zellen zwischen den angrenzenden Zellen Tight junctions und exprimieren außerdem Enzyme der Bürstensaummembran wie Sucrase-Isomaltase, Laktase, Aminopeptidase N, Dipeptidylpeptidase IV und Alkalische Phosphatase [Pinto *et al.*, 1983].

Im Vergleich zu anderen Colon-Karzinom Zellen weisen Caco-2 Zellen morphologisch sowie funktionell die größte Ähnlichkeit zu Enterozyten auf [Chantret *et al.*, 1988].

Um den *in vivo* Bedingungen des menschlichen Darms näher zu kommen, wurden Caco-2 Zellen auf permeablen Filtereinsätzen, die einen Austausch von Ionen und Nährstoffen auf beiden Seiten der Epithelschicht ermöglichen,

gezüchtet. Dieses so genannte Transwell-Modell wird seither sehr umfassend für Transport und Toxizitätsstudien eingesetzt [Meunier *et al.*, 1995].

2.4.3.2 Crosstalk zwischen probiotischen Bakterien, Darmmukosa und Immunsystem

Etliche Untersuchungen beschäftigten sich bereits mit den Effekten von apathogenen und probiotischen Mikroorganismen im Caco-2 Transwell-Modell, um einen möglichen Crosstalk zwischen Bakterien, intestinalen Epithelzellen und den Zellen des Immunsystems identifizieren zu können. Zhang *et al.* fanden heraus, dass *L. rhamnosus* GG, die durch TNF- α induzierte IL-8 Sekretion in Caco-2 Monokulturen bei einer Dosis von 10^6 - 10^8 KbE reduzieren, bei steigenden Konzentrationen hingegen erhöhen kann [Zhang *et al.*, 2005]. Im Rahmen einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich lebende und hitzinaktivierte Lactobacillen und Bifidobakterien zwar an Caco-2 Zellen anheften, die IL-6 und IL-8 Produktion von diesen Zellen jedoch nur unwesentlich beeinflussen [Morita *et al.*, 2002]. Haller *et al.* fanden heraus, dass Caco-2 Zellen nur in Anwesenheit von basolateralen PBMC Veränderungen in der Zytokinsekretion durch die Stimulierung mit apathogenen Bakterien zeigen [Haller *et al.*, 2000]. Diese Beobachtungen konnten in einer weiteren Studie bestätigt werden [Parlesak *et al.*, 2004].

Weiters zeigte sich, dass aus Monozyten entwickelte dendritische Zellen, die mit Zellkulturüberständen von durch Bakterien stimulierte Caco-2 Zellen inkubiert wurden, durch die Sekretion von IL-10 und Chemokinligand 20 (ein Chemokin, welches hauptsächlich Th2 und Treg-Zellen durch die Induktion von Th2 Zytokinen stimuliert), eine antiinflammatorische Immunreaktion generieren. Allerdings führte Co-inkubation von dendritischen Zellen, Caco-2 Zellen und Bakterien durch IL-12 Sekretion sowie Induktion von Th1 und Th2 Zytokinen zu einer vorwiegend inflammatorischen Immunreaktion [Rimoldi *et al.*, 2005].

Diese Studien untermauern die Hypothese eines aktiven Einflusses der intestinalen Epithelzellen auf regulatorische Immunreaktionen sowie die

Aufrechterhaltung der Homöostase und immunologischen Toleranz gegenüber intestinalen Bakterien in der Darmmukosa.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienkultur

Benötigte Lösungen:

De Man Rogosa Sharp Broth (MRS Medium)

51 g MRS Broth Pulver (Fluka) werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst, mit 1 ml Tween 80 (Sigma) versetzt und anschließend 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. MRS-Broth wird bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

MRS Agar

62.25 g MRS Agar (Mast Diagnostica) werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst, 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und zu circa 10 ml Aliquoten in Petrischalen (Greiner Bio-one) gegossen. Die fertigen ausgekühlten Agarplatten werden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Ablauf der Kultivierung:

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC-53103) und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ATCC-11842) wurden von LGC Promochem in lyophilisierter Form geliefert, in 1 ml MRS Broth resuspendiert und in ein steriles Reagenzröhrchen mit 8 ml vorgewärmten MRS Medium überführt.

Die Kultivierung der Lactobacillen erfolgte im Brutschrank (Heraeus Cytoperm 8080) bei 37 °C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre. Nach 24 Stunden Inkubation konnte man anhand der Trübung des MRS Mediums bereits ein deutliches Wachstum der Bakterien erkennen. Zur Kryokonservierung wurden die Lactobacillen einmal mit sterilem PBS (PAA-Laboratories) gewaschen und in PBS mit 20% Glycerol (Sigma) als 1 ml Aliquote bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) erfolgte mittels Serialer Verdünnung und anschließendem Ausstreichen mit sterilen Impfüsen (Iwaki) auf MRS Agar. Nach circa 48 Stunden konnte die wahrscheinlichste Anzahl der KbE durch Auszählen der Kolonien ermittelt werden. Dieser

Vorgang wurde dreimal wiederholt und danach aus den erhaltenen Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

3.2 Zellkultur

Für die Experimente wurden sowohl permanente Zelllinien wie Caco-2, als auch aus dem Blut isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (engl.: Peripheral blood derived mononuclear cells, PBMC) und aus Monozyten generierte dendritische Zellen verwendet.

Die Caco-2 Zellen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Die PBMC wurden aus dem Blut von vier gesunden Erwachsenen isoliert.

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Arbeitsbank von Holten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.1 Caco-2

Caco-2 Zellen sind Zellen aus einem primären Colonkarzinom, die von einem 72-jährigen männlichen Kaukasier 1974 von J. Fogh et al. isoliert und als permanente Zelllinie etabliert wurden [Fogh *et al.*, 1977]. Es handelt sich dabei um eine adhärent wachsende Epithelzelllinie mit dem Charakteristikum nach der Bildung einer konfluenten Zellschicht - einem so genannten Monolayer - zu enterozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Je nach Aussaatdichte erhält man nach circa 23 Tagen einen differenzierten Caco-2 Monolayer, der Bürstensaum-Enzyme wie die Sucrase-Isomaltase exprimiert und zusätzlich einen erhöhten Transepithelialen Widerstand (TEER) aufweist.

Benötigte Lösungen:

Natrium-Pyruvat-Lösung

Für 20 ml Natrium-Pyruvat-Lösung (500mM) werden 1.1g Natrium-Pyruvat (Sigma) in 20 ml PBS gelöst. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

Komplementiertes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

450 ml DMEM (PAA-Laboratories) werden mit 50 ml fetalem Kälberserum (FCS, PAA-Laboratories), 5 ml L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin Streptomycin (PAA-Laboratories) und 1 ml Natrium-Pyruvat-Lösung (500mM) versetzt und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Kulturbedingungen:

Caco-2 Zellen werden in sterilen Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² (Iwaki) und 8 ml komplementiertem Medium im Brutschrank (Heraeus BB16) bei 37 °C in einer 5%-igen CO₂ Atmosphäre gezüchtet. Mindestens dreimal pro Woche erfolgt ein Mediumwechsel und vor Erreichen der Konfluenz werden die Zellen passagiert.

Für die Experimente im Transwell-System werden 4×10^5 Zellen auf 4.5 cm² große, hängende Zellkultureinsätze mit einem Porendurchmesser von 0.4 µm (Millipore) ausgesiedelt und 23 Tage kultiviert, um einen ausdifferenzierten Caco-2 Monolayer zu erhalten. Für die Überprüfung der Monolayer - Integrität wird der Transepitheliale Widerstand während der Differenzierung zweimal wöchentlich mittels Voltometer (Millicell-ERS, Millipore) gemessen. Außerdem wird die Expression des Differenzierungsmarkers Sucrase-Isomaltase (SI) mittels Reverse-Transkriptase - PCR (RT-PCR) vor Konfluenz, bei Konfluenz und nach 23 Tagen Kulturdauer analysiert.

Für die Versuche wurden Caco-2 Zellen mit einer Passagenzahl von 30-50 verwendet.

3.2.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

3.2.2.1 Isolation von PBMC durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Prinzip:

Ficoll Paque ist ein klassisches Zellseparationsmedium mit dessen Hilfe man PBMC aus peripherem Blut isolieren kann. Mit einer Dichte von 1.077 g/ml besitzt Ficoll Paque eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten und eine geringere Dichte als die von Erythrozyten und der meisten Granulozyten. Nach erfolgter Zentrifugation reichern sich PBMC in einer deutlichen Interphase zwischen Medium und Plasma an, die Thrombozyten verbleiben zum größten Teil im Plasma, da sie aufgrund ihres geringen Zellvolumens langsamer sedimentieren und die Erythrozyten und Granulozyten pelletieren am Boden des Röhrchens.

Ablauf:

- 4 x 8 ml Blut pro Proband über Venenpunktur in heparinhaltige Röhrchen (Greiner Bio-one) abnehmen
- Blut für 10 Minuten bei 623 x g, brake 0, 18 °C zentrifugieren (Haereus Megafuge 1.OR)
- danach das Plasma bis auf 1 ml abnehmen, 4 ml RPMI hinzufügen und vorsichtig mit einer 10 ml Pipette vermischen
- 2 Falconröhrchen pro Blutprobe mit je 4 ml Ficoll-Paque Plus (Dichte 1.077g/l, GE Healthcare) vorbereiten
- je 4 ml des Blut – RPMI - Gemisches werden vorsichtig über das Ficoll-Paque überschichtet
- erneut zentrifugieren bei: 318 x g; 30 Minuten; 18 °C; brake 0
- Röhrchen mit je 5 ml RPMI vorbereiten

- die PBMC vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette abnehmen (weißer Ring zwischen Medium und Ficoll-Paque) und zu den Röhrchen mit RPMI pipettieren
- erneut zentrifugieren bei: 318 x g; 10 Minuten; 18 °C; brake 9
- das Lymphozytenpellet in 1 ml RPMI resuspendieren, 4 ml RPMI zufügen, kurz vortexen und bei 318 x g; 10 Minuten; 18 °C; brake 9 zentrifugieren
- den Überstand verwerfen, das Pellet vorsichtig in komplementiertem RPMI resuspendieren und die beiden zusammengehörenden Probenröhrchen zusammenführen

Die erwartete Ausbeute an Lymphozyten beträgt bei durchschnittlichem Blutbild ca. 10^6 Zellen pro ml Vollblut.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und des Vitalitätsindex mittels Trypanblau

Prinzip:

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Zellproteine binden kann. Er dringt durch defekte Zellmembranen in das Cytosol von toten Zellen und färbt diese dadurch selektiv blau. Lebende Zellen hingegen nehmen den Farbstoff nicht auf.

Ablauf:

- 100 µl der Zellsuspension und 100 µl Trypanblau (Sigma) werden gemischt und 1 Minute inkubiert
- 10 µl dieser Suspension werden in der Neubauer Zählkammer im Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung gezählt
- Die mittlere Zellzahl der vier Großquadrate x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 (Faktor der Zählkammer) ergibt die Zellzahl pro ml
- Der Vitalitätsindex ergibt sich aus folgender Berechnung:
$$\% \text{ lebende Zellen} = \text{lebende Zellen} / \text{Gesamtzellzahl} \times 100$$

3.2.3 Dendritische Zellen

3.2.3.1 Monozytenisolation aus PBMC durch magnetische Beads

Prinzip:

Monozyten werden durch Depletion von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen, Erythrozyten und Granulozyten aus frisch isolierten PBMC mittels Dynabeads MyPure Monocyte Kit 2 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Hierbei werden PBMC mit einem Gemisch von monoklonalen Maus Immunglobulin G (IgG) Antikörpern (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CDw123 und CD235a) versetzt, an magnetische Kügelchen (Dynabeads) über einen humanen, monoklonalen Antimaus IgG Antikörper gekoppelt und mit Hilfe eines Magneten entfernt. Die isolierten Monozyten sind durch die Negativselektion Bead und Antikörperfrei und können somit für die Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen eingesetzt werden.

Benötigte Lösungen:

Isolierungspuffer

Um 200 ml Isolierungspuffer herzustellen werden 116.9 mg EDTA (Sigma) und 200 mg Bovines Serum Albumin (BSA, Sigma) in 200 ml PBS (PAA-Laboratories) gelöst, anschließend sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Ablauf:

Alle Schritte werden bei 4 °C auf Eis durchgeführt:

- 1×10^7 PBMC werden in 100 µl Isolierungspuffer resuspendiert, mit 20 µl Blocking Reagenz und 20 µl Antikörper Mix versetzt, gemischt und für 30 Minuten inkubiert
- währenddessen werden die benötigten Dynabeads gewaschen, indem man das gewünschte Volumen an Dynabeads als homogene Suspension in ein 5 ml Röhrchen überführt, das selbe Volumen

Isolierungspuffer hinzugefügt, vortext und das Röhrchen für 3 Minuten in den Magnet Dynal MPC®-L (Invitrogen) setzt. Danach wird der Überstand abgenommen, das Röhrchen aus dem Magnet entfernt und die Dynabeads im ursprünglichen Volumen Isolierungspuffer resuspendiert

- nach der Inkubation werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Isolierungspuffer, anschließendem Schütteln und Zentrifugieren bei 300 x g für 5 Minuten gewaschen
- der Überstand wird verworfen, die Zellen in 900 µl Isolierungspuffer suspendiert, 100 µl gewaschene Dynabeads beigemischt, gevortext und 30 Minuten bei 4 °C auf einem dreidimensionalen Mischer inkubiert
- anschließend werden die Bead-gebundenen Zellen mit einer 1000 µl Pipette 5-6-mal sorgfältig resuspendiert und für 2 Sekunden mit mittlerer Geschwindigkeit gevortext
- nach Zugabe von 1 ml Isolierungspuffer pro 10^7 PBMC werden die Röhrchen für 2 Minuten in den Magnet gestellt und der Überstand, der die ungebundenen Monozyten enthält, in frische Röhrchen überführt
- Wiederholung des vorherigen Schrittes und Einstellen der Zellzahl auf $1-2 \times 10^6$ Zellen pro ml

3.2.3.2 Differenzierung von Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen

Benötigte Lösungen:

Komplementiertes RPMI 1640

450 ml RPMI 1640 (PAA-Laboratories) werden mit 50 ml fetalem Kälberserum (FCS, PAA-Laboratories), 5 ml L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin Streptomycin (PAA-Laboratories) und 1 ml Natrium-Pyruvat-Lösung (500mM) versetzt.

Kulturbedingungen:

Um unreife dendritische Zellen zu erhalten werden $1-2 \times 10^6$ Monozyten pro 6-Well Platte ausgesiedelt und 7 Tage in komplementiertem RPMI 1640 mit 100 ng/ml Granulozyten/Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) und 100 ng/ml Interleukin 4 (IL-4) kultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgt ein 50%-tiger Mediumwechsel mit dem Zusatz derselben Menge an Zytokinen.

3.2.4 Inkubation mit Lactobacillen

Für die Versuche wurden die aliquotierten und durch serielle Verdünnung ausgezählten Lactobacillen (siehe 3.1) aufgetaut, dreimal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend in komplementiertem RPMI ohne Penicillin Streptomycin resuspendiert.

2×10^7 frisch isolierte PBMC bzw. 1.2×10^6 unreife dendritische Zellen wurden sowohl direkt (Abb. 3) als auch indirekt über einen differenzierten Caco-2 Monolayer im Transwell-System (Abb. 4) mit *Lactobacillus delbrueckii* und *Lactobacillus rhamnosus GG* oder einer 1:1 Mischung aus beiden Bakterienstämmen jeweils im Verhältnis 10:1 (KbE:Zelle) für 24 Stunden in 6 Well Platten inkubiert. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Zusätze und als Positivkontrolle wurde Lipopolysaccharid (LPS, Sigma, 1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die einzelnen Zellkulturüberstände wurden gesammelt, bei 2000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

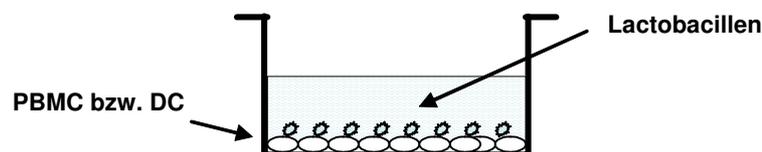


Abbildung 3: Design der Experimente (1)

Dendritische Zellen (DC) bzw. PBMC werden direkt mit Lactobacillen bzw. LPS für 24 Stunden inkubiert. Die Zellkulturüberstände werden für die Messung der Zytokine gesammelt.

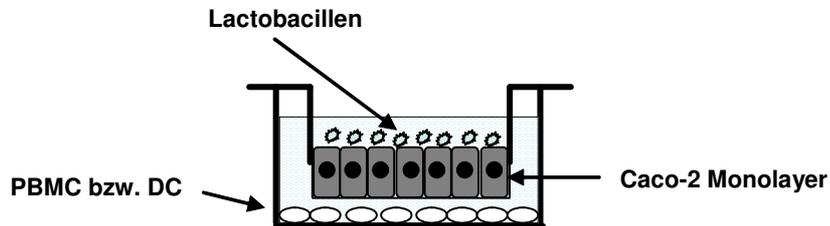


Abbildung 4: Design der Experimente (2)

Caco-2 Zellen werden 23 Tage auf permeablen Filtereinsätzen bis zur Bildung eines differenzierten epithelialen Monolayers gezüchtet. Dendritische Zellen (DC) bzw. PBMC werden auf der basolateralen Seite zugesetzt. Die Caco-2-dendritische Zellen- bzw. Caco-2-PBMC Cokultur wird apikal mit Lactobacillen bzw. LPS für 24 Stunden inkubiert. Die Zellkulturüberstände werden von der apikalen und der basolateralen Seite für die Analysen der Zytokine gesammelt.

3.3 RT-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung und Reverse-Transkriptase

Verarbeitung der Zellen:

- Zellen einmal mit eiskaltem PBS waschen
- 1 ml Trifast (Peqlab Biotechnologie GmbH) pro 6-Well für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren bis die Zellen gut gelöst sind
- in 1.5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) bei -20 °C lagern

Ablauf:

Für die RNA-Isolierung werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, nur Filterspitzen (Eppendorf) und RNase freie Reaktionsgefäße, die in autoklavierten Bechergläsern mit Alufolie verschlossen aufbewahrt werden,

verwendet. Alle Zentrifugierschritte werden in einer vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R) durchgeführt.

- die mit Trifast lysierten, eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur auftauen lassen
- Versetzen der Proben mit 0.2 ml Chloroform (VWR) pro ml Trifast, anschließend für 15 Sekunden kräftig schütteln
- Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (Zentrifuge auf 4°C vorkühlen)
- Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g für 5 Minuten, währenddessen frische Reaktionsgefäße vorbereiten, beschriften und 0.5 ml Isopropanol (VWR) pro ml Trifast vorlegen
- nach Zentrifugation sind drei Phasen erkennbar: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase (RNA) und eine dazwischen liegende Interphase (DNA, Proteine); die wässrige Phase in 90µl „Schritten“ (5-6x) vorsichtig abnehmen, in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführen
- die Proben mischen und für 30 Minuten (je nach RNA-Gehalt) auf Eis bzw. 4°C inkubieren
- anschließend 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugieren
- Abgießen des Überstandes und zweimaliges Waschen des Pellets mit 1 ml 75%igem Ethanol (VWR) durch Vortexen
- Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g für 10 Minuten
- wiederholtes Abgießen des Überstandes und Lufttrocknen des RNA-Pellets für etwa 10 Minuten (Vorsicht: ein vollständiges Trocknen verschlechtert die Löslichkeit der RNA)
- Aufnehmen und Lösen des Pellets in 24 µl DEPC - Wasser (Fermentas) und anschließendes Erhitzen auf 60°C für 10 Minuten im Thermocycler (Peqlab Biotechnologie GmbH)

Von der erhaltenen Probe wird die Reaktion im Doppelansatz mit je 12 µl in zwei Schritten durchgeführt:

- je 12 µl der Probe werden mit 1 µl Random Hexamer Primer (Fermentas) versetzt, im Thermocycler 10 Minuten bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gekühlt
- anschließend werden den Ansätzen je 7 µl Mastermix (MM) nach untenstehendem Rezept hinzugefügt und die Proben im Thermocycler bei 37°C für 60 Minuten inkubiert
- Herstellung vom Mastermix (alle dafür verwendeten Produkte wurden von der Firma Fermentas bezogen):

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen [µl]	End- konzentration
Puffer	5 x	4	1x
dNTPs	10mM	2	1mM
RNAse Inhibitor	40 U/µl	0.5	1 U/ µl
MuLV-RT	200 U/µl	0.5	5 U/ µl

- Um die Reaktion zu stoppen und die Reverse Transkriptase (Fermentas) zu denaturieren wird in einem letzten Schritt für 10 Minuten auf 70°C erhitzt
- Nach erfolgter Umschreibung werden die Proben bei -20°C gelagert

3.3.2 PCR

Prinzip:

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein Verfahren um spezifische, durch Primer flankierte Sequenzen von Nukleinsäuren zu amplifizieren. Benötigt werden dafür eine hitzestabile Polymerase, ein Puffer, Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), ein Primerpaar und die vier Deoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Jede PCR durchläuft ein zyklisches Temperaturprogramm, bestehend aus:

- Denaturierungsschritt bei 94-96 °C um DNA aufzuschmelzen
- Annealingschritt bei einer je nach Primer spezifischen Temperatur
- Elongationsschritt bei 72 °C. Während diesem Zyklus synthetisiert die Polymerase mit Hilfe der freien Nukleotide den fehlenden Strang

Das PCR-Produkt und somit der vervielfältigte DNA-Abschnitt kann im Anschluss durch ein Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wird die negativ geladene DNA durch ein aufgebautes Spannungsfeld in Richtung Anode gezogen und erfährt durch das dreidimensionale Gel einen größenabhängigen Widerstand. Durch die DNA-interkalierende Eigenschaft von Ethidiumbromid können DNA-Doppelstränge im UV-Licht nachgewiesen werden. Zur Identifizierung wird das PCR-Produkt mit einer DNA-Leiter, die Fragmente bekannter Größe enthält, verglichen. Im Anschluss erfolgt die Auswertung der Banden mittels PC-Software (Vision-capt von Peqlab).

Um Unterschiede in der cDNA-Menge auszugleichen wird GAPDH als Housekeeping-Gene (Gen dessen Expression konstant ist) mitamplifiziert.

Ablauf:

Das Primerdesign erfolgt mit der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Die für die PCR verwendeten Primer werden von der Firma VBC-Genomics in

lyophilisierter Form geliefert. Vor der Verwendung werden die Primer mit dem entsprechenden Volumen an sterilem destilliertem Wasser gelöst, um eine Konzentration von 10 pmol/ µl zu erhalten.

Herstellen des Mastermixes:

Sämtliche folgende Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

Zusammensetzung des Mastermixes für einen Ansatz (alle dafür verwendeten Produkte bis auf die Primer wurden von der Firma Fermentas bezogen):

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen [µl]	End- konzentration
Wasser, steril	-	31	-
Puffer	10 x	5	1x
MgCl ₂	25mM	5	2.5mM
dNTPs	10mM	4	0.8mM
Sense, antisense Primer	je 10pM	je 1,5	Je 0.3 pM
Taq-Polymerase	1 U/µl	1	0.02 U/ µl

Für alle Ansätze beträgt das eingesetzte Volumen Proben-cDNA 1 µl. Das Gesamtreaktionsvolumen der PCR beträgt somit 50 µl.

PCR – Programm:

- Initialer Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 Minuten
 - Denaturierung bei 94 °C für 40 Sekunden
 - Spezifische Annealingtemperatur für 1 Minute
 - Elongation bei 72 °C für 1 Minute
 - Finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 5 Minuten
 - Lagerung bei 4 °C
- } 25-35 Zyklen

Primersequenzen und Annealingtemperatur:

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
GAPDH	GGAGCCAAAAGGGTCATCATCTC GTCATGAGTCCTTCCACGATACC	62 °C
Sucrase- Isomaltase	CATCCTACCATGTCAAGAGCCA GCTTGTTAAGGTGGTCTGGTTT	60°C

Wahl der Zyklen:

Die Wahl der Zyklen wird so getroffen, dass einerseits eine ausreichende Amplifizierung zustande kommt, und andererseits sich die PCR nicht schon in der Plateauphase befindet. Die Reaktion endet in dieser, weil die Taq-Polymerase zunehmend inaktiviert wird, da sich die Konzentration an Pyrophosphat erhöht und sich das Verhältnis Primer zu DNA in eine ungünstige Richtung verschiebt.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen:

0.5 M EDTA-Lösung, pH 8

Um 200 ml dieser Lösung herzustellen werden 37.22 g EDTA (Sigma) in ca. 170 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

5 x TBE

54 g Tris-Base (Fluka), 27.5 g Borsäure (Sigma) und 20 ml der 0.5 M EDTA-Lösung werden in ca. 700 ml vollständig gelöst und anschließend wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Ablauf:

Verwendet werden je nach Größe des Produkts 1% bzw. 2% Agarose - Gele. Dafür werden pro Gel 0.4 g bzw. 0.8 g Agarose (Lonza) in 40 ml 1 x TBE gelöst und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend werden 20 µl Ethidiumbromid (0.5 mg/ml; Sigma) hinzugefügt und in eine Gelgieß-Apparatur (Peqlab Biotechnologie GmbH) gegossen. Nach Erstarren des Gels werden 15 µl des nach der PCR erhaltenen Produkts mit 3 µl 6 x Loading Dye Solution (Fermentas) vermischt, gevortext und auf das Agarose – Gel aufgetragen. Als Größenmarker wird eine standardisierte DNA – Leiter (50 bp oder 100 bp; Fermentas) verwendet.

Das Agarose Gel wird in der Elektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie GmbH) vollständig mit Elektrophoresepuffer (1 x TBE) bedeckt. Die Elektrophorese dauert circa 45 Minuten bei 100 V konstant und einer Stromstärke von 50 bis 60 mA.

Auswertung:

Zur Aufnahme des Agarose - Gels dient eine UV-Kammer mit PC und Software (Vision-capt; Peqlab).

3.4 Durchflusszytometrie

Prinzip:

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Untersuchung und Auftrennung von Zellen. Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren jeweils einzeln einen Laserstrahl, wobei das Licht gestreut, von Detektoren aufgefangen und in messbare elektrische Signale umgewandelt wird. Das Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) gibt Auskunft über die Größe und das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) über die Granularität der Zelle (Abb. 5). Zudem kann man mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifische Oberflächenmoleküle der Zellen analysieren. Je nach Laser-Ausstattung des Durchflusszytometers können

heutzutage bis zu 18 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden.

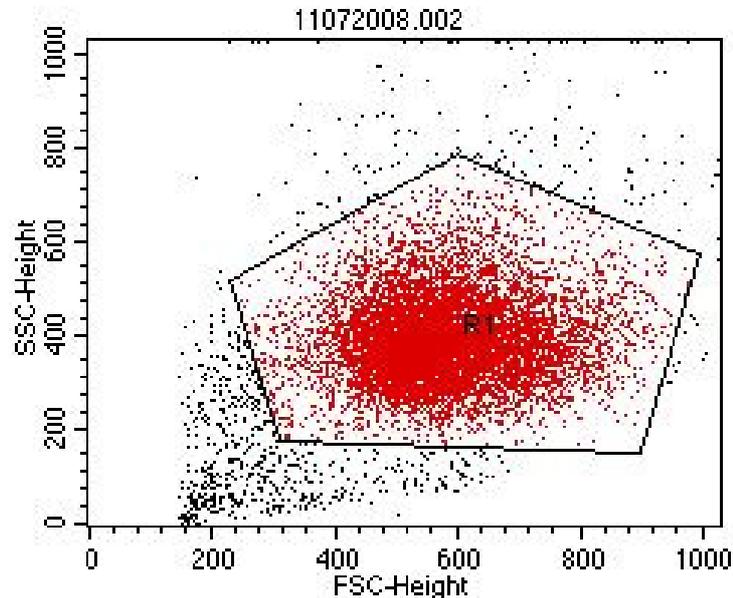


Abbildung 5: Dot-Plot Diagramm von dendritischen Zellen.

Die Zellpopulation in R1 (rot) wurde jeweils für die Überprüfung des Reifegrades herangezogen. Die Zellen wurden mit einem FACSCalibur™ gemessen und mittels CellQuestPro Software ausgewertet.

3.4.1 Überprüfung des Reifegrades von dendritischen Zellen

Benötigte Lösungen:

Färbepuffer

Für 200 ml Färbepuffer werden 200 mg Bovines Serum Albumin (BSA, Sigma) und 40 mg Natriumazid (Sigma) in 200 ml PBS gelöst, anschließend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Ablauf:

Folgende Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle von dendritischen Zellen (DC) werden verwendet: CD11c, CD14, CD54, CD80, CD83, CD86, CD209 und HLA-DR (BD Biosciences). Um

die Spezifität der Färbungen zu kontrollieren, werden Antikörper gleichen Isotyps und gleicher Konjugation aber ohne Bindungsfähigkeit verwendet (Isotyp-Kontrollen, BD Biosciences).

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt:

- die dendritischen Zellen werden mittels Zellschaber vollständig von den 6-Well Platten gelöst, zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert
- anschließend werden 10^5 Zellen in 100 μ l Färbepuffer gelöst und mit dem entsprechenden Antikörpermix (siehe nachfolgendes Schema) versetzt, je 5 μ l Antikörper werden für die Färbung von 10^5 Zellen eingesetzt

Der Antikörpermix wird nach folgendem Schema vorbereitet:

	Antikörper	Farbstoff
Röhrchen a	Mouse IgM	FITC (Fluorescein Isothiocyanat)
<i>Isotyp-Kontrolle</i>	Mouse IgG1	PE (Phycoerythrin)
	Mouse IgG2b	PerCP (Peridininchlorophyllprotein)
	Mouse IgG2a	APC (Allophycocyanin)
Röhrchen b	CD14	FITC
<i>Test 1</i>	CD86, CD209, CD83 (DC-Kit)	PE, PerCP, APC
Röhrchen c	CD80	FITC
<i>Test 2</i>	CD54	PE
	CD209	PerCP
	HLA-DR	APC
Röhrchen d	Mouse IgG2a	FITC
<i>Test 3 +</i>	CD11c	PE
<i>Isotyp-Kontrolle 2</i>	Mouse IgG1	APC

- die Zellen werden 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend einmal mit Färbepuffer gewaschen und in circa 400 µl Färbepuffer für die Analyse gelöst
- die Messungen der Ansätze erfolgen mit einem BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer und der zum Gerät gehörigen CellQuestPro Software (BD Biosciences)

3.4.2 Cytometric Bead Array

Prinzip:

Der Cytometric Bead Array (CBA) ist ein dem Sandwich ELISA ähnlicher Immunoassay, der Capture-Antikörper ist jedoch nicht an eine Mikrotiterplatte gebunden, sondern an Polymerkügelchen (Beads) gekoppelt. Jeder Bead ist mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, der an bestimmte Zytokine binden kann. Die Detektion der gebundenen Zytokine erfolgt durch Bindung von einem weiteren Antikörper, der mit einem Fluoreszenzmolekül (Phycoerythrin) konjugiert ist. Die Auftrennung der Beads und die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt im Durchflusszytometer. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man in einem geringen Probenvolumen mehrere Proteine gleichzeitig bestimmen kann.

Ablauf:

Für die Quantifizierung der Zytokine Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interferon γ (IFN-γ) in den gesammelten Zellkulturüberständen kam der CBA Human Soluble Protein Flex Set Assay von BD zum Einsatz.

Es wurden fünf Bead-Gruppen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die mit spezifischen Antikörpern für IL-1β, IL-10, IL-12, TNF-α und IFN-γ beschichtet waren, eingesetzt.

Die Analyse wird gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt: Die einzelnen lyophilisierten Zytokinstandards werden gepoolt, in 4 ml Assay

Diluent gelöst und für 15 Minuten bei Raumtemperatur zum Equilibrieren stehen gelassen. Durch serielle Verdünnung erhält man zehn Standards, wobei die Konzentration des unverdünnten Standards 2500pg/ml beträgt. Pro Probe werden 10 µl jeder der 5 Capture bead-Suspensionen vorbereitet und davon 50 µl je Probe in 5ml Röhrchen, gefolgt von je 50 µl Standard bzw. Probe pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur werden 50 µl Detektion Reagent hinzugefügt und für weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend werden 1 ml Waschpuffer zu jedem Röhrchen pipettiert und bei 200 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgegossen, in 300 µl Waschpuffer resuspendiert und im Anschluss im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) gemessen. Zur Einstellung des Gerätes wurden so genannte „Setup Beads“ nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der FCAP Array Software von BD.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und Prism 3.02 von GraphPad. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurden die Resultate von fünf unabhängigen Versuchen mit direkter Inkubation von dendritischen Zellen bzw. PBMC mittels one-way Anova und darauf folgendem Bonferroni's multiple comparison Test analysiert. Die Inkubationen im Transwellsystem wurden in je zwei unabhängigen Versuchen im Doppelansatz durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt festgelegt:

p<0.05.....signifikant

p<0.01.....hoch signifikant

p<0.001.....höchst signifikant

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Um das Design der einzelnen Experimente zu optimieren, wurden einige Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde ein geeigneter Differenzierungsmarker für Caco-2 Zellen etabliert und die Monolayerintegrität mittels TEER-Messungen analysiert. Außerdem wurde der Einfluss zweier Verhältnisse von Lactobacillen (KbE) zu dendritischen Zelle – 1:1 und 10:1 (KbE:dendritische Zelle) - auf die Reifung dendritischer Zellen überprüft.

4.1.1 Caco-2 Differenzierungsmuster und Monolayerintegrität

Zur genauen Untersuchung der Interaktionen zwischen Caco-2 Zellen, dendritischen Zellen oder PBMC und Lactobacillen ist eine differenzierte enterozytenähnliche Caco-2 Epithelzellschicht, die die Darmbarriere simuliert, erforderlich. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Expression des Enzyms Sucrase-Isomaltase als Marker zur Beurteilung der Differenzierung von Caco-2 Zellen herangezogen. Es zeigte sich, dass das Enzym bereits nach Erreichen der Konfluenz am Tag 7 exprimiert wird, wobei die Expression bis zur Bildung eines ausdifferenzierten Monolayers am Tag 23 deutlich ansteigt (Abb. 6).

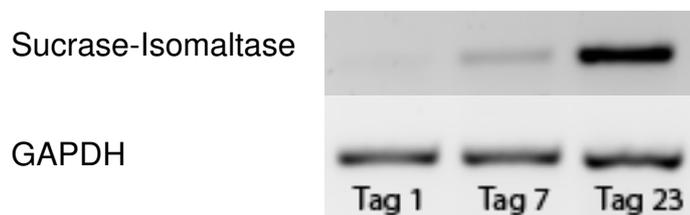


Abbildung 6: Sucrase-Isomaltase und GAPDH Expression in Caco-2 Zellen

Um die Funktion des Caco-2 Monolayers als Barriere sicherzustellen, wurde regelmäßig während der Differenzierung der TEER gemessen.

Im Laufe der Differenzierung von Caco-2 Zellen kommt es bis zum Tag 20 zu einem starken Anstieg des TEER, danach steigt dieser nur mehr geringfügig an (Abb. 7). Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Versuche wurde ein Minimum von 600 Ohm x cm² für die Sicherstellung der Monolayerintegrität festgelegt. Dieser Wert wurde auch nach der 24-stündigen Inkubation mit LPS bzw. Lactobacillen nicht unterschritten.

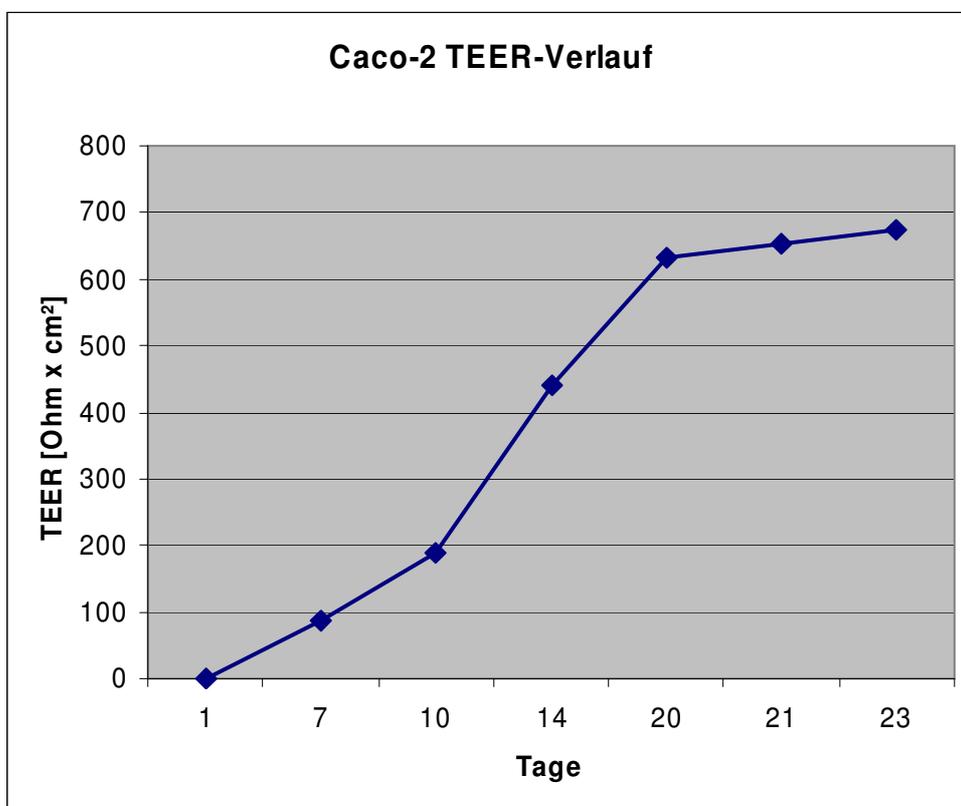


Abbildung 7: Caco-2 TEER-Verlauf

Zur Überprüfung der Monolayerintegrität wurden Caco-2 Zellen auf permeable Filtereinsätze ausgesiedelt und 23 Tage kultiviert. Der TEER wurde am Tag 7, Tag 10, Tag 14, Tag 20, Tag 21 und Tag 23 mit Hilfe eines Volttohmmeters gemessen und wurde entsprechend der Größe der Filtereinsätze in Ohm x cm² angegeben. Der Caco-2 TEER-Verlauf stellt den Mittelwert von sechs Messwerten dar und ist repräsentativ für alle im Transwell-System durchgeführten Versuche.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Caco-2 Zellen nach 23 Tagen eine differenzierte, enterozyten-ähnliche und intakte Monolayer-Barriere bilden.

4.1.2 Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen

Um den Einfluss der Anzahl an KbE von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen zu untersuchen und somit eine optimale Relation der beiden Größen zueinander definieren zu können, wurden unterschiedliche Verhältnisse von KbE zu dendritischer Zelle (1:1 und 10:1) getestet.

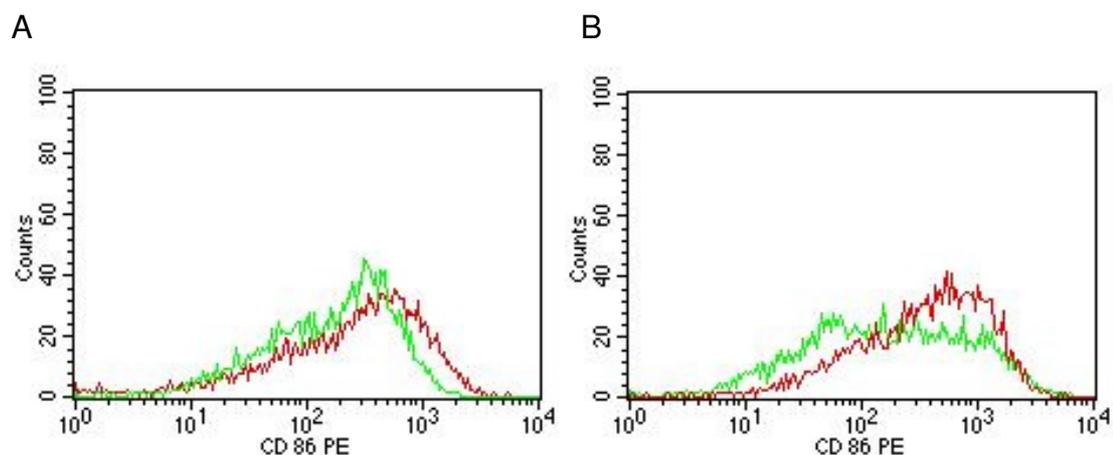


Abbildung 8: Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen (1) CD86 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit *L. delbrueckii* (A) bzw. *L. rhamnosus GG* (B) im Verhältnis 1:1 (grün) und 10:1 (rot)

Da das Verhältnis 10:1 eine deutlichere Veränderung der Oberflächenmarker bewirkte und daher den Reifungsgrad von dendritischen Zellen wesentlicher beeinflusst, wurde jenes auch für die Hauptversuche gewählt. Die Veränderungen der Expression von CD86 und CD209 durch den Einfluss der

Anzahl an KbE wurden repräsentativ für die übrigen Oberflächenmarker zur Veranschaulichung in zwei Abbildungen dargestellt (Abb. 8 und Abb. 9)

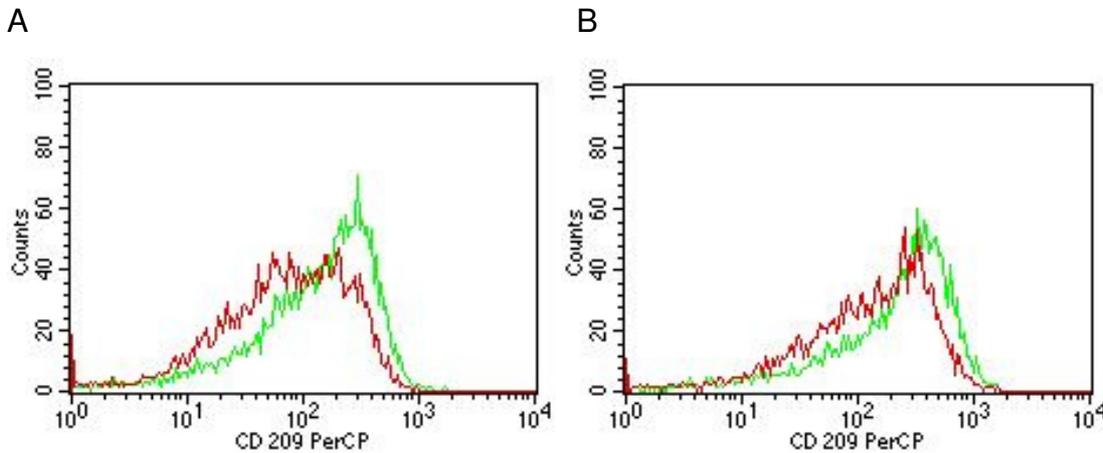


Abbildung 9: Der Einfluss der Anzahl an KbE auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen (2) CD209 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit *L. delbrueckii* (A) bzw. *L. rhamnosus GG* (B) im Verhältnis 1:1 (grün) und 10:1 (rot);

4.2 Der Einfluss von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen

4.2.1 Veränderungen der Oberflächenmarker

Im Zuge der Reifung von dendritischen Zellen kommt es einerseits zu einem Expressionsanstieg der co-stimulatorischen Moleküle CD83, CD86 und CD54, sowie dem Reifungsmarker CD83 und dem MHC-II Molekül HLA-DR, andererseits jedoch zur Herabregulierung der Expression von CD209, einem für dendritische Zellen spezifischen Adhäsionsrezeptor.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Lactobacillen einen Einfluss auf den Reifegrad dendritischer Zellen haben [Christensen *et al.*, 2002; Mohamadzadeh *et al.*, 2005; Zeuthen *et al.*, 2006; Fink *et al.*, 2007].

Dabei wurden jedoch meist nur wenige Oberflächenmarker analysiert und inaktivierte Lactobacillen verwendet.

Um den Effekt verschiedener Lactobacillen auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen zu untersuchen und etwaige Unterschiede in der Wirkungsweise des konventionellen und probiotischen Lactobacillusstamm zu identifizieren, wurden aus Monozyten generierte, unreife dendritische Zellen 24 Stunden mit LPS (als Positivkontrolle) *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* inkubiert und anschließend auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (CD14, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD54, CD209, HLA-DR) untersucht.

4.2.1.1 Expression von CD14 und CD11c

Um sicherstellen zu können, dass es sich bei den für die Versuche eingesetzten Zellen tatsächlich um dendritische Zellen handelt, wurde die Expression der beiden Oberflächenmarker CD14 und CD11c untersucht.

Der CD14-Rezeptor ist ein für Monozyten charakteristischer Oberflächenmarker, der im Laufe der Differenzierung zu dendritischen Zellen abnimmt.

Um die Effizienz der Differenzierung mit Interleukin 4 und GM-CSF zu überprüfen, wurden die dendritischen Zellen auf die Expression von CD14 untersucht. Alle für die Versuche eingesetzten dendritischen Zellen exprimierten CD14 nur in einem geringen Ausmaß. Auch nach Inkubation mit LPS, *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* kam es weder einzeln betrachtet, noch zwischen den untersuchten Bakterienstämmen zu keiner signifikanten Veränderung dieses Markers (Abb. 10).

Weiters wurden die dendritischen Zellen auf die Expression von CD11c, einem für myeloide dendritische Zellen spezifischen Marker, untersucht.

CD11c wurde auf allen dendritischen Zellen, auch nach der Inkubation mit LPS bzw. *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* konstant exprimiert (Abb. 11), wobei keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Effekten ausgemacht werden konnten.

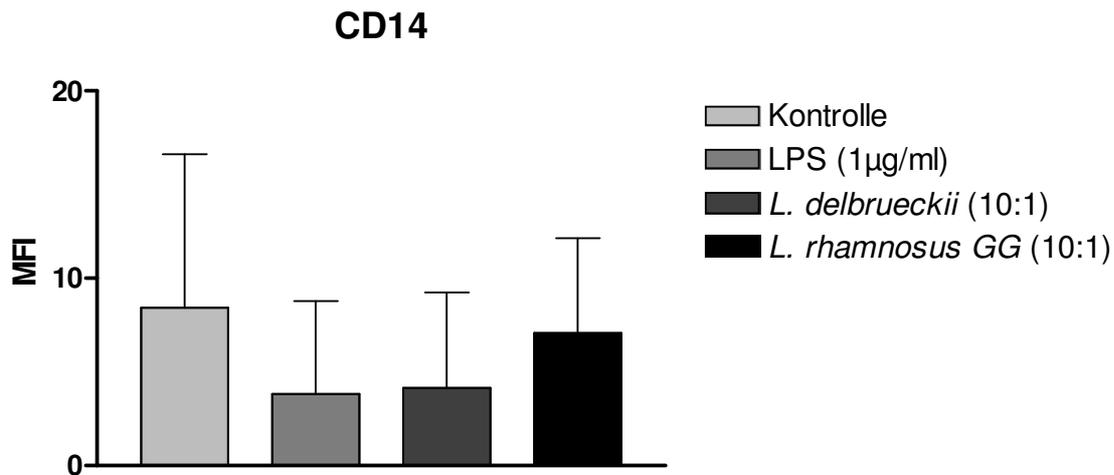


Abbildung 10: CD14 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD14 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von sieben unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

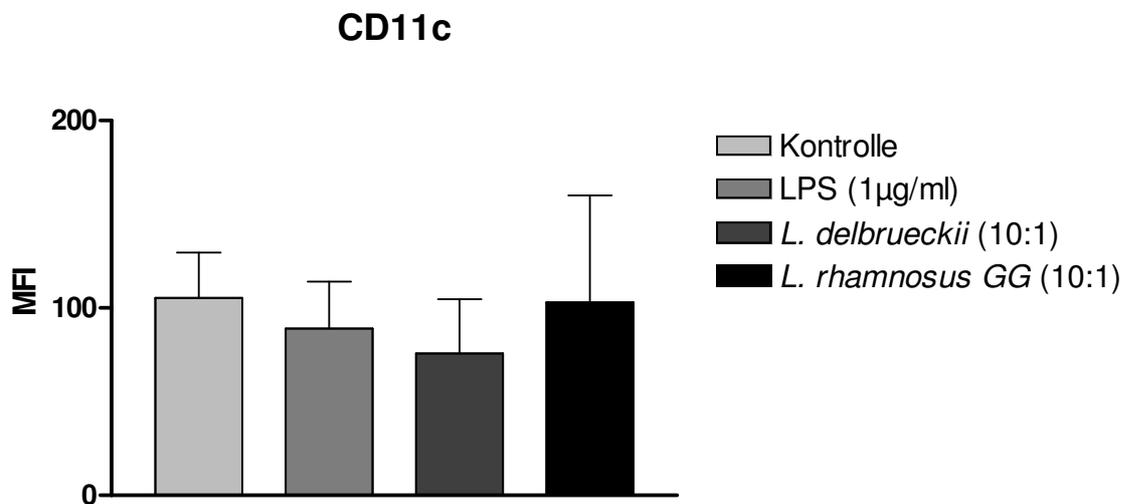


Abbildung 11: CD11c Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD11c wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von sieben unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die für die Versuche eingesetzten dendritischen Zellen kaum CD14 exprimierten, CD11c hingegen deutlich und dies konstant.

4.2.1.2 Expression von CD80, CD83, CD86 und CD54

CD80 oder auch B7.1 genannt, ist ein Mitglied der B7 Familie und gehört zu den co-stimulatorischen Molekülen, die von spezifischen T-Zellrezeptoren erkannt werden und somit für die Induktion der T-Zellantwort erforderlich sind.

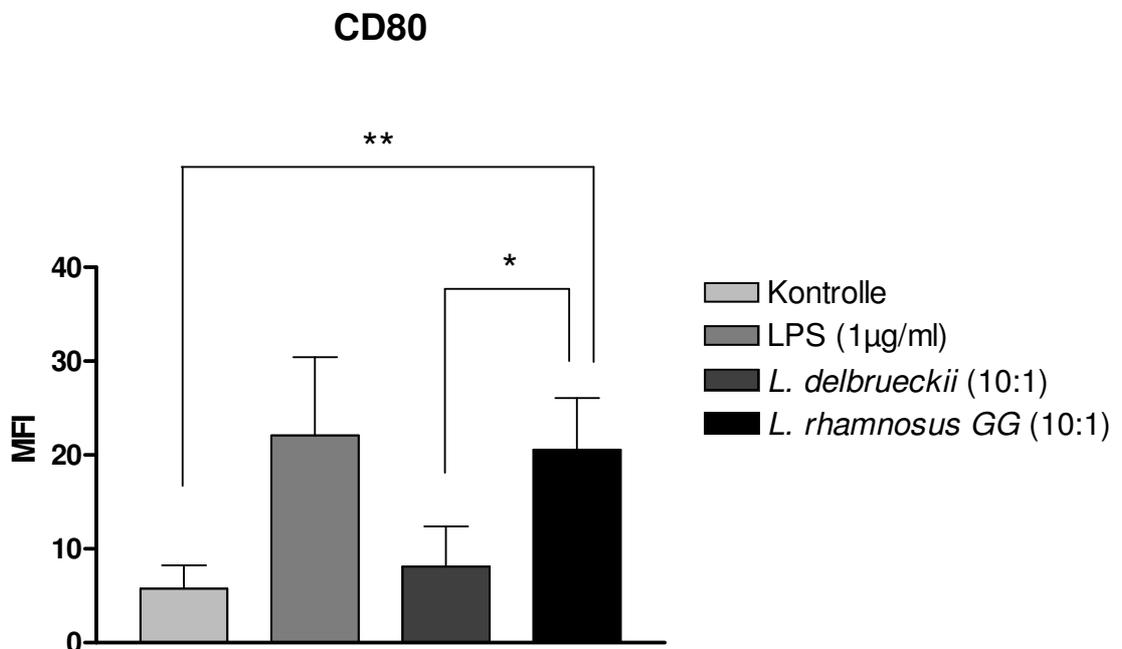


Abbildung 12: CD80 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD80 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Die 24 Stunden Inkubation der dendritischen Zellen mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* bewirkte einen Anstieg der CD80 Expression um das 3.8-,

1.4- und 3.6-fache (Abb. 12). Der durch *L. rhamnosus GG* ausgelöste Effekt ist statistisch hoch signifikant ($p < 0.01$) gegenüber der Kontrolle. Weiters konnte hinsichtlich der CD80 Expression ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den beiden Lactobacillusstämmen *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* festgestellt werden.

CD83 ist ein zur Immunglobulin Superfamilie zählendes Molekül, welches stark auf reifen dendritischen Zellen ausgeprägt ist.

Die Expression von CD83 konnte durch LPS und *L. rhamnosus GG* auf das 2.5- und 1.6-fache gesteigert werden. Inkubation mit *L. delbrueckii* hingegen führte zu keiner wesentlichen Veränderung dieses Oberflächenmarkers (Abb. 13). Bei diesen beobachteten Effekten konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

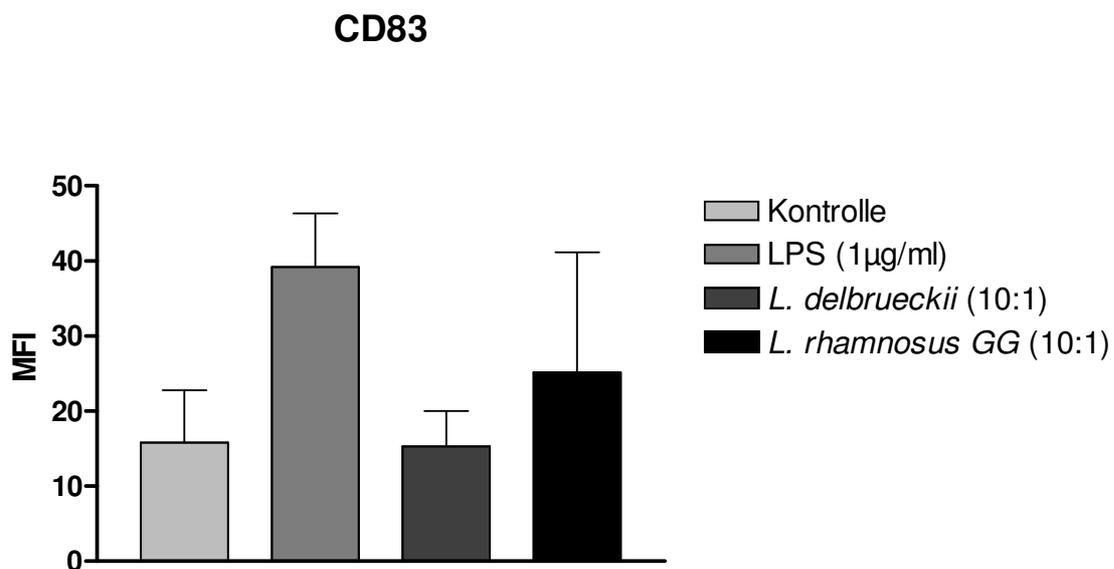


Abbildung 13: CD83 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD83 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

CD86 ist ebenfalls ein Mitglied der B7 Familie und wird daher auch als B7.2 bezeichnet. Als co-stimulatorisches Molekül spielt auch dieser Marker bei der Weitergabe der T-Zellantwort eine entscheidende Rolle.

Nach 24 Stunden Inkubation mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* konnte ein Expressionsanstieg von CD86 auf das 12-, 4.9- und 7.3-fache beobachtet werden (Abb. 14). Die Effekte der beiden Bakterienstämme *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* waren in der vorliegenden Untersuchung hoch ($p < 0.01$) bzw. höchst ($p < 0,001$) signifikant gegenüber der Kontrolle. Zwischen den untersuchten Lactobacillusstämmen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Effekts auf die CD86 Expression erfasst werden.

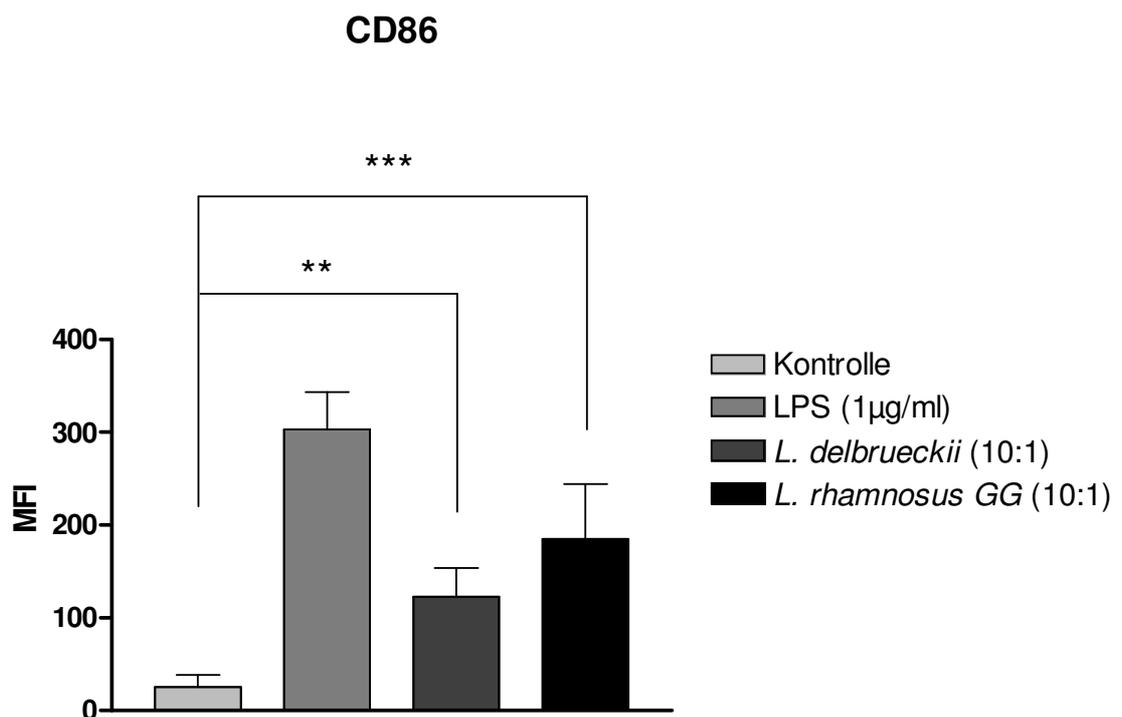


Abbildung 14: CD86 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD86 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

CD54 gehört wie CD80 und CD86 zu den co-stimulatorischen Molekülen und wird auch als intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) bezeichnet.

CD54 wurde nach 24-stündiger LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* Inkubation 2.6-, 1.4- und 1.9-mal höher exprimiert als bei der Kontrolle (Abb. 15), wobei lediglich der Effekt von *L. rhamnosus GG* eine statistisch hoch signifikante Veränderung ($p < 0.01$) darstellte. Ein Vergleich zwischen dem Einfluss des konventionellen und des probiotischen Lactobacillusstammes auf die Expression des CD54-Markers ließ jedoch keine signifikanten Differenzen erkennen.

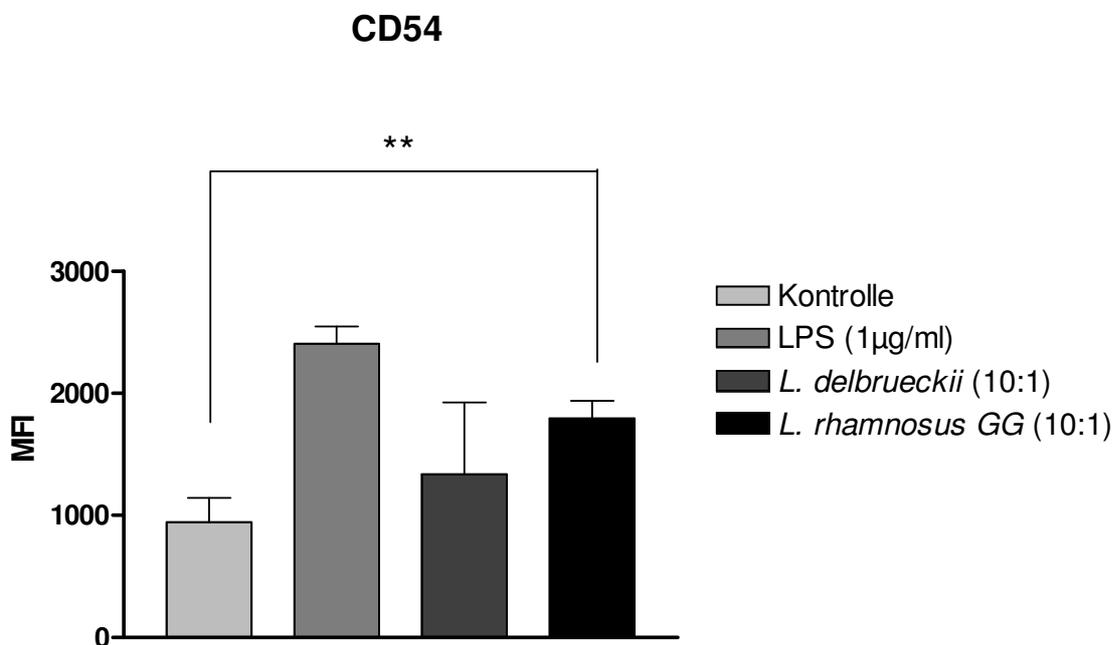


Abbildung 15: CD54 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD54 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (**: $p < 0.05$; one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

4.2.1.3 Expression von CD209

CD209 auch bekannt als DC-SIGN (DC-specific ICAM-grabbing non-integrin), wird an der Oberfläche von dendritischen Zellen exprimiert und ist für die Rezeptor-medierte Endozytose von Antigenen und die Interaktion mit T-Zellen erforderlich.

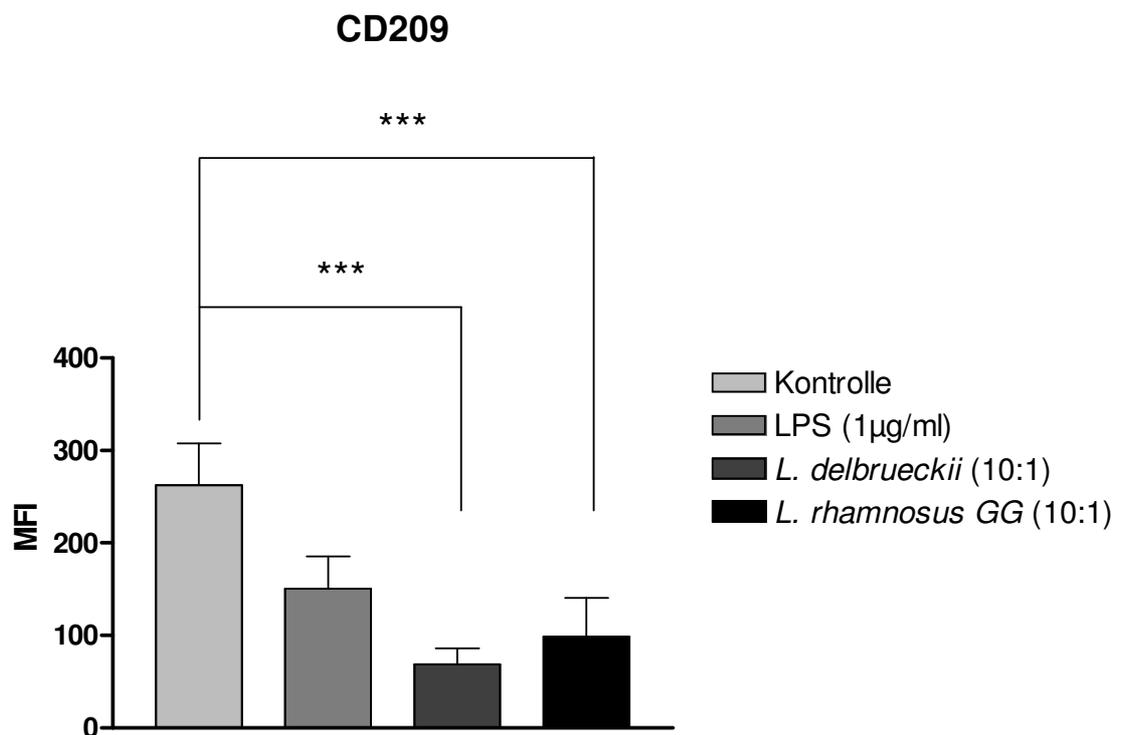


Abbildung 16: CD209 Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD209 wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Durch die 24 Stunden Inkubation mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* kommt es zu einer Reduktion der CD209 Expression um 27.4, 66.8 und 52.2 Prozent (Abb. 16). Sowohl nach *L. delbrueckii* als auch nach *L. rhamnosus GG*

Inkubation konnte eine höchst signifikante Veränderung ($p < 0.001$) der CD209 Expression auf dendritischen Zellen festgestellt werden.

Der Effekt des konventionellen *L. delbrueckii* und des probiotischen *L. rhamnosus GG* auf die Expression von CD209 war jedoch zwischen den beiden Stämmen nicht signifikant unterschiedlich ausgeprägt.

4.2.1.4 Expression von HLA-DR

HLA-DR ist ein Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse 2 (MHC-II) und wird für die Erkennung und Präsentation von Antigenen benötigt.

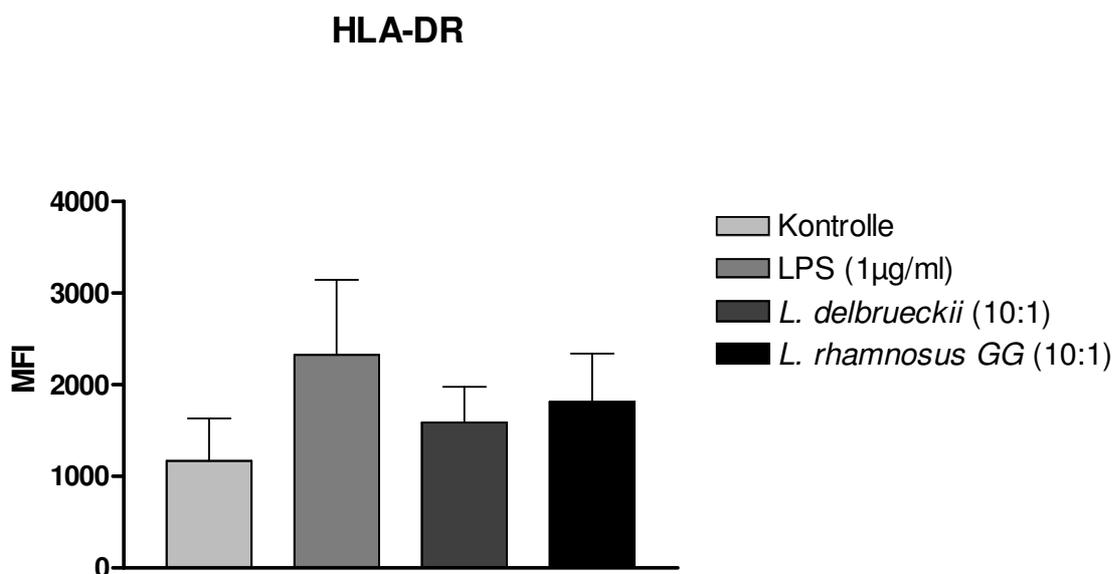


Abbildung 17: HLA-DR Expression auf dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von HLA-DR wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Die 24-stündige Inkubation mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* bewirkte eine Erhöhung der HLA-DR Expression um das 2-, 1.4- und 1.6-fache

(Abb. 17). Bei diesen Effekten konnte jedoch weder in Bezug auf die Positivkontrolle noch zwischen dem konventionellen und dem probiotischen Keim statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

Kurz zusammengefasst kann demnach festgehalten werden, dass 24 Stunden Inkubation mit probiotischem *L. rhamnosus GG* zu größeren und deutlicheren phänotypischen Veränderungen der Oberflächenmarker (CD80, CD83, CD86, CD54) bei dendritischen Zellen führt, als die Inkubation mit konventionellem *L. delbrueckii*. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den beiden Bakterienstämmen konnten lediglich bei einem einzigen Oberflächenmarker - bei CD80 - beobachtet werden. In Hinblick auf die Expression von CD209 und HLA-DR konnten in dieser Untersuchung keine nennenswerten, unterschiedlichen ausgeprägten Effekte des konventionellen bzw. probiotischen Lactobacillusstammes auf dendritische Zellen eruiert werden.

4.2.2 Bakterieninduzierte Zytokinsekretion

Da die Reifung von dendritischen Zellen nicht nur mit einer verstärkten Expression diverser Oberflächenmoleküle sondern ebenso mit einer erhöhten Zytokinsekretion einhergeht, welche für die Richtung der T-Zellantwort ausschlaggebend ist, wurde im Rahmen dieser Untersuchung neben den Oberflächenmarkern auch die Produktion von verschiedenen Zytokinen analysiert.

Nach der 24 Stunden Inkubation mit LPS, *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und anschließend mittels Cytometric bead array die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-12 und IFN- γ , sowie des antiinflammatorischen Zytokin IL-10 analysiert.

4.2.2.1 IL-1 β , TNF- α , IL-12 und IFN- γ

Die IL-1 β Sekretion konnte durch Inkubation der dendritischen Zellen mit *L. delbrueckii* hoch signifikant ($p < 0,01$) sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der LPS-Positivkontrolle gesteigert werden. *L. rhamnosus GG* Inkubation konnte die Sekretion von IL-1 β zwar ebenfalls um das 11.1-fache der Positivkontrolle erhöhen, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 18). Zwischen dem Ausmaß der durch *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* induzierten IL-1 β Sekretion konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

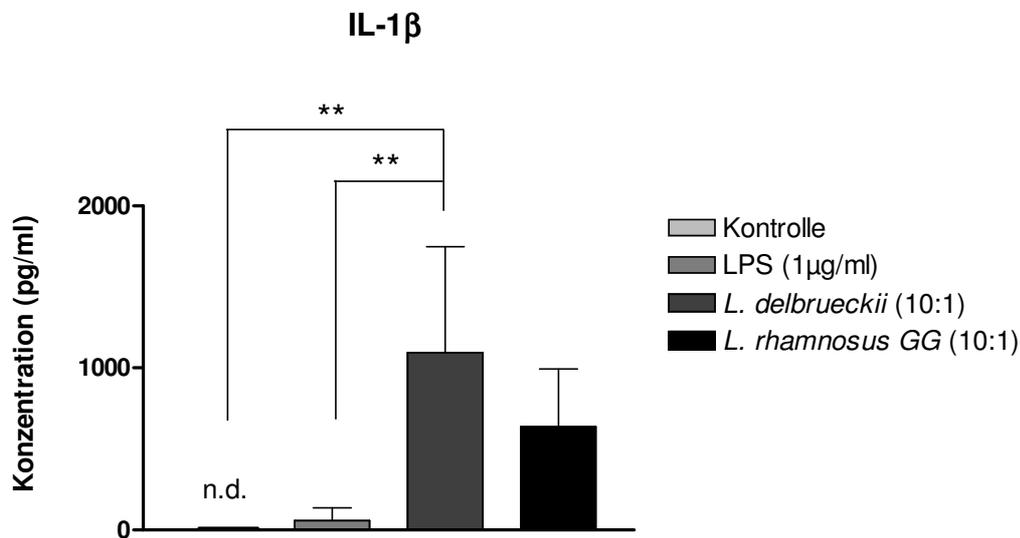


Abbildung 18: IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (**: $p < 0,01$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Auch die TNF- α Produktion der dendritischen Zellen wurde durch Inkubation mit beiden Lactobacillusstämmen erhöht, wobei jedoch in Bezug auf die Kontrolle nur der Effekt von *L. delbrueckii* signifikant ($p < 0,001$) ausgeprägt war. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die TNF- α Produktion durch

L. delbrueckii im Vergleich zu jener nach LPS Inkubation doppelt so groß war. Bei dem Effekt von *L. rhamnosus GG* auf die TNF- α Produktion konnte im Vergleich zur Kontrolle keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Abb. 19). Ein Vergleich der Effekte beider untersuchten Bakterienstämme zeigte, dass der konventionelle Keim *L. delbrueckii* die TNF- α Sekretion der dendritischen Zellen signifikant ($p < 0.05$) stärker stimulierte als der probiotische *L. rhamnosus GG*.

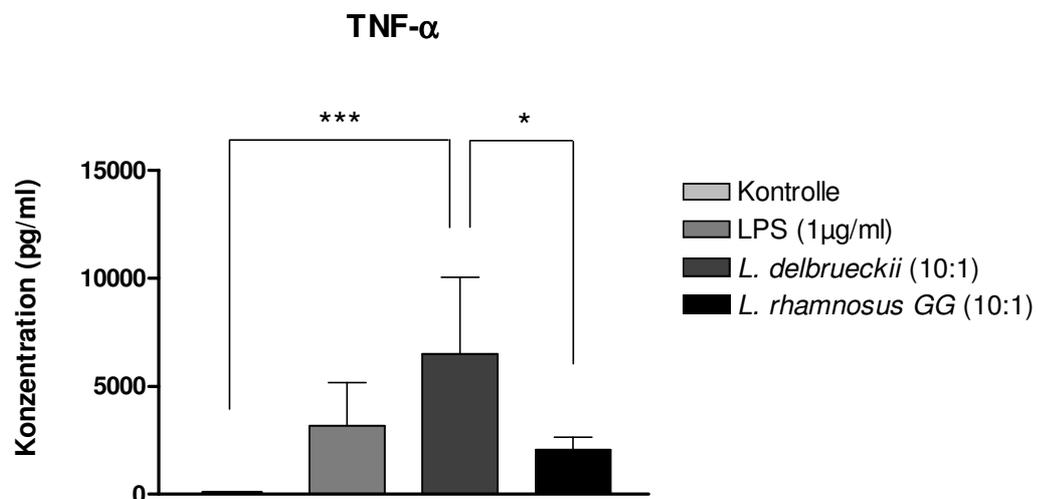


Abbildung 19: TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Weiters konnte *L. delbrueckii* die IL-12 Sekretion der dendritischen Zellen nach 24-stündiger Inkubation signifikant ($p < 0.05$) gegenüber der Kontrolle steigern, wobei das Level in etwa 3.5-mal so hoch lag wie nach LPS Inkubation. Die Behandlung der dendritischen Zellen mit *L. rhamnosus GG* ergab hingegen nur eine geringfügige nicht signifikante Erhöhung der IL-12 Sekretion (Abb. 20). Zwischen den beiden Bakterienstämmen konnte hinsichtlich der IL-12 Produktion ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) nachgewiesen werden.

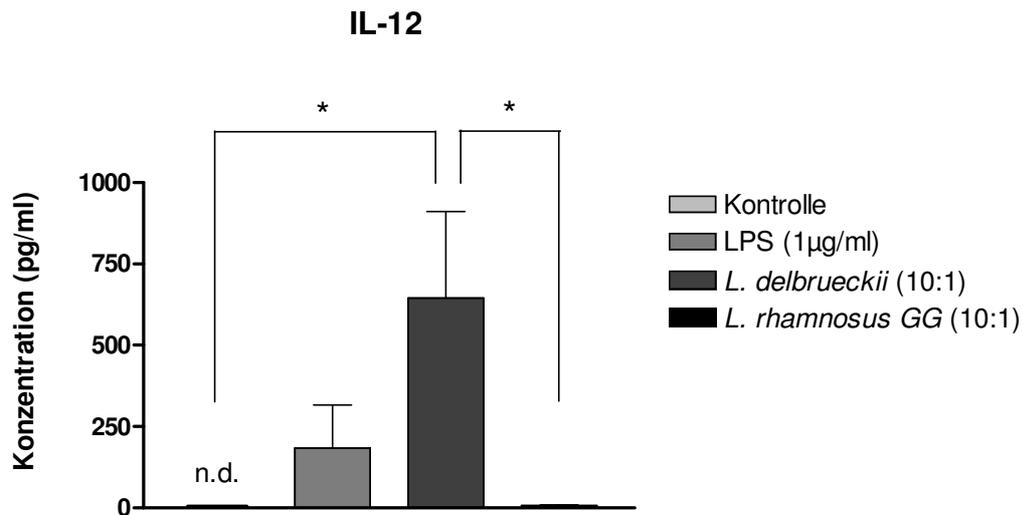


Abbildung 20: IL-12 Konzentration in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus* GG. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (*: $p < 0.05$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Weder *L. delbrueckii* noch *L. rhamnosus* GG konnte die Sekretion von IFN- γ von dendritischen Zellen wesentlich beeinflussen. Auch die 24 Stunden Inkubation mit LPS ergab nur eine geringfügige nicht relevante Erhöhung der IFN- γ Produktion.

4.2.2.2 IL-10

Nach Inkubation der dendritischen Zellen mit *L. delbrueckii* konnte im Zuge dieser Untersuchungen eine erhöhte IL-10 Sekretion beobachtet werden. Dieser Effekt ist sowohl zur Kontrolle als auch zur Positivkontrolle höchst signifikant ($p < 0.001$) bzw. hoch signifikant ($p < 0.01$). Inkubation mit *L. rhamnosus* GG führte ebenfalls zu einem jedoch nicht signifikanten Anstieg der Sekretion von IL-10 auf in etwa das Niveau der Positivkontrolle (Abb. 21), Weiters konnte hinsichtlich der IL-10 Produktion der dendritischen Zellen ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0.01$) zwischen dem Einfluss des

konventionellen und des probiotischen Keims nachgewiesen werden, wobei der Effekt von *L. delbrueckii* stärker ausgeprägt war.

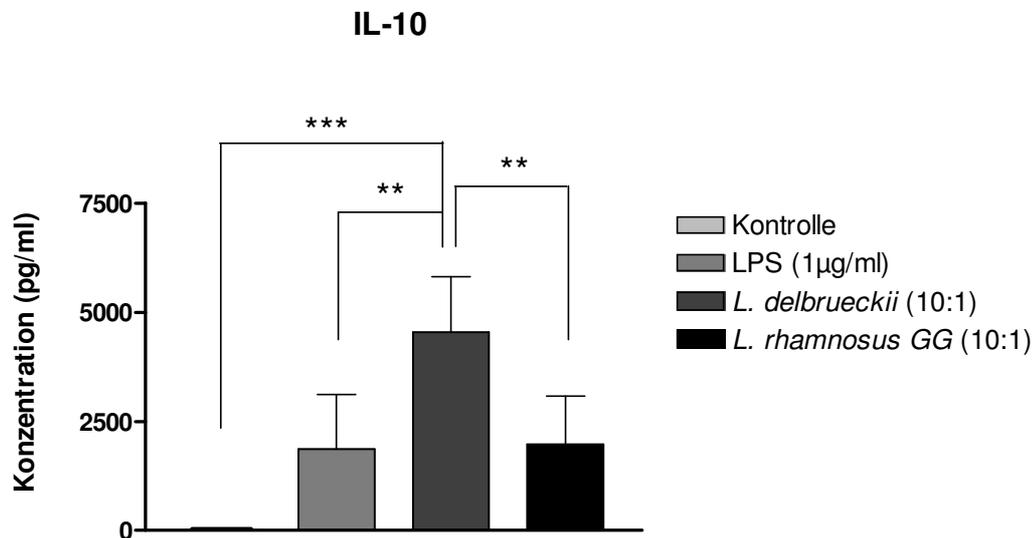


Abbildung 21: IL-10 Konzentration in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die 24 Stunden Inkubation der dendritischen Zellen mit *L. delbrueckii* zu einer generell weitaus deutlicheren Induktion der Zytokinsekretion (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-10) führt als jene mit *L. rhamnosus GG* bzw. LPS. Bei TNF- α , IL-12 und IL-10 konnten im Zuge dieser Untersuchung sogar signifikante Unterschiede in der Wirkungsweise der beiden Bakterienstämme beobachtet werden.

4.3 Der Einfluss von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* auf den Reifungsgrad dendritischer Zellen im Transwell-System

Um herauszufinden, welche Auswirkungen eine Barriere von Epithelzellen ähnlich der Darmmukosa auf den Reifungsgrad und die Zytokinsekretion dendritischer Zellen haben könnte, wurden in einer weiteren Versuchsanordnung unreife dendritische Zellen indirekt über einen enterozyten-ähnlichen Caco-2 Monolayer im Transwell-System 24 Stunden mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus GG* inkubiert und anschließend auf die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, CD54, CD209 und HLA-DR untersucht, sowie in den gesammelten Zellkulturüberständen der basolateralen Seite die Zytokinkonzentration von IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ und IL-10 mittels CBA bestimmt.

Mit dieser Versuchsanordnung sollte *in vitro* der Effekt von konventionellem bzw. probiotischem Lactobacillusstamm untersucht werden, den diese im menschlichen Darm bzw. auf die basolateralen dendritischen Zellen, welche den Schnittpunkt zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem darstellen, und somit für die immunmodulierende Wirkung von Probiotika von großer Bedeutung sind, ausüben.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von dendritischen Zellen mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* über einen ausdifferenzierten Caco-2 Monolayer weder eine nennenswerte Veränderung der Oberflächenmarker (CD80, CD83, CD86, CD54, CD209, HLA-DR) von dendritischen Zellen bewirken (Abb. 22), noch eine Sekretion der Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-10) auf der basolateralen Seite des Modells induzieren.

Sowohl die Expression der gesamten Oberflächenmarker, als auch die Produktion der analysierten Zytokine blieben aufgrund der Monolayer Barriere des Modells durch die Einwirkung von konventionellen bzw. probiotischen Lactobacillus unbeeinflusst.

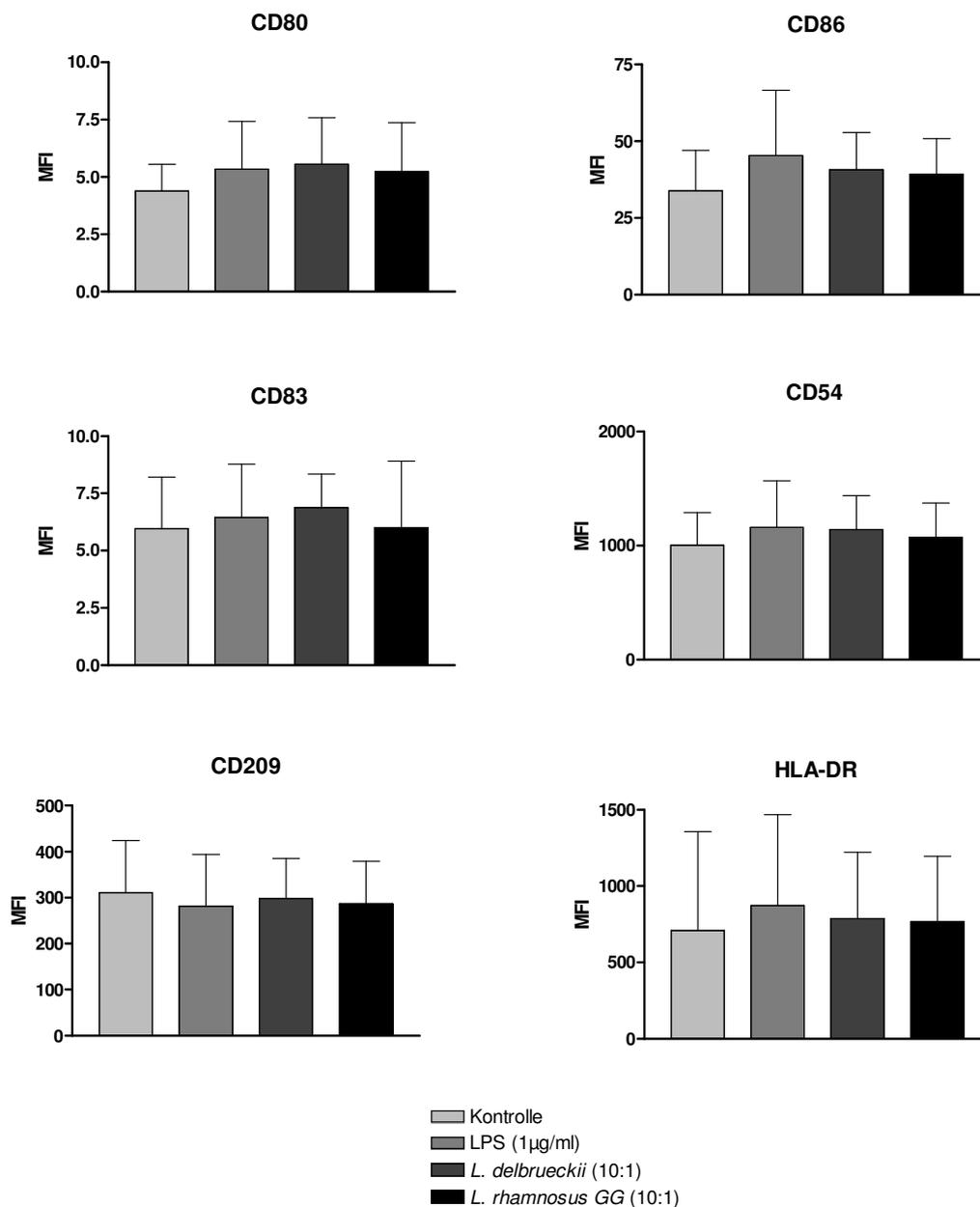


Abbildung 22: CD80, CD86, CD83, CD54, CD209 und HLA-DR Expression auf dendritischen Zellen, die indirekt über einen differenzierten Caco-2 Monolayer 24 Stunden mit Medium (Kontrolle), LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* inkubiert wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde mit der Software CellQuestPro von BD bestimmt. Die Diagramme zeigen jeweils den Mittelwert von 2 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

4.4 Bakterieninduzierte Zytokinsekretion von PBMC

Um in einem weiteren *in vitro* Modell die Auswirkungen von Lactobacillen auf die Zytokinsekretion zu untersuchen, wurden PBMC wiederum 24 Stunden mit LPS, *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* inkubiert und in den gewonnenen Zellkulturüberständen die Konzentration von IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , und IL-10 mittels CBA bestimmt. Im Zuge dieser Versuchsreihe wurde auch eine 24 Stunden Inkubation mit einer 1:1 Mischung aus beiden Bakterienstämmen inkuldiert, um die Wirkung der Kombination aus beiden Keimen zu untersuchen.

4.4.1 IL-1 β , TNF- α , IL-12, INF- γ

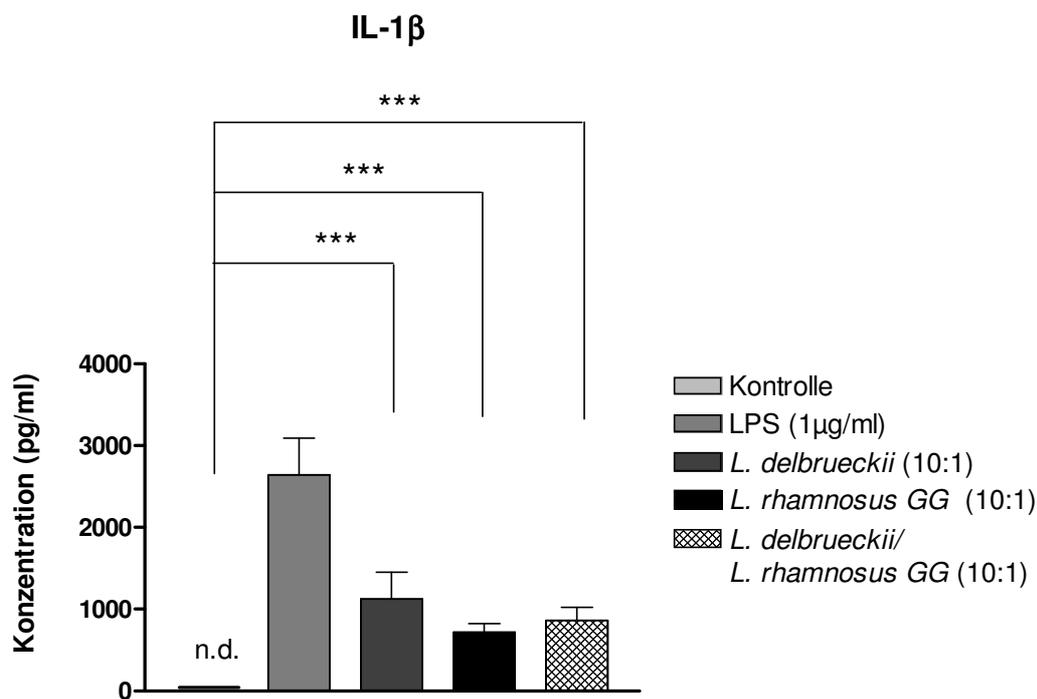


Abbildung 23: IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus GG* sowie einer 1:1 Mischung aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von sechs unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Sowohl *L. delbrueckii* als auch *L. rhamnosus GG* Inkubation sowie die Inkubation mit beiden Bakterienstämmen konnte die IL-1 β Sekretion im nahezu gleichen Ausmaß und verglichen zur Kontrolle höchst signifikant steigern ($p < 0.001$), (Abb. 23).

Zwischen dem Effekt des konventionellen, des probiotischen Keimes und der Mischung aus beiden konnten in diesem Modell keine nennenswerten Differenzen hinsichtlich der IL-1 β Produktion erfasst werden.

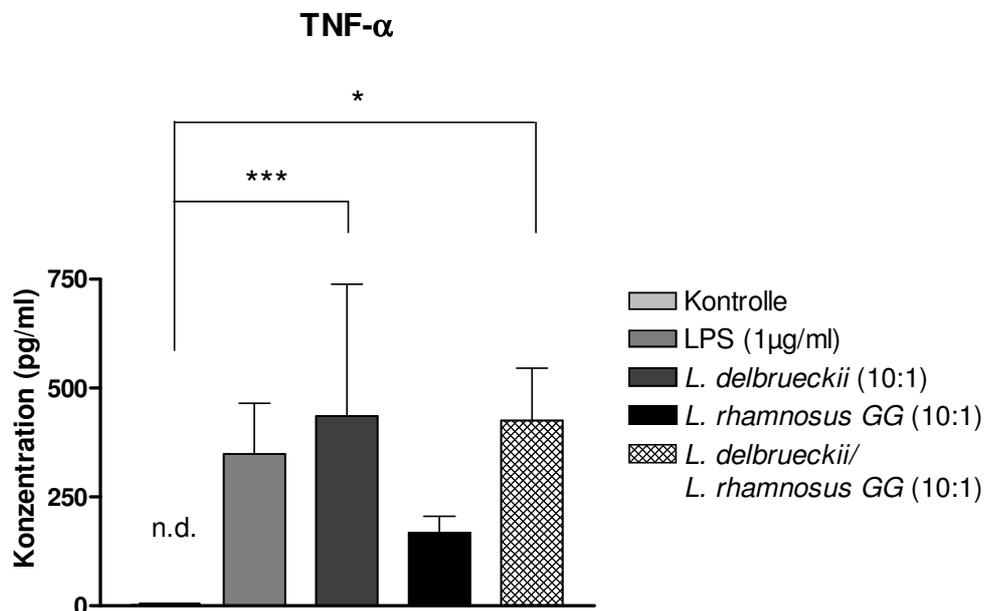


Abbildung 24: TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus GG* sowie einer 1:1 Mischung aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von sechs unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

Durch Inkubation von PBMC mit *L. delbrueckii* und der Mischung aus beiden Lactobacillen kam es zu einem deutlichen Anstieg der TNF- α Sekretion. Diese Effekte erwiesen sich gegenüber der Kontrolle als statistisch signifikant ($p < 0.001$; $p < 0.05$) und lagen sogar etwas höher als der Effekt der LPS

Positivkontrolle. *L. rhamnosus GG* Inkubation führte ebenso zu einer erhöhten jedoch nicht signifikanten TNF- α Sekretion durch PBMC (Abb. 24). Obwohl die Auswirkungen von *L. delbrueckii* sowie der Kombination aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* auf die TNF- α Produktion von PBMC stärker ausgeprägt war als jene von *L. rhamnosus GG*, konnte die Differenz nicht als signifikant bewertet werden.

Im angewandten Testsystem konnte die Sekretion von IL-12 und IFN- γ weder durch 24-stündige LPS, noch durch 24-stündige Inkubation mit *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus GG* bzw. der Mischung aus beiden Bakterienstämmen angeregt werden.

4.4.2 IL-10

Die IL-10 Produktion der PBMC konnte im vorliegenden Modell sowohl durch Inkubation mit *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* als auch durch Inkubation mit der Mischung beider Stämme höchst signifikant ($p < 0.001$) gesteigert werden (Abb. 25). Zwischen den Effekten der beiden Bakterienstämme sowie der Mischung aus konventionellem und probiotischem Keim konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden.

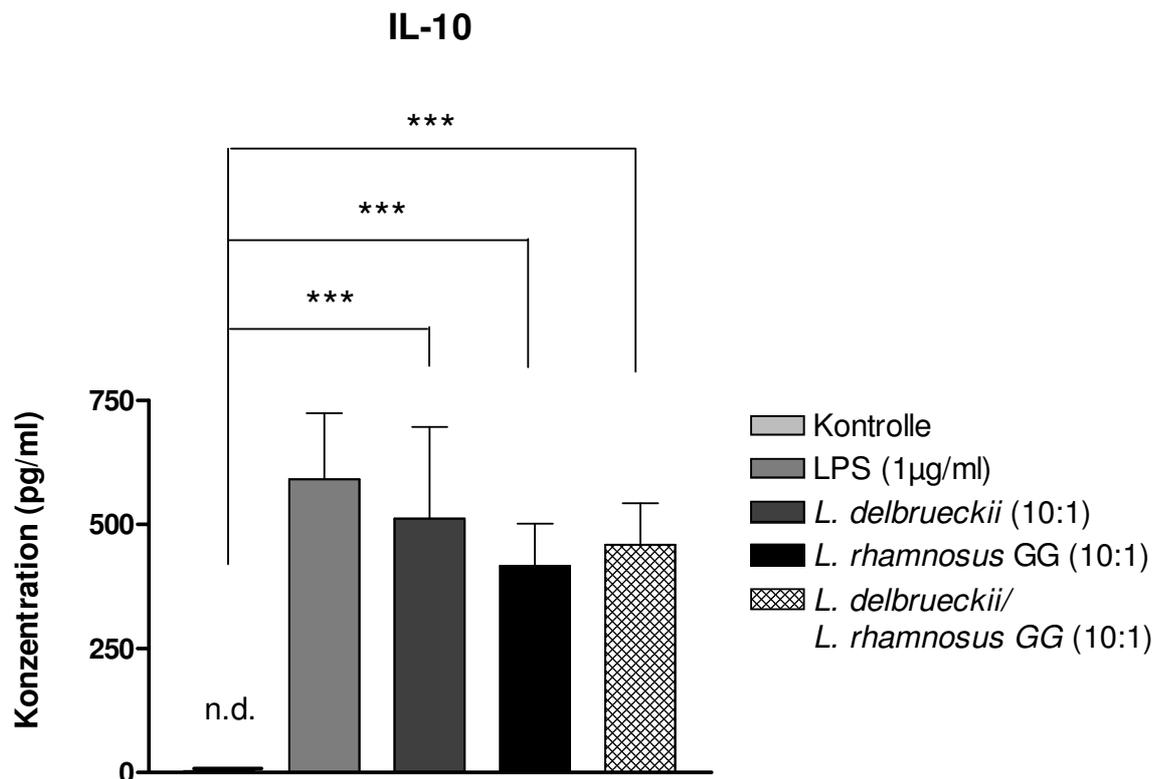


Abbildung 25: IL-10 Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC nach 24 Stunden Inkubation mit LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus* GG sowie einer 1:1 Mischung aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus* GG. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert von sechs unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (***: $p < 0.001$, one-way Anova mit Bonferroni's multiple comparison Test).

4.5 Transwell-System versus direkter Kontakt zwischen Lactobacillen und PBMC

Mit Hilfe des Caco-2/PBMC Transwell-Systems sollte getestet werden, ob die Barriere eines ausdifferenzierten Caco-2 Monolayers die bakterieninduzierte Zytokinsekretion von PBMC verändert.

Dazu wurden PBMC im Gegensatz zur direkten Inkubation, indirekt über einen enterozyten-ähnlichen Caco-2 Monolayer im Transwell-System 24 Stunden mit

LPS, *L. delbrueckii* bzw. *L. rhamnosus* GG inkubiert und anschließend in den gesammelten Zellkulturüberständen der basolateralen Seite die Zytokinkonzentration von IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , und IL-10 mittels CBA bestimmt.

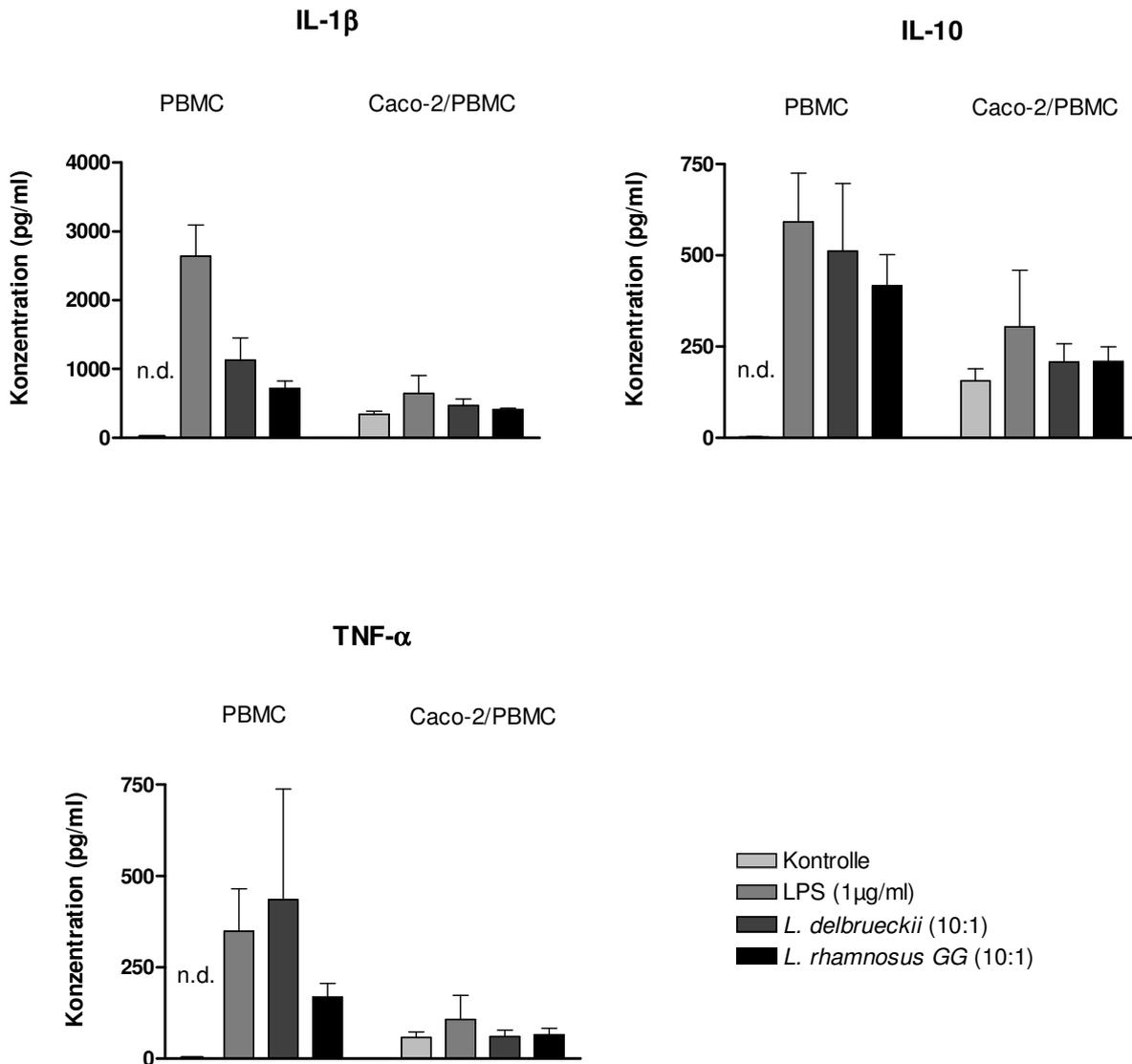


Abbildung 26: IL-1 β , IL-10 und TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC die entweder direkt oder indirekt über einen ausdifferenzierten Caco-2 Monolayer im Transwell-system 24 Stunden mit Medium (Kontrolle), LPS (Positivkontrolle), *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus* GG inkubiert wurden. Die Konzentration (pg/ml) wurde mit CBA und der FCAP Array Software von BD ermittelt. Die Diagramme zeigen einerseits den Mittelwert von sechs unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (PBMC) und andererseits den Mittelwert von 2 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung (Caco-2/PBMC).

Ein Vergleich der beiden Modelle ließ einen deutlichen Unterschied der Zytokinkonzentrationen von IL-1 β , TNF- α und IL-10 zwischen den zwei Testsystemen erkennen (Abb. 26). Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α und des antiinflammatorischen IL-10 war durch direkten Kontakt von Lactobacillen und PBMC wesentlich stärker ausgeprägt als bei indirekter Inkubation im Transwell-Modell. Weiters unterschieden sich die Auswirkungen des konventionellen *L. delbrueckii* bzw. des probiotischen *L. rhamnosus GG* auf die genannten Zytokine im Transwell-System nur unwesentlich.

Nicht nur durch die Inkubation mit LPS und den beiden Lactobacillusstämmen, sondern auch in der unbehandelten Kontrolle, konnte ein wesentlicher Anstieg dieser Zytokine im Transwell-Modell vermerkt werden. Die Zytokinkonzentrationen der Positivkontrolle wurde durch die Inkubation über die Caco-2 Barriere auf etwa ein Drittel bzw. die Hälfte der durch direkte Inkubation erzielten Effekte reduziert.

Generell konnte festgestellt werden, dass die durch Inkubation mit Lactobacillen gewonnenen Effekte in Bezug auf IL-1 β , TNF- α und IL-10 Produktion im direkten Modell deutlich stärker ausgeprägt waren, als bei der Anwesenheit der Caco-2 Barriere durch welche die Effekte des konventionellen bzw. probiotischen Keimes auf dem Niveau der Kontrolle blieben.

Die Zytokine IL-12 und IFN- γ konnten auch im Transwell-System weder in der Kontrolle noch bei den Inkubationen mit LPS und den beiden Bakterienstämmen nachgewiesen werden, da die Konzentrationen unter dem Detektionslimit lagen.

5 Diskussion und Schlussbetrachtung

5.1 Beeinflussung des Reifegrades dendritischer Zellen durch *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG*

Antigenpräsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen, spielen sowohl in der Erhaltung der Th1/Th2 Balance als auch in der Entwicklung von Toleranz eine entscheidende Rolle. Es gibt verschiedene Untergruppen von dendritischen Zellen und je nach umgebenden Stimulus, spezifischer Untergruppe oder ihrer Aktivierungskinetik können dendritische Zellen die Immunantwort steuern [Moser, 2003]. Aufgrund dieser zentralen Bedeutung von dendritischen Zellen im Immunsystem wird angenommen, dass Lactobacillen ihre immunmodulierende Wirkung unter anderem auch durch Beeinflussung des Reifegrades dendritischer Zellen entfalten können.

Im Zuge dieser Arbeit wurde daher der Einfluss des konventionellen Lactobacillusstammes *L. delbrueckii*, des probiotischen Lactobacillusstammes *L. rhamnosus GG* und LPS auf den Reifegrad dendritischer Zellen untersucht. Es konnte dabei übereinstimmend mit der Literatur gezeigt werden, dass Lactobacillen einen Einfluss sowohl auf die Expression diverser Oberflächenmoleküle als auch auf die Zytokinsekretion von dendritischen Zellen haben, wobei die einzelnen Effekte zwischen den beiden Bakterienstämmen teilweise signifikant unterschiedlich ausgeprägt waren. Während probiotischer *L. rhamnosus GG* deutlichere phänotypische Veränderungen der Oberflächenmarker – vor allem CD80, CD83, CD86 und CD54 - bei dendritischen Zellen bewirkte, konnte konventioneller *L. delbrueckii* eine durchwegs stärkere Zytokinantwort – insbesondere von IL-1 β , TNF- α , IL-12 und IL-10 - in dendritischen Zellen induzieren. Welche Ursachen diesen beobachteten Unterschiede zu Grunde liegen bzw. ob diese Effekte stammspezifisch sind oder eventuell aus dem experimentellen Design

(Inkubationsdauer, Zellzahl...) resultieren, sollte daher in weiteren Untersuchungen eruiert werden.

Die Fähigkeit von Lactobacillen je nach Bakterienstamm die Produktion unterschiedlicher Zytokinmuster in dendritischen Zellen auslösen zu können, könnte unter anderem mit unterschiedlich exprimierten Molekülen und Strukturen an der Oberfläche dieser Mikroorganismen zusammenhängen. Daneben besitzen Bakterien die Fähigkeit aktive Proteine und Peptide zu sezernieren, welche die Wirtszellen stimulieren und dadurch ebenfalls für die Auslösung einer Immunantwort bzw. die Zytokinsekretion von Bedeutung sein könnten [Hoarau *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007].

Die Ergebnisse der Zytokinanalysen der vorliegenden Studie zeigte, dass *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und IL-12, jedoch nicht IFN- γ induzieren konnten. Ein positiver Nutzen dieses Effektes auf die menschliche Gesundheit wird insbesondere in Bezug auf die Prävention von Allergien angenommen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die, als Antwort auf die Stimulierung mit Lactobacillen von dendritischen Zellen produzierten, proinflammatorischen Zytokine eine geringfügige Entzündung hervorrufen, die allergieanfällige Personengruppen vor der Entwicklung einer Allergie schützen könnte [Marschan *et al.*, 2008].

Nicht nur die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sondern auch die Produktion von antiinflammatorischem IL-10 konnten durch Stimulierung mit *L. delbrueckii* sowie *L. rhamnosus GG* in dendritischen Zellen hervorgerufen werden. IL-10 wirkt durch Herabsetzung der IL-12 und IFN- γ Produktion antiinflammatorisch und kann dadurch zur Entwicklung von Th2 und Th3 Immunreaktionen führen. Es wird angenommen, dass probiotische Mikroorganismen intestinale dendritische Zellen so beeinflussen, dass sie T-reg Zellen induzieren und aktivieren, sodass sich dadurch eine konstante immunsupprimierte Umgebung entwickelt [Christensen *et al.*, 2002].

Die Ergebnisse dieser Untersuchung untermauern die Hypothese, dass Lactobacillen einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase im Darm liefern können.

Da humane intestinale dendritische Zellen schwer in ausreichender Menge isoliert werden können, haben sich bisherige *in vitro* Studien, die sich mit dem Einfluss bekannter sowie potentieller Probiotika auf Reifegrad und Zytokinsekretion dendritischer Zellen auseinandersetzten, hauptsächlich auf, aus humanen Monozyten generierte dendritische Zellen und auf murine, aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen beschränkt.

Es gibt Hinweise darauf, dass Lactobacillen und Bifidobakterien verschiedene Zytokinmuster in dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut und in dendritischen Zellen, die aus den Mesenteriallymphknoten isoliert wurden, bewirken [O'Mahony *et al.*, 2006]. Hart *et al.* fanden heraus, dass Zellwandbestandteile von probiotischen Mikroorganismen qualitativ, jedoch nicht quantitativ ähnliche Effekte auf periphere dendritische Zellen und dendritische Zellen, die aus der Lamina propria des Colon isoliert wurden, erzielen [Hart *et al.*, 2004]. Da jedoch mukosale dendritische Zellen hauptsächlich aus myeloiden dendritischen Zellen bestehen und sich diese aus Monozyten entwickeln [Bell *et al.*, 2001], sind aus Monozyten generierte dendritische Zellen trotzdem ein sensibles Modell für Antigenpräsentierende Zellen um die immunmodulierende Wirkung von Bakterien zu untersuchen, obwohl sie gewebespezifische dendritische Zellen nicht vollständig widerspiegeln können.

5.2 Effekte von Lactobacillen auf dendritische Zellen im Transwell-System

Dendritische Zellen können zwar durch Periskop-artige Fortsätze das Darmepithel überwinden und dadurch nicht invasive Bakterien aus dem Lumen aufgreifen [Rescigno *et al.*, 2001a; Rescigno *et al.*, 2001b; Niess *et al.*, 2005], es sind jedoch nur eine sehr geringe Anzahl an Mikroorganismen in direktem Kontakt mit dendritischen Zellen, während der wesentliche Anteil mit entsprechenden Zellen über das Darmepithel interagiert. Im Zuge dieser Studie wurde daher der Effekt der beiden getesteten Lactobacillusstämme in einem

Transwell-System, wo eine ausdifferenzierte, enterozyten-ähnliche Caco-2 Barriere die Bakterien von den basolateral liegenden dendritischen Zellen trennt, untersucht.

Diese Experimente zeigten, dass die zuvor beobachteten Effekte von Lactobacillen auf dendritische Zellen durch die Anwesenheit des differenzierten Caco-2 Monolayers im Transwell-System vollständig inhibiert wurden. Weder die Expression der Oberflächenmarker (CD80, CD83, CD86, CD54, CD209, HLA-DR) noch die Zytokinsekretion (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-10) wurde durch die indirekte Inkubation von dendritischen Zellen mit Lactobacillen bzw. LPS beeinflusst. Durch die im Transwell-System verwendeten Filtereinsätze mit einem Porendurchmesser von 0.4 μ m konnte ein Durchdringen von Mikroorganismen verhindert werden und dadurch ausschließlich der Crosstalk zwischen Caco-2 Zellen und dendritischen Zellen untersucht werden.

Zeuthen et al. untersuchten in einer Studie die Effekte unterschiedlicher gram-positiver sowie gram-negativer Bakterien im Transwell-System, wobei sich übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte, dass verschiedene Lactobacillusstämme keinen Einfluss auf Phänotyp und Zytokinsekretion dendritischer Zellen haben. Gram-negative Mikroorganismen hingegen konnten einen moderaten Anstieg der Expression von CD80, CD83 und HLA-DR sowie eine geringe Expression von TNF- α induzieren [Zeuthen *et al.*, 2008].

Weitere Studien, die eine etwas abgeänderte Form des Transwell-Systems mit einem Porendurchmesser der Filtereinsätze von 3 μ m und an den Filter anhaftenden dendritischen Zellen auf der basolateralen Seite einsetzten, konnten sowohl phänotypische Veränderungen als auch ein geändertes Zytokinsekretionsmuster durch Stimulierung der Zellen mit Lactobacillen nachweisen [Rimoldi *et al.*, 2005; Ratajczak *et al.*, 2007].

Diesen Ergebnissen zufolge beeinflusst bei Verwendung eines Transwell-Systems insbesondere der Porendurchmesser der verwendeten Filtereinsätze den durch Lactobacillen ausgelösten Effekt auf dendritische Zellen. Dabei zeigte sich ein Porendurchmesser von 0.4 μ m als zu klein, um die Effekte von Lactobacillen über einen differenzierten Caco-2 Monolayer zu übertragen.

5.3 Lactobacillus induzierte Zytokinsekretion in PBMC

Um die Effekte von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* in einem weiteren *in vitro* Modell zu untersuchen, wurden PBMC mit den beiden Bakterienstämmen bzw. LPS inkubiert und anschließend die Zytokinsekretion analysiert. Zusätzlich zu den Einzelinkubationen wurde in diesem Testsystem auch eine Inkubation mit einer Mischung aus beiden Bakterienstämmen untersucht, um herauszufinden ob die Effekte der einzelnen Stämme gegenüber der Mischung abweichen.

Im Zuge dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sowohl beide Bakterienstämme als auch die eingesetzte Bakterienmischung die Sekretion von IL-1 β , TNF- α sowie IL-10 in PBMC induzieren konnten, wobei *L. delbrueckii* und die Mischung aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* etwas effizienter waren als *L. rhamnosus GG*. Die Produktion von IL-12 und IFN- γ wurde hingegen weder von den einzelnen Stämmen noch von der Kombination aus *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* angeregt. Die getesteten Lactobacillen können somit sowohl die Bildung von Th1 als auch Th2 Zytokinen in PBMC stammspezifisch beeinflussen und dadurch, übertragen auf den Darm, möglicher Weise einen entscheidenden Beitrag in der Aufrechterhaltung der immunologischen Balance im Gastrointestinaltrakt leisten. Außerdem konnte übereinstimmend mit Kekkonen et al. gezeigt werden, dass eine Kombination von Lactobacillen zu keiner additiven Zytokinproduktion führt [Kekkonen *et al.*, 2008].

Foligne et al. untersuchten die Auswirkungen von 13 verschiedenen Mikroorganismen auf die Produktion von IL-12, IL-10 TNF- α und IFN- γ in PBMC und darauffolgend die Wirksamkeit derselben Bakterien in einem Mausmodell um prophylaktisch die Entwicklung akuter Colitis zu verhindern. Dabei konnte beobachtet werden, dass Bakterienstämme, die höhere Mengen IL-10 und geringere Mengen IL-12 induzierten, in diesem *in vivo* Colitis Modell den besten Schutz boten. Im Gegensatz dazu konnten Mikroorganismen mit einem niedrigen IL-10/IL-12 Verhältnis die Symptome einer akuten Colitis nicht mildern [Foligne *et al.*, 2007].

Die Ergebnisse der Zytokinantwort nach *in vitro* Stimulation von PBMC mit Lactobacillen werden sich wahrscheinlich von jenen, die man nach Messung der lokalen Zytokinproduktion im Darm nach oraler Aufnahme von Lactobacillen erhält, unterscheiden, da Lactobacillen zunächst eher mit intestinalen Immunzellen interagieren, als mit Zellen des Blutes. Dennoch stellt dieses *in vitro* Modell eine gute sowie einfache Möglichkeit dar, verschiedene Lactobacillusstämme auf ihre Fähigkeit die Sekretion pro- oder antiinflammatorische Zytokine zu induzieren, untersuchen zu können.

5.4 Direkte Inkubation mit Lactobacillen versus Transwell-System bei PBMC

Das Caco-2/PBMC Transwell-System wurde bereits mehrfach eingesetzt, um die komplexe Interaktion zwischen dem intestinalen Epithel und immunkompetenten Zellen zu untersuchen, wobei durch dieses Modell erstmals ein Crosstalk zwischen intestinalen Epithelzellen und Leukozyten nach Inkubation mit apathogenen Bakterien beobachtet werden konnte [Haller *et al.*, 2000; Parlesak *et al.*, 2004]. In Anlehnung an das Konzept des zellulären Crosstalks wurde im Rahmen dieser Arbeit das Caco-2/PBMC Transwell-System gewählt, um *in vitro* die Rolle des Darmepithels bei der immunmodulierenden Wirkung von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die durch Inkubation mit Lactobacillen bzw. LPS beobachteten Effekte in Bezug auf die Produktion von IL-1 β , TNF- α und IL-10 im direkten Modell weitaus größer waren, als im Transwell-System. Diese Ergebnisse deuten auf einen unterdrückenden Effekt der Caco-2 Barriere auf die getesteten Zytokine im Vergleich zur direkten Inkubation von PBMC hin – ein Effekt, der auch bereits in anderen Studien festgestellt werden konnte. Parlesak *et al.* beschrieben (bei Verwendung desselben Transwell-Systems) ebenso eine verglichen mit den Ergebnissen nach direkter Stimulierung von PBMC, deutliche Reduktion der Zytokinsekretion

nach indirekter Stimulierung von PBMC mit apathogenen *E. coli* über die Caco-2 Barriere [Parlesak *et al.*, 2004].

Das Caco-2/PBMC Transwell-System ist ein *in vitro* Modell, welches ausschließlich die Untersuchung von Interaktionen zwischen intestinalen Epithelzellen, Mikroorganismen und PBMC ermöglicht, hat aber wie jedes *in vitro* Modell gewisse Einschränkungen. So berücksichtigt dieses Modell beispielsweise nicht das Vorhandensein von Oberflächenmucus, der eine wichtige Barriere für Bakterien darstellt und die direkte Anheftung an das intestinale Epithel verhindert [Matsuo *et al.*, 1997]. *In vivo* können Mikroorganismen möglicher Weise nicht direkt an die intestinalen Epithelzellen adhären, was die Frage von Corthésy *et al.*, ob ein Crosstalk zwischen intestinalen Epithelzellen und Leukozyten physiologisch überhaupt stattfinden kann, aufwirft [Corthesy *et al.*, 2007].

Eine weitere wichtige Komponente bei der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase, die im Caco-2/PBMC Modell fehlt, ist sekretorisches IgA, das dominierende Immunglobulin bei der Abwehr von eindringenden Pathogenen in die Schleimhäute. Intestinale Mikroorganismen stellen einen konstanten Stimulus für die IgA Produktion im Darmepithel dar und verstärken dadurch den Ausschluss und die Eliminierung von Pathogenen [Kaila *et al.*, 1992; Majamaa *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998].

Das Caco-2/PBMC Transwell-System stellt somit ein sehr vereinfachtes Modell von intestinalen Epithelzellen und Leukozyten dar. Zurzeit gibt es jedoch kein experimentelles Modell, welches alle Bestandteile der komplexen intestinalen Oberfläche des Darms widerspiegeln könnte.

5.5 Schlussbetrachtung

Probiotika wurden bereits in zahlreichen klinischen Studien für den Einsatz in der Behandlung und Prävention von verschiedenen Erkrankungen untersucht und es gibt zahlreiche Hinweise auf ihre Wirksamkeit. Die immunmodulierenden Eigenschaften von probiotischen Mikroorganismen werden oft mit Hilfe von *in*

vitro Modellen charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur der probiotische Keim *Lactobacillus rhamnosus GG* sondern auch der konventionelle Bakterienstamm *Lactobacillus delbrueckii* in unterschiedlichen *in vitro* Testsystemen eine spezifische immunmodulierende Wirkung zeigt. Ziel weiterer Untersuchungen könnte somit vor allem die Identifizierung der genauen Komponenten jedes Stammes, die für die unterschiedlichen immunmodulierenden Effekte verantwortlich sind, sein.

In vivo gibt es jedoch viele Faktoren, die das lokale Immunsystem des Darms beeinflussen und mit *in vitro* Modellen nicht simuliert werden können. Deshalb sollten die, aus *in vitro* Untersuchungen hervorgegangenen, charakteristischen immunmodulierenden Eigenschaften von probiotischen sowie potentiell probiotischen Mikroorganismen immer mit *in vivo* Studien wie Tiermodellen oder Interventionsstudien bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Lactobacillen einen stimulierenden Einfluss auf das menschliche Immunsystem haben können, wobei sowohl konventionelle als auch probiotische Keime zu Veränderungen der zellulären Immunfunktion, sowie zur Anregung der Produktion von Zytokinen durch stimulierte Immunzellen führen. Der genaue Wirkmechanismus, der diesen Effekten zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, die immunmodulierende Wirkung von Lactobacillen mit unterschiedlichen *in vitro* Modellen genauer zu charakterisieren. Dazu wurde die Wirkung eines konventionellen (*L. delbrueckii*) und eines probiotischen Lactobacillusstammes (*L. rhamnosus GG*) auf den Reifungsgrad – speziell die Expression verschiedener Oberflächenmarker - und die Zytokinproduktion dendritischer Zellen (IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10) nach direkter Inkubation, sowie in einem Transwell-System nach indirekter Inkubation über einen differenzierten Caco-2 Monolayer, untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt der beiden Bakterienstämme auf die Zytokinsekretion (IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10) in Kulturen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und im Caco-2/PBMC Transwell-System analysiert.

Sowohl *L. delbrueckii* als auch *L. rhamnosus GG* konnten den Reifungsgrad dendritischer Zellen und die damit verbundene Zytokinproduktion nach direkter Inkubation deutlich, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, im Transwell-System hingegen nicht beeinflussen. PBMC konnten ebenfalls zu einer vermehrten Zytokinsekretion durch beide Bakterienstämme angeregt werden, wobei dieser Effekt in Anwesenheit der Caco-2 Barriere im Transwell-System wesentlich geringer ausgeprägt war. Die Inkubation mit einer Mischung aus beiden Stämmen führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Zytokinsekretion in PBMC gegenüber den Einzelinkubationen.

Diese Ergebnisse zeigen einen wesentlichen stammspezifischen Einfluss von *L. delbrueckii* und *L. rhamnosus GG* auf wichtige Antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems und PBMC in *in vitro* Untersuchungen.

7 Abstract

Numerous scientific investigations have already shown that lactobacilli have a stimulating effect on the immune system of the host. Conventional as well as probiotic lactic acid bacteria are able to modify cellular immune function and can enhance cytokine secretion by stimulated immune cells. The mechanisms by which lactobacilli exert these effects are not fully understood.

The purpose of this thesis was to further characterize the immune-modulatory properties of lactobacilli in different *in vitro* models. For this the impact of a conventional (*L. delbrueckii*) and a probiotic strain (*L. rhamnosus GG*) on dendritic cell maturation – specifically the expression of distinct surface markers and their cytokine production (IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10) was evaluated after direct incubation as well as after indirect incubation through a differentiated Caco-2 monolayer in a transwell-system. In further experiments the effect of both bacterial strains on the cytokine profile (IL-1 β , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Caco-2/PBMC cocultures in a transwell-system was tested.

L. delbrueckii as well as *L. rhamnosus GG* could clearly induce dendritic cell maturation and cytokine production, however to a different extent, when they were directly stimulated as opposed to the transwell-system, where none of these effects could be observed. Both tested strains efficiently enhanced cytokine secretion in PBMC cultures, whereas this effect was diminished in Caco-2/PBMC cocultures. Incubation with a mixture of both strains does not lead to enhanced cytokine production in PBMC compared to single incubations.

These results demonstrate a considerable strain-specific effect of *L. delbrueckii* and *L. rhamnosus GG* on important antigen presenting cells of the immune system and PBMC in *in vitro* studies.

8 Literaturverzeichnis

- Abrahamsson TR, Jakobsson T, Böttcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Björkstén B and Oldaeus G (2007) Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1174-1180.
- Adlerberth I, Cerquetti M, Poilane I, Wold A and Collignon A (2000) Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract: Part 1: Bacteria/host interactions. *Microbial Ecology in Health and Disease* **12**, 223.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B and Palucka K (2000) Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* **18**, 767-811.
- Banchereau J and Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Bell SJ, Rigby R, English N, Mann SD, Knight SC, Kamm MA and Stagg AJ (2001) Migration and Maturation of Human Colonic Dendritic Cells. *J Immunol* **166**, 4958-4967.
- Betsi GI, Papadavid E and Falagas ME (2008) Probiotics for the treatment or prevention of atopic dermatitis: a review of the evidence from randomized controlled trials. *Am J Clin Dermatol* **9**, 93-103.
- Biller JA, Katz AJ, Flores AF, Buie TM and Gorbach SL (1995) Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **21**, 224-226.
- Bilsborough J and Viney JL (2004) In vivo enhancement of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 83-87.
- Bjorksten, Naaber, Sepp and Mikelsaar (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical & Experimental Allergy* **29**, 342-346.
- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T and Mikelsaar M (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 516-520.
- Borchers A, Selmi C, Meyers F, Keen C and Gershwin M (2009) Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology* **44**, 26.

- Bottcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T and Bjorksten B (2000) Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy* **30**, 1590-1596.
- Brandtzaeg PE (2002) Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci* **964**, 13-45.
- Brouns F, Kettlitz B and Arrigoni E (2002) Resistant starch and "the butyrate revolution". *Trends in Food Science and Technology* **13**, 251.
- Butler JE, Weber P, Sinkora M, Sun J, Ford SJ and Christenson RK (2000) Antibody Repertoire Development in Fetal and Neonatal Piglets. II. Characterization of Heavy Chain Complementarity-Determining Region 3 Diversity in the Developing Fetus. *J Immunol* **165**, 6999-7010.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG and Zweibaum A (1988) Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Res* **48**, 1936-1942.
- Chehade M and Mayer L (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 3-12.
- Christensen HR, Frokiar H and Pestka JJ (2002) Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *J Immunol* **168**, 171-178.
- Contardi I (1991) Oral bacterial therapy in prevention of antibiotic-induced diarrhea in childhood. *Clin Ter* **136**, 409-413.
- Corthesy B, Gaskins HR and Mercenier A (2007) Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *J. Nutr.* **137**, 781S-790.
- Costa-Ribeiro H, Ribeiro TC, Mattos AP, Valois SS, Neri DA, Almeida P, Cerqueira CM, Ramos E, Young RJ and Vanderhoof JA (2003) Limitations of probiotic therapy in acute, severe dehydrating diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **36**, 112-115.
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C and Schrezenmeir J (2001) Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* **73**, 421S-429.
- Elmer GW, Surawicz CM and McFarland LV (1996) Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Jama* **275**, 870-876.

- Elson CO (2000) Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**, 254-257.
- Fink LN, Zeuthen LH, Ferlazzo G and Frokiaer H (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.
- Floch MH, Walker WA, Guandalini S, Hibberd P, Gorbach S, Surawicz C, Sanders ME, Garcia-Tsao G, Quigley EM, Isolauri E, Fedorak RN and Dieleman LA (2008) Recommendations for probiotic use--2008. *J Clin Gastroenterol* **42 Suppl 2**, S104-108.
- Fogh J, Fogh JM and Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**, 221-226.
- Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A and Pot B (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* **13**, 236-243.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations WHO (2002.) Guidelines for evaluation of probiotics in food. *London, Ontario: Canada*, [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf](http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf).
- Gaboriau-Routhiau V and Moreau MC (1996) Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Pediatr Res* **39**, 625-629.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y and Figdor CG (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-585.
- Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP and Isolauri E (2000) Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **83**, F186-192.
- Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D, Papadopoulou A, de Sousa JS, Sandhu B, Szajewska H and Weizman Z (2000) Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**, 54-60.

- Guarner F (2006) Enteric flora in health and disease. *Digestion* **73 Suppl 1**, 5-12.
- Guarner F and Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512-519.
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ and Blum S (2000) Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* **47**, 79-87.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG and Welling GW (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**, 61-67.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC and Stagg AJ (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* **53**, 1602-1609.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F and Lebranchu Y (2006) Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**, 696-702.
- Hol J, van Leer EHG, Elink Schuurman BEE, de Ruiter LF, Samsom JN, Hop W, Neijens HJ, de Jongste JC and Nieuwenhuis EES (2008) The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: A randomized, controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 1448-1454.
- Hooper LV, Midtvedt T and Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* **22**, 283-307.
- Huurre A, Kalliomaki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S and Isolauri E (2008a) Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* **93**, 236-240.
- Huurre A, Laitinen K, Rautava S, Korkeamaki M and Isolauri E (2008b) Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy* **38**, 1342-1348.
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A and Otani T (2003) Randomized Controlled Trial of the Effect of Bifidobacteria-Fermented Milk on Ulcerative Colitis. *J Am Coll Nutr* **22**, 56-63.

- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E and Arvilommi H (1993) Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* **105**, 1643-1650.
- Jang MH, Kweon M-N, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, Hiroi T, Tamagawa H, Iijima H, Kunisawa J, Yuki Y and Kiyono H (2004) Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6110-6115.
- Johnston BC, Supina AL and Vohra S (2006) Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Cmaj* **175**, 377-383.
- Jonkers D and Stockbrugger R (2007) Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* **26 Suppl 2**, 133-148.
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H and Vesikari T (1995) Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* **72**, 51-53.
- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S and Arvilommi H (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatr Res* **32**, 141-144.
- Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P and Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* **357**, 1076-1079.
- Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H and Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* **361**, 1869-1871.
- Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T and Isolauri E (2007) Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1019-1021.
- Katz JA (2006) Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile diarrhea. *J Clin Gastroenterol* **40**, 249-255.
- Kekkonen RA, Kajasto E, Miettinen M, Veckman V, Korpela R and Julkunen I (2008) Probiotic Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris and Streptococcus thermophilus induce IL-12 and IFN-gamma production. *World J Gastroenterol* **14**, 1192-1203.

- Kim P-H, Eckmann L, Lee WJ, Han W and Kagnoff MF (1998) Cholera Toxin and Cholera Toxin B Subunit Induce IgA Switching Through the Action of TGF- β 1. *J Immunol* **160**, 1198-1203.
- Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A and Urbanek R (2008) Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Probiotics for Primary Prevention: No Clinical Effects of Lactobacillus GG Supplementation. *Pediatrics* **121**, e850-856.
- Kraehenbuhl J-P and Neutra MR (2000) EPITHELIAL M CELLS: Differentiation and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 301-332.
- Kucharzik T, Lugering N, Rautenberg K, Lugering A, Schmidt MA, Stoll R and Domschke W (2000) Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* **915**, 171-183.
- Labayen I, Forga L, González A, Lenoir-Wijnkoop I, Nutr R and Martínez JA (2001) Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **15**, 543-549.
- Lee J, Seto D and Bielory L (2008) Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 116.
- Levri KM, Ketvertis K, Deramo M, Merenstein JH and D'Amico F (2005) Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract* **54**, 613-620.
- Lilly DM and Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced By Microorganisms. *Science* **147**, 747-748.
- MacDonald TT and Monteleone G (2005) Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. *Science* **307**, 1920-1925.
- Macpherson AJ and Uhr T (2004) Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science* **303**, 1662-1665.
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM and Fedorak RN (1999a) Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* **116**, 1107-1114.
- Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD and Fedorak RN (1999b) Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 262-270.

- Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M and Vesikari T (1995) Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **20**, 333-338.
- Malchow HA (1997) Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* **25**, 653-658.
- Mallon P, McKay D, Kirk S and Gardiner K (2007) Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005573.
- Marschan E, Kuitunen M, Kukkonen K, Poussa T, Sarnesto A, Haahtela T, Korpela R, Savilahti E and Vaarala O (2008) Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. *Clinical & Experimental Allergy* **38**, 611-618.
- Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, Balbo L, Russo R, Mazzaccara A and Gianino P (2002) Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35**, 527-531.
- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A and Katsuyama T (1997) Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* **40**, 782-789.
- Mattila-Sandholm T, Saarela M and de Vos WM (2007) Future Development of Probiotic Dairy Products. *In Book: Probiotic Dairy Products*, 195-205.
- Mellman I (2005) Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **560**, 63-67.
- Metchnikoff E (1907) Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *In Book: The prolongation of life-optimistic studies. W. Heinemann, London*, 161-183.
- Meunier V, Bourrie M, Berger Y and Fabre G (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* **11**, 187-194.
- Meyer AL, Micksche M, Herbacek I and Elmadfa I (2006) Daily intake of probiotic as well as conventional yogurt has a stimulating effect on cellular immunity in young healthy women. *Ann Nutr Metab* **50**, 282-289.
- Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M and Julkunen I (1998) Lactobacilli and Streptococci Induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infect. Immun.* **66**, 6058-6062.

- Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S and Klaenhammer TR (2005) Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2880-2885.
- Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, Mizumachi K and Kurisaki J-I (2002) Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Caco-2 Cells and Their Effect on Cytokine Secretion. *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY* **46**, 293.
- Moser M (2003) Dendritic cells. *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed). *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*, 455-480.
- Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **3**, 331-341.
- Mykkanen H, Laiho K and Salminen S (1998) Variations in faecal bacterial enzyme activities and associations with bowel function and diet in elderly subjects. *J Appl Microbiol* **85**, 37-41.
- Niers LE, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NO, Knol EF, Kapsenberg ML, Kimpen JL and Hoekstra MO (2005) Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy* **35**, 1481-1489.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR and Reinecker H-C (2005) CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science* **307**, 254-258.
- O'Hara AM and Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**, 688-693.
- O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J, Shilling D, Scully P, Sibartie S, Kavanagh E, Kirwan WO, Redmond HP, Collins JK and Shanahan F (2006) Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G839-845.
- Parlesak A, Haller D, Brinz S, Baeuerlein A and Bode C (2004) Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand J Immunol* **60**, 477-485.

- Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simonassmann P, Haffen K, Fogh J and Zweibaum A (1983) Enterocyte-Like Differentiation And Polarization Of The Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 In Culture. *Biology Of The Cell* **47**, 323-330.
- Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel A-B, Pestel J and Mercenier A (2002) Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**, 617.
- Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel AB and Pestel J (2007) Impact of lactic acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. *J Biomed Biotechnol* **2007**, 71921.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl J-P and Ricciardi-Castagnoli P (2001a) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-367.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP and Ricciardi-Castagnoli P (2001b) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-367.
- Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P and Rescigno M (2005) Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood* **106**, 2818-2826.
- Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ and Bath-Hextall F (2006) Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004826.
- Saavedra JM, Bauman NA, Perman JA, Yolken RH, Saavedra JM, Bauman NA and Oung I (1994) Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet* **344**, 1046-1049.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M and Rowland I (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* **80 Suppl 1**, S147-171.
- Salminen S, Gibson GR, McCartney AL and Isolauri E (2004) Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* **53**, 1388-a-1389.

- Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S and Black RE (2006) Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 374-382.
- Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B and Mikelsaar M (1997) Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatrica* **86**, 956-961.
- Shah NP (2000) Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* **83**, 894-907.
- Shanahan F (2000) Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* **6**, 107-115.
- Sheil B, Shanahan F and O'Mahony L (2007) Probiotic Effects on Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr.* **137**, 819S-824.
- Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R and Kirkkola AL (1990) Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* **22**, 57-59.
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* **299**, 1259-1260.
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C and Koga Y (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* **159**, 1739-1745.
- Szajewska H and Mrukowicz JZ (2005) Use of probiotics in children with acute diarrhea. *Paediatr Drugs* **7**, 111-122.
- Szajewska H, Ruszczynski M and Radzikowski A (2006) Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of Pediatrics* **149**, 367-367.
- Szymanski H, Pejcz J, Jawien M, Chmielarczyk A, Strus M and Heczko PB (2006) Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* **23**, 247-253.
- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P and Colombel JF (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1-4.

- Tamime AY, Saarela M, Sondergaard AK, Mistry V and Shah N (2007) Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. *In Book: Probiotic Dairy Products*, 39-50.
- Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB and Petrof EO (2006) Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1018-1030.
- Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Lodinova-Zadnikova R, Stepankova R, Cukrowska B, Funda DP, Striz I, Kozakova H, Trebichavsky I, Sokol D, Rehakova Z, Sinkora J, Fundova P, Horakova D, Jelinkova L and Sanchez D (2002) Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **128**, 77-89.
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM and Christakis DA (2002) *Lactobacillus* Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics* **109**, 678-684.
- Vergin F (1954) Antibiotics and probiotics. *Hippokrates* **25**, 116-119.
- Vinderola G, Matar C and Perdigon G (2005) Role of Intestinal Epithelial Cells in Immune Effects Mediated by Gram-Positive Probiotic Bacteria: Involvement of Toll-Like Receptors. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 1075-1084.
- Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y and Kumemura M (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 587-591.
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK and Polk DB (2007) Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. *Gastroenterology* **132**, 562-575.
- Zeuthen LH, Christensen HR and Frokiaer H (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.
- Zeuthen LH, Fink LN and Frokiaer H (2008) Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* **123**, 197-208.

- Zhang L, Li N, Caicedo R and Neu J (2005) Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* **135**, 1752-1756.
- Zigra PI, Maipa VE and Alamanos YP (2007) Probiotics and remission of ulcerative colitis: a systematic review. *Neth J Med* **65**, 411-418.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL and De Vos WM (1998) Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Vliet WMA-v, Arjan J, de Visser GM and de Vos WM (2001) The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**, 129 - 134.

Lebenslauf



Persönliche Daten:

Name: Petra Klein
Anschrift: Karmarschgasse 54b/2/4
1100 Wien
Geburtsdaten: 03.03.1983, Vöcklabruck
Staatsangehörigkeit: Österreich
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1989-1993 Volksschule Pinsdorf
1993-2001 Bundesgymnasium Gmunden
2001-2006 Universität Wien, Studium Ernährungswissenschaften
2006-2009 Universität Wien, Doktoratsstudium Ernährungswissenschaften

Berufserfahrung:

Seit 03/2005 Lehrbeauftragte bzw. Tutorin am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien
07/2006-01/2007 Affiliate Labeling Coordinator bei Wyeth Whitehall Export GmbH, Wien
Seit 01/2007 Assistentin am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Kongressbeiträge:

World Immune regulation Meeting III (22.-25. März 2009), Davos, Schweiz: „The effect of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus rhamnosus* on dendritic cell maturation” (Poster)

International Congress of Mucosal Immunology (5.-9. Juli 2009), Boston, USA: “Immune-modulating effects of Lactic acid bacteria on dendritic cells - direct contact versus transwell coculture system” (Poster)

Wien, im Juli 2009