

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka**

**Einfluss verschiedener *Lactobacillus*-Zellwandbestandteile und eines
Exopolysaccharides auf die Vaginalkandidose**

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

vorgelegt von
Alke Hoppert
aus Augsburg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Frau PD Dr. med. C. Borelli

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Tobias Weißenbacher

Prof. Dr. Frank Ebel

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2014

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. VORWORT | 4 |
| 2. EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 Die menschliche Vaginalschleimhaut | 5 |
| 2.2 <i>Candida albicans</i> und vaginale Infektion | 5 |
| 2.2.1 <i>Candida albicans</i> | 5 |
| 2.2.2 Vaginalkandidose | 6 |
| 2.2.3 Behandlung der Vaginalkandidose | 7 |
| 2.3 Abwehrmechanismen des Körpers | 8 |
| 2.3.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr | 8 |
| 2.3.2 Abwehr von Schleimhautinfektionen | 9 |
| 2.3.3 Zytokine | 9 |
| 2.4 Zytokinexpression bei <i>Candida</i>-Infektionen | 11 |
| 2.5 Lactobacillen | 12 |
| 2.5.1 <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> | 13 |
| 2.5.2 Lipoteichonsäuren | 14 |
| 2.5.3 <i>S-Layer</i> | 15 |
| 2.5.4 Exopolysaccharide | 15 |
| 2.6 Ziel der Arbeit | 16 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 18 |
| 3.1 Das Vaginalschleimhautmodell | 18 |
| 3.2 Herstellung und Präparation der Testsubstanzen | 18 |
| 3.2.1 Einstellung der Keimdichte und Abtötung der Lactobacillen | 19 |
| 3.2.2 Herstellung der <i>Lactobacillus</i> -Zellwandfraktionen | 19 |
| 3.2.3 Lipoteichonsäure-freie Lactobacillen | 23 |
| 3.2.4 Lipoteichonsäure von <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.5 Exopolysaccharid von <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | 23 |
| 3.3 Synchronisation der <i>Candida albicans</i>-Stämme | 24 |
| 3.4 Versuchsaufbau: Infektion und Inkubation des Schleimhautmodells | 25 |
| 3.5 Lichtmikroskopie | 25 |
| 3.5.1 Fixierung und Einbettung der Schleimhautproben | 25 |
| 3.5.2 Lichtmikroskopische Aufbereitung | 26 |
| 3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion..... | 27 |
| 3.6.1 RNA-Extraktion | 27 |
| 3.6.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration..... | 28 |
| 3.6.3 DNase-Verdau | 28 |
| 3.6.4 RT-Reaktion..... | 28 |
| 3.6.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)..... | 29 |
| 3.6.6 Identifizierung der PCR-Produkte durch die Gelelektrophorese | 40 |
| 3.7 Auswertungsmethodik | 40 |
| 3.8 Lactatdehydrogenase-Test..... | 42 |
| 3.9 Statistik..... | 43 |
| 4. ERGEBNISSE | 44 |
| 4.1 Morphologische Beurteilung der Gewebeproben..... | 44 |
| 4.1.1 Morphologie des nicht infizierten RHVE | 44 |
| 4.1.2 Morphologie des RHVE nach Infektion mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314..... | 45 |
| 4.1.3 Morphologie der vorinkubierten, infizierten RHVE | 47 |
| 4.1.4 Morphologie der infizierten, behandelten RHVE | 56 |
| 4.2 Quantitative RT-PCR Analyse..... | 65 |
| 4.2.1 Zytokin-mRNA-Expression des Vaginalkandidosemodells | 65 |
| 4.2.2. Zytokin-mRNA-Expression der vorinkubierten Vaginalkandidosemodelle | 67 |
| 4.2.3 Zytokin-mRNA Expression der behandelten Vaginalkandidosemodelle | 76 |
| 4.3 LDH-Test..... | 82 |
| 4.3.1 LDH-Konzentration der mit <i>C. albicans</i> infizierten Vaginalepithelproben | 82 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2 LDH-Konzentration der vorinkubierten, infizierten Vaginalepithelproben | 83 |
| 4.3.3 LDH-Konzentration der infizierten, behandelten Vaginalepithelproben..... | 84 |
| 5. DISKUSSION..... | 86 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG..... | 97 |
| 7. ANHANG | 99 |
| 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 106 |
| 9. TABELLENVERZEICHNIS | 112 |
| 10. LITERATURVERZEICHNIS | 113 |
| 11. DANKSAGUNG | 126 |
| 12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 127 |

1. VORWORT

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Ansätzen zur Prävention und Intervention der Vaginalkandidose, welche insbesondere in ihrer rezidivierenden Form ein epidemiologisch bedeutsames Krankheitsbild darstellt und für die betroffenen Frauen mit einem hohen Leidensdruck einhergehen kann. Die Therapie mit Antimykotika weist z. T. erhebliche Nebenwirkungen und zudem keine nachhaltige Wirkung auf. Präventive Behandlungskonzepte sind bisher nicht etabliert.

Vaginale Infektionen stehen häufig im Zusammenhang mit einer verminderten Besiedelung der Vaginalschleimhaut durch Lactobacillen. Daher wurde in zahlreichen Studien die Wirkung der Lactobacillen auf die Vaginalkandidose untersucht, wobei sich sowohl präventive als auch therapeutische Effekte zeigten. Es gibt mehrere Studien, die eine Adhäsionsfähigkeit verschiedener *Lactobacillus*-Stämme an Vaginalepithelzellen gezeigt haben. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Lactobacillen vom Stamm *rhamnosus* den Hefepilz *Candida albicans* vom Epithel verdrängten und dessen Wachstum verhinderten.

Um Erkenntnisse über die für die protektive Wirkung entscheidenden Bestandteile der Lactobacillen und deren Wirkmechanismen zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich einzelne *Lactobacillus*-Bestandteile, sowohl unspezifische Komponenten als auch spezifische Bestandteile und Substanzen, auf den Verlauf der Vaginalkandidose auswirken.

2. EINLEITUNG

2.1 Die menschliche Vaginalschleimhaut

Die Vaginalschleimhaut besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten und drüsenfreien Plattenepithel, welches zyklusphasenabhängig differenziert ist. Es gliedert sich von innen nach außen in 3 Schichten: das *Stratum basale*, das durch Zellteilung die oberen Schichten erneuert, das *Stratum spinosum*, welches mechanisch stabilisierend wirkt und das *Stratum superficiale*, welches abgeflachte, lebende Zellen enthält. Die beiden inneren Schichten werden zusammenfassend auch als *Stratum germinativum* bezeichnet (1).

Die Vaginalschleimhaut wird unter dem Einfluss von Östrogenen verdickt. In der Proliferationsphase kommt es proportional zum Östrogeneinfluss zu einem Epithelaufbau. In der Zyklusmitte ist die Schleimhaut am stärksten entfaltet, zum Zeitpunkt der Menstruation am flachsten. In gleicher Weise wird der Glycogengehalt beeinflusst: die östrogenabhängige Einlagerung von Glycogen in die Epithelzellen ist zum Zeitpunkt der Ovulation am höchsten. In der Sekretionsphase werden vermehrt Zellen der obersten Schichten abgeschilfert, wobei nach Aufbrechen der Zellmembran Glycogen freigesetzt wird. Dieses wird von Lactobacillen zu Milchsäure verstoffwechselt, wodurch ein saures Scheidenmilieu mit einem pH von 3,6 - 4,5 entsteht, welches einer Ansiedlung anderer Bakterien entgegenwirkt (2). Die Vaginalschleimhaut gesunder Frauen wird hauptsächlich von Lactobacillen besiedelt (3). Die Einwanderung von Leukozyten ist zyklusabhängig und findet nach der Ovulation statt (4).

2.2 *Candida albicans* und vaginale Infektion

2.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans (lateinisch *candidus*: glänzend, weiß; *albicare*: weiß sein/werden; Abkürzung: *C. albicans*) wird im DHS-System nach Rieth zu den Hefepilzen gezählt (5). Er besitzt als diploider Organismus ein Genom mit einer Größe von 2 x 16 Megabasenpaaren, welches auf 2 x 8 Chromosomen verteilt ist. *C. albicans* kommt in vier morphologisch verschiedenen Wachstumsformen vor: als Blastospore, Hyphe, Pseudohyphe und Chlamydospore. In welcher Erscheinungsform er auftritt, ist stark vom Nährmedium abhängig. In infizierten Geweben findet man meistens Blastosporen, die auch als Hefezellen

bezeichnet werden, oder Hyphen bzw. Pseudohyphen (6). Die Hefezelle ist rundlich-oval, 5-7 µm breit und 6-10 µm lang. Sie vermehrt sich durch Sprossung: Nach einem Längenwachstum teilt sich der Kern und ein Septum bildet sich, die beiden Blastosporen trennen sich voneinander. Hyphen sind verzweigte, durch Septen unterteilte tubuläre Strukturen, die aus vielen Zellen bestehen. Ein Myzel ist ein Geflecht aus Hyphen. Die Bildung von echten Hyphen ist ein Hinweis auf die nicht mehr saprotrophe, sondern invasive Besiedlungsform im Rahmen einer manifesten Infektion. Einzelne Myzelfäden können bereits mit bloßem Auge im Untersuchungsmaterial erkannt werden. Pseudohyphen ähneln bei Betrachtung im Lichtmikroskop stark den Hyphen. Im Gegensatz zu diesen bestehen sie jedoch aus nicht septierten Einzelzellen, die durch Sprossung entstanden sind und sich nicht voneinander getrennt haben. Eine weitere Erscheinungsform sind Chlamydosporen. Diese dickwandigen, kugelförmigen Zellen haben einen Durchmesser von circa 9 µm und werden von Pseudohyphen oder Hyphen gebildet. Als Dauersporen wachsen sie im nährstoffarmen Milieu mit geringem Glucoseangebot. Sie sind ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von *C. albicans* zu anderen Hefen.

2.2.2 Vaginalkandidose

Es gibt circa 150 Arten der Gattung *Candida*, wobei nur wenige humanpathogen sind. In etwa 90–95 % der Fälle wird die Vaginalkandidose durch *C. albicans* verursacht, in 2–5 % durch *Candida glabrata* und daneben durch ungefähr 10 weitere Arten, z. B. *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* (7).

C. albicans ist ein saprotropher Keim, der als opportunistischer Krankheitserreger (8) unter dem Einfluss prädisponierender Faktoren wie zum Beispiel Schwangerschaft, Diabetes mellitus oder Antibiotikaeinnahme zur Entwicklung einer manifesten Infektion führen kann (9; 10). In der Schwangerschaft, vor allem im dritten Trimenon, erhöht sich die Inzidenz einer vulvovaginalen Kandidose bis auf das doppelte (11). Der hohe Östrogenspiegel und der damit einhergehende Anstieg des Glycogengehaltes in den Epithelzellen schaffen günstige Bedingungen für den Hefepilz, welcher selbst Östrogenrezeptoren besitzt. In *in vitro*-Experimenten wirkten Östrogene beschleunigend auf das Wachstum von *C. albicans* (12). Je nach Alter, Geschlecht, Zahnstatus und Gesundheit sind 20-90 % der untersuchten Menschen intestinal von *Candida*-Arten besiedelt (13), ohne dass Krankheitssymptome auftreten. Die

vaginale Kolonisation weist bei gesunden, prämenopausalen, nicht schwangeren Frauen eine Häufigkeit von etwa 10–20 % (14).

Die Pathogenese der Erkrankung wird kontrovers diskutiert. Eine gestörte Balance zwischen Mikroorganismen des vaginalen Milieus scheint jedoch eine wichtige Rolle zu spielen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass am Anfang der *Candida*-Infektion die Adhärenz des Pilzes an das Epithel steht. Es kommt dann zur Multiplikation mit Filamentation und Hyphenbildung. Bei der Anheftung könnten adhäsive Polysaccharide eine wichtige Rolle spielen. Im Folgenden produziert *Candida* Enzyme wie Phospholipasen und Proteinasen. Es kommt zur Gewebeschädigung, zur Penetration und Auslösung einer Entzündungsreaktion (15).

Die vulvovaginale Kandidose tritt meist im geschlechtsreifen Alter auf. Circa 75 % aller Frauen erkranken mindestens einmal in ihrem Leben an einer vulvovaginalen Kandidose (16), wobei 40-45 % der Frauen wiederholt und 5 % chronisch betroffen sind (17). Die manifeste Infektion äußert sich durch ein Ödem und Erythem im Bereich der Vulva, sowie weißliche, abwischbare Auflagerungen im Vaginalbereich und einem weißen, wässrigen bis „cottage-cheese“-artigen Ausfluss. Als Symptome treten Juckreiz und Brennen auf. Der vaginale pH-Wert ist in der Regel unverändert (18; 19).

2.2.3 Behandlung der Vaginalkandidose

Die Vaginalkandidose kann lokal oder systemisch behandelt werden. Für die lokale Therapie werden Polyene (Nystatin oder Amphoterin B), Imidazole und Ciclopiroxolamin-Vaginalia (in Form von Cremes oder Zäpfchen) und für die orale Therapie Triazole verwendet. Die Behandlungsergebnisse sind bei allen Präparaten nahezu gleich. Wegen der besseren Compliance werden bei der akuten Kandidose oft orale Triazole bevorzugt (20). Die Heilungsquote einer akuten *C. albicans*-Vaginitis beträgt bei einer lokalen Therapie mit Polyen- oder Azolantimykotika nach 4-6 Wochen etwa 75-80 %.

2.3 Abwehrmechanismen des Körpers

2.3.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr

Zum Aufgabenbereich des Immunsystems gehört sowohl die Abwehr von Krankheitserregern als auch der Erhalt der Struktur körpereigener Gewebe durch die Eliminierung alternder, entarteter oder infizierter Zellen und die Stimulation der Wundheilung. Man unterscheidet die angeborene von der erworbenen Immunität (21). Beide Systeme ergänzen sich und arbeiten sowohl mit humoralen als auch mit zellulären Komponenten.

Die angeborene Immunität ist für die frühe Abwehr von Krankheitserregern verantwortlich. Sie ist phylogenetisch älter und zur unmittelbaren Immunantwort in der Lage, da sie auf direktem Wege aktiviert wird. Sie ist unspezifisch, das heißt sie unterscheidet nicht zwischen unterschiedlichen Pathogenen, sondern erkennt für Krankheitserreger typische Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, *PAMPs*). Dadurch kann es körperfremde und körpereigene Strukturen grob unterscheiden (22). Die unspezifische Immunität wird vor allem durch genetische Faktoren bestimmt. Deshalb bestehen in der Resistenz gegenüber pathogenen Mikroorganismen zwischen Individuen des gleichen Stammes relativ wenige Unterschiede, mehr jedoch zwischen den verschiedenen Spezies und Stämmen (23). Im Gegensatz zur erworbenen Immunität entwickelt die angeborene Immunität kein erregerspezifisches Gedächtnis. Sie ist bei evolutionär niederen Lebewesen der alleinige Abwehrmechanismus. Nur Vertebraten verfügen über eine „zweite Linie“ der Abwehr, die erworbene Immunität, die auf antigenspezifisch arbeitenden Immunzellen basiert (24). Das erworbene Immunsystem kann nicht-lösliche Antigene (z. B. Bakterien, Pilze) nicht erkennen und setzt daher eine „Prozessierung“ dieser Antigene durch das unspezifische System voraus. Im Idealfall sollte die Immunabwehr das eindringende Pathogen eliminieren, das Wirtsgewebe aber dabei nicht beschädigen. Durch entzündliche Reaktionen wird das Wirtsgewebe im Rahmen der Abwehr jedoch oftmals beschädigt bzw zerstört. Grund hierfür ist, dass die gegen den eindringenden Erreger gerichteten Abwehrstoffe, zum Beispiel Proteasen, Sauerstoffradikale oder Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nicht strukturspezifisch wirken und somit auch Gewebe des Wirtes angreifen. Hierbei können systemische und zum Teil tödliche Schädigungen auftreten, die durch eine unbalancierte Freisetzung von eigentlich wirtsprotektiven Zytokinen, insbesondere Interleukin-1 (IL-1) und TNF- α zustande kommen (*Cytokine storm*, Sepsis) (25; 26).

2.3.2 Abwehr von Schleimhautinfektionen

Epitheliale Zellen besitzen neben ihrer jeweiligen organspezifischen Funktion und der Rolle als mechanische Barriere zur Umgebung eine wichtige Bedeutung innerhalb des angeborenen Immunsystems, da sie als erste Zellen des Körpers in Kontakt mit pathogenen Keimen kommen. Durch die Bindung unspezifischer, unterschiedlichen Mikroorganismen gemeinsamer Antigene an sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, *PRR*), insbesondere *toll-like* Rezeptoren, werden die Epithelzellen stimuliert, Zytokine zu sezernieren. Mustererkennende Rezeptoren können nicht erkennen, ob es sich um potentiell pathogene oder symbiontische Mikroorganismen handelt. Die genauen Mechanismen, die ermöglichen, dass ein Wirtsorganismus nicht-pathogene Mikroorganismen toleriert, sind bisher noch nicht geklärt (25). Die nach Kontakt der *PAMPs* mit den Epithelzellen ausgeschütteten Zytokine wirken sowohl auf benachbarte Zellen als auch auf Zellen des Immunsystems. Weitere Zellen, die zur angeborenen Immunität beitragen, sind Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen), Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen. Die Interaktion dieser Zellen mit dem Pathogen, z. B. *Candida*, hat vor allem zwei Wirkungen: erstens eine direkte antimikrobielle Aktivität und zweitens eine regulatorische Aktivität, welche durch die Synthese von Zytokinen die Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems unterstützt. Spezifische, von Zellen der angeborenen Immunabwehr gebildete Zytokine führen zu qualitativ unterschiedlichen adaptiven T-Helfer (Th)-Zellantworten (Th0, Th1, Th2). Die von pathogenspezifischen differenzierten Th-Zellen produzierten Zytokine mobilisieren und aktivieren Effektorzellen und helfen pathogenspezifischen Plasmazellen bei der Bildung opsonierender, protektiver Antikörper.

2.3.3 Zytokine

Zytokine sind induzierbare, wasserlösliche, heterogene Proteinmediatoren mit einem Molekulargewicht von ~15–30 kDa, die in Zielzellen oder den sie produzierenden Zellen spezifische, über Rezeptoren vermittelte Wirkungen ausüben. Der Wirkungsbereich der Zytokine umfasst sowohl die Regulation der Hämatopoese als auch die Kontrolle über Vorgänge, die der Entwicklung und Regeneration von Gewebe dienen. Andere Zytokine wirken vor allem auf den Funktionszustand reifer Zellen, indem sie Immun- und

Entzündungsreaktionen vermitteln und zur Abwehr von pathogenen Keimen und maligner Entartung beitragen. Die meisten Zytokine diffundieren nach ihrer Sekretion in die nähere Umgebung und beeinflussen die Funktionen der sie sezernierenden Zellen (autokriner Effekt) oder benachbarter Zellen (parakriner Effekt). Ähnlich wie die Hormone binden Zytokine in sehr niedriger Konzentration mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren der Zielzellen. Bestimmte Zytokine werden durch zahlreiche verschiedene Zelltypen produziert. Ein bestimmtes Zytokin kann auf viele unterschiedliche Zelltypen einwirken (pleiotroper Effekt). Zytokine induzieren oder inhibieren die Synthese und Sekretion anderer Zytokine, sodass komplexe Wechselwirkungen entstehen. Verschiedene Zytokine können hierbei auch gleiche Effekte induzieren.

Die Synthese und Sekretion von Zytokinen ist ein vorübergehendes, in der Regel nur kurze Zeit dauerndes Ereignis. Im nicht-kodierenden 3'-Ende der Zytokin-mRNA findet sich bei vielen ein gemeinsames Muster (AUUU), das zur Instabilität der RNA beiträgt und somit zu einer kurzen Halbwertszeit führt. Die Zellen reagieren auf die Einwirkung von Zytokinen mit der Bildung von mRNA und der Synthese von Proteinen. Dieser Vorgang dauert Stunden (23). Im Weiteren werden Zytokine beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (23; 26):

Interleukin-1 (IL-1)

Die biologischen Aktivitäten von Interleukin-1 (IL-1) werden durch zwei Formen, IL-1 α und IL-1 β , vermittelt. Diese stimmen zwar in ihrer Aminosäuresequenz nur zu 26 % überein, binden jedoch an die gleichen Rezeptoren und entfalten deshalb identische biologische Wirkungen. IL-1 wird vorwiegend von Makrophagen und Monozyten, aber auch von T-, B- und NK-Zellen, Granulozyten, Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert. Die Produktion von IL-1 kann durch bakterielle Endotoxine, Pilze und andere Zytokine (TNF- α) stimuliert werden. IL-1 ist, ähnlich wie TNF- α ein wichtiger Mediator der unspezifischen Entzündung und wirkt somit proinflammatorisch. Es aktiviert T-Zellen, steigert die Proliferation von B-Zellen und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und wirkt als starker Chemoattraktant für Leukozyten. IL-1 bewirkt die Freisetzung von IL-6 und IL-8.

Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa. Es ist ein Mediator einer akuten Entzündung, ein starkes Chemoattraktant für neutrophile und basophile Granulozyten sowie T-Zellen und bewirkt deren Aktivierung und Adhäsion.

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

GM-CSF wird von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen u.a. sezerniert. Es stimuliert Wachstum und Differenzierung von Myeloblasten, Monoblasten und anderen hämatopoetischen Vorläuferzellen, aktiviert entsprechende reife Formen und hat chemotaktische Wirkung auf Neutrophile und andere Zellen.

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

In niedriger Konzentration wirkt TNF- α im örtlich umschriebenen Bereich als parakriner und autokriner Regulator von Leukozyten und Endothelzellen und trägt zur gegen Mikroorganismen gerichteten Entzündung bei. TNF- α aktiviert zudem Neutrophile und begünstigt deren Adhäsion an das Endothel und ihr Eindringen ins Gewebe. Über seine Einwirkung auf das Gefäßendothel kann es Schocksymptome und hämorrhagische Nekrosen gewisser Tumoren induzieren. Die Toxizität von Eosinophilen und Makrophagen gegenüber Parasiten wird durch TNF- α verstärkt.

2.4 Zytokinexpression bei *Candida*-Infektionen

Die Vaginalschleimhaut stellt eine wichtige Quelle pro-inflammatorisch wirksamer Zytokine dar (27; 28). Während des initialen Kontaktes zwischen dem Pathogen und dem Wirt (Keratinocyten) bei lokalen Kandidosen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, welche für die Anziehung und Migration von Effektor-Zellen (Leukozyten) in das epitheliale Gewebe wichtig sind (29).

Mehrere Studien über systemische Kandidosen haben gezeigt, dass die Manifestation systemischer Infektionen vom dominanten Zytokin-Profil abhängt. Eine durch Zytokine stimulierte Th1-Zell-Reaktion führt zu Resistenz und zu einer protektiven Immunität, während eine Th2-Antwort mit erhöhter Anfälligkeit assoziiert ist (30).

Auch bei Infektion oraler und vaginaler Schleimhäute bei verschiedenen Maus- und Rattenmodellen wurde eine erhöhte Expression von Chemokinen und die Induktion einer protektiven Th1-Zytokin-Antwort durch *C. albicans* gezeigt (31; 32; 33; 34; 35; 36; 37). Bezüglich der einzelnen Zytokine konnte gezeigt werden, dass bei oraler Kandidose IL-1 α und IL-8 exprimiert werden (38). Desweiteren konnten nach Kontakt von Keratinocyten mit *C. albicans* in *in vitro*-Versuchen signifikant höhere Level von IL-1 α , TGF- α und bFGF gemessen werden (39). Die *C. albicans*-Infektion einer rekonstituierten humanen Haut

induzierte die *de novo*-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und GM-CSF (40).

Die Höhe des Anstieges der Zytokin-mRNA-Produktion ist von der Virulenz des Erregers abhängig. An einem *in vitro*-Modell der oralen Candidose konnte gezeigt werden, dass der hochvirulente *C. albicans*-Stamm, verglichen mit weniger virulenten *Candida*-Stämmen, zum stärksten Anstieg der mRNA von IL-8 und GM-CSF führte (27). Desweiteren konnte, stimuliert durch die experimentelle *C. albicans*-Infektion, eine vermehrte Transkription von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α nachgewiesen werden. Dies ist *in vivo* mit einer protektiven Th1-Zytokinantwort sowie mit Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten verbunden (41; 42; 30).

2.5 Lactobacillen

Lactobacillen werden zu den sog. Probiotika gezählt. Nach der Definition von Salminen et al., 1998, sind dies mikrobielle Zellzubereitungen oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die positive Effekte auf Gesundheit und Wohlbefinden des Wirtes haben (43). Lactobacillen sind Teil der normalen oralen, intestinalen und urogenitalen Mikroflora. Sie leben bevorzugt im sauren Milieu, zu dem sie ihrerseits durch die Produktion von Milchsäure und anderen Säuren beitragen (44). In vielen Nahrungsmitteln sind Lactobacillen enthalten, zum Beispiel in Milch, Käse, Joghurt und anderen Milcherzeugnissen, in Rohwurst oder in Brot- und Backwaren.

Es gibt viele Studien über ein breites medizinisches Anwendungsspektrum von Lactobacillen. Sie finden Verwendung in der Therapie der Lactoseintoleranz (45; 46; 47), der durch Rotaviren induzierten Diarrhoe (48), der Antibiotika assoziierten *Clostridium difficile*-Colitis (49) und zeigen therapeutischen und präventiven Effekt bei durch Antibiotika ausgelösten Diarrhoen (50; 51) oder durch Strahlentherapie hervorgerufenen intestinalen Nebenwirkungen (48). Außerdem konnten in Studien positive Effekte bei der Therapie (52; 53) und Prävention (54; 55) atopischer Erkrankungen nachgewiesen werden.

Die vaginale Flora prämenopausaler Frauen besteht hauptsächlich aus Lactobacillen (3; 56). Nachdem sich ein Zusammenhang zwischen vaginalen Infektionen und einer Reduktion des Lactobacillenanteils auf der Vaginalschleimhaut zeigte (57; 58; 59), konnten in weiteren Studien sowohl präventive (60; 61; 62; 63; 64; 65; 66) als auch therapeutische (67; 68; 69) Wirkungen der Lactobacillen auf die vaginale Candidose nachgewiesen werden. Zur

Erklärung dieser protektiven Wirkung werden verschiedene Mechanismen der Lactobacillen diskutiert. Zum Beispiel könnte das Anheften und somit Blockieren von (spezifischen) Rezeptoren an der Epitheloberfläche (67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 64; 76; 77), das Aufrechterhalten eines niedrigen pH in der Vagina, der das Wachstum von pathogenen Keimen verhindert (70; 71; 72), die Produktion antimikrobieller Substanzen wie Milchsäure, Wasserstoffperoxid und Bakteriozinen (73; 74; 75; 76; 70; 77) oder die Produktion eines Biofilms, der die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert (78; 79), eine Rolle spielen. Ein weiterer Mechanismus, mit welchem Lactobacillen das Epithel schützen, ist die Fähigkeit bestimmter Lactobacillen, Aggregate untereinander und mit *C. albicans* zu bilden (80).

Es gibt mehrere Studien, die eine Adhäsionsfähigkeit verschiedener *Lactobacillus*-Stämme an Vaginalepithelzellen gezeigt haben (81; 82; 83; 84; 56). Hierbei konnte beobachtet werden, dass Lactobacillen vom Stamm *rhamnosus* den Hefepilz *C. albicans* vom Epithel verdrängten (85) und dessen Wachstum verhinderten (67). Die molekularen Mechanismen, durch welche sich Lactobacillen an Epithelzellen anheften, sind noch unbekannt. In mehreren Studien wurde vermutet, dass die *Lactobacillus*-Adhärenz durch Proteine vermittelt wird (86; 87; 88), während in anderen eine Rolle von Lipoteichonsäuren (89), Kohlenhydraten und Glycoproteinen (90; 91; 84) angenommen wurde. Die Rezeptoren der Vaginalepithelzellen für Lactobacillen scheinen Glycolipide zu sein (84).

2.5.1 *Lactobacillus rhamnosus GG*

Lactobacillus GG gehört zur Gruppe der Milchsäurebakterien und ist unter den Lactobacillen der Art *rhamnosus* zugeteilt. *Lactobacillus GG (LGG)* wurde von den amerikanischen Universitätsprofessoren Sherwood L. Gorbach und Barry R. Goldin der *Boston School of Medicine* Mitte der 1980er Jahre entdeckt (92; 93) und in der amerikanischen Stammsammlung hinterlegt (ATCC 53103). Es ist ein grampositives und katalasenegatives, stäbchenförmiges Bakterium und wächst in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C, optimal bei 37 °C, und in einem pH-Bereich von 4,0 bis 7,0. Es gilt als das am besten untersuchte probiotische Milchsäurebakterium (94; 95).

Wie fast alle Bakterien besitzt es eine Zellwand, die ihm die äußere Gestalt verleiht. Als grampositives Bakterium besitzt es ein 20-28 nm dickes Peptidoglycan-Gerüst, das als Hauptstrukturkomponente die Zelle umgibt. Dieses Peptidoglycan-Makromolekül, das auch Murein („Mauerwerk“) genannt wird, ist aus vielen langen Glycanketten (Zuckerpolymeren),

die durch Oligopeptide kovalent vernetzt sind, aufgebaut. Die Zellwand besteht aus mehreren Lagen dieser Mureinnetze und ist sehr stabil. Bei grampositiven Bakterien macht die Zellwand bis zu einem Drittel der Bakterienmasse aus, bei den gramnegativen Bakterien hingegen beträgt der Anteil nur zehn Prozent.

Grampositive Bakterien synthetisieren anionische Polymere, die kovalent an das Peptidoglykan gebunden sind oder mit einem Lipidanker an der Außenseite der Zytoplasmamembran verankert sind. Diese Polymere bilden einen wichtigen Bestandteil des bakteriellen Exoskeletts und lassen sich aufgrund ihrer molekularen Diversität in Wandteichonsäuren (*wall teichoic acid*, WTA) und Lipoteichonsäuren (*lipoteichoic acid*, LTA) einteilen. Die Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der grampositiven Zellwand.

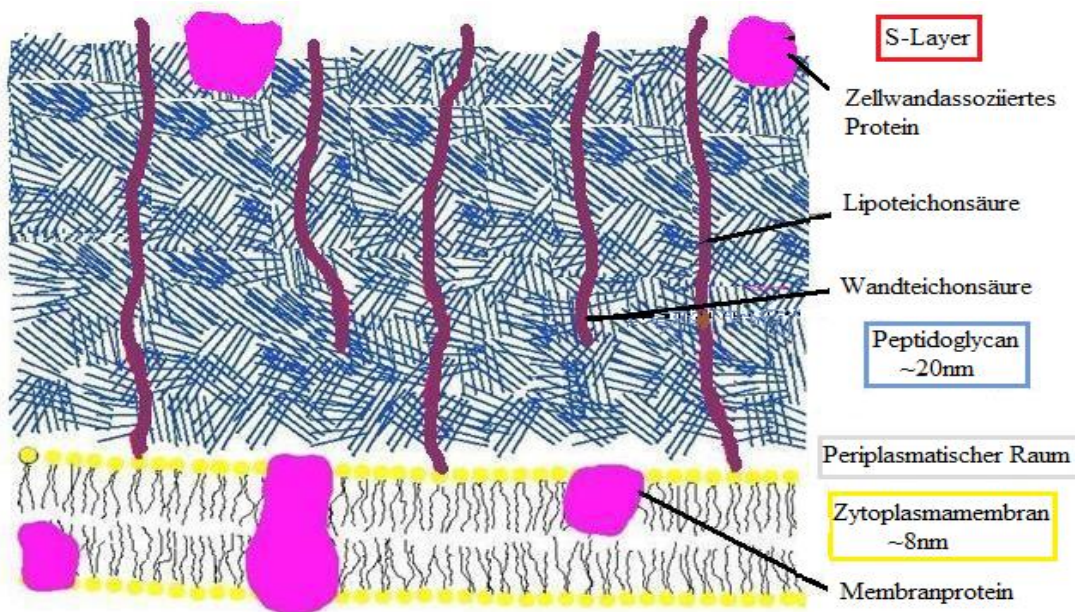


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der grampositiven Zellwand. Die Zellwand ist relativ dick, besteht aus vielen Lagen von Mureinnetzen und ist durchsetzt mit Lipoteichonsäuren, die quer durch die Peptidoglycan-Schichten verlaufen.

2.5.2 Lipoteichonsäuren

Lipoteichonsäuren (LTA) sind amphiphile, negativ geladene Glycolipide, die in den meisten grampositiven Bakterien gefunden werden können. Den Hauptbestandteil des Moleküls bildet eine hydrophile, lineare, 1,3-verknüpfte Polyglycerolphosphat-Kette, die sich durchschnittlich

aus 16-40 Glycerolphosphatmolekülen zusammensetzt. Bei *Staphylococcus aureus* sind die Glycerolphosphat-Einheiten zusätzlich noch mit D-Alanin substituiert. Die Kette ist kovalent über einen Phosphodiester mit dem hydrophoben, kleineren Teil des Moleküls verknüpft, einem Glycolipid, welches die Lipoteichonsäure in der Zytoplasmamembran verankert. Lipoteichonsäuren ragen durch Poren der Mureinschicht aus der Bakterienzellwand heraus. Sie scheinen wichtige Funktionen in der Physiologie der Zellwand auszuüben. Sie sollen die Aktivitäten von Autolysinen (96; 97), die Bindung von Kationen, die für Enzymfunktionen erforderlich sind (98; 99; 100; 101) und die elektromechanischen Eigenschaften der Zellwand (102) beeinflussen. Sie sind wichtig für die Adhärenz der Bakterien und können die Aktivierung des Komplementsystems im menschlichen Immunsystem bewirken, das eine Entzündungsreaktion hervorruft (103). Die Struktur der Lipoteichonsäure, insbesondere des Glycolipids, kann bei den verschiedenen Bakteriengattungen variieren.

2.5.3 S-Layer

Der *S-Layer* (*surface-layer*) stellt in der Regel den äußersten Zellwand-Bestandteil dar und kann je nach Organismus unterschiedliche Funktionen, z. B. Formgebung, Schutz erfüllen. Er wird aus Proteinen gebildet, welche Schichten mit einem symmetrisch angeordneten Gitter formen und sowohl untereinander als auch an andere Zellwandkomponenten nichtkovalent gebunden sind. Man nimmt an, dass die Bindungsstärke der einzelnen Monomere untereinander größer ist, als die Bindung an die darunter liegende Zellwandkomponente. In Experimenten mit isolierten Hüllprotein-Monomeren wurde nachgewiesen, dass *S-Layer* neben der Zelloberfläche auch an anderen Oberflächen, an Phasengrenzen oder spontan in Suspensionen rekristallisieren können (104).

2.5.4 Exopolysaccharide

Interaktionen zwischen Bakterien und menschlichen Wirtszellen werden durch Oberflächenstrukturen der Zelle vermittelt, insbesondere Proteine und Polysaccharide. Extrazelluläre Polysaccharide von Bakterien können an Zellmembran- bzw. Zellwandkomponenten angehängt sein, wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäuren. Sie können aber auch eine Kapsel um die Zellen formen, wie die

Kapselpolysaccharide (CPS) oder aber freigesetzt werden wie die Exopolysaccharide (EPS) (105). Polysaccharide stellen eine heterogene Gruppe von Polymeren dar, deren funktionelle Eigenschaften durch ihre strukturellen Charakteristika bestimmt werden. Diese können sich im Molekulargewicht, im Saccharidverbindungstyp, im Grad der Verzweigung und in der chemischen Zusammensetzung unterscheiden (106). Entsprechend ihrer Zusammensetzung können Exopolysaccharide in Homo- und Heteropolysaccharide eingeteilt werden.

Die Fähigkeit der Exopolysaccharid-Produktion ist weit verbreitet unter Bakterien und weniger verbreitet unter Hefen (107). Die meisten lebensmitteltauglichen Mikroorganismen, so auch Lactobacillen, sind in der Lage, Exopolysaccharide zu bilden (108; 109; 110). Exopolysaccharide scheinen nicht als Nahrungsreserve zu dienen, da die meisten Exopolysaccharid-produzierenden Bakterien nicht in der Lage sind, das Exopolysaccharid, welches sie produzieren, zu degradieren (111).

Von Pflanzen gebildete Polysaccharide finden bereits eine breite Anwendung in der Industrie. Hier werden sie u.a. als Verdickungsmittel, Stabilisator und Geliermittel verwendet. Einige von Lactobacillen produzierte Exopolysaccharide bieten potentielle gesundheitsfördernde Eigenschaften, wie zum Beispiel Cholesterolsenkende Aktivitäten (112) und anti-ulceröse-Effekte (113). Sie sollen präbiotische (114) und gegen Tumoren gerichtete Wirkungen haben (115; 116) sowie immunomodulatorisch wirken (117). Das Exopolysaccharid von *Lactobacillus rhamnosus RW-9595M* stimuliert Interleukin 6, Tumornekrosefaktor und Interleukin 12 bei immunkompetenten Zellen des Menschen und der Maus (118).

Das in dieser Arbeit verwendete Exopolysaccharid wird durch den Stamm *Lactobacillus sanfranciscensis TMW 1.392* aus Saccharose produziert. Es besteht zu mehr als 95% aus Fructose (Polyfructan) und ist vom Levantyp (β -2,6 Fructan). Der o.g. Stamm ist an der Fermentation von Sauerteig beteiligt, und für das gebildete Fructan konnte in *in vitro*-Untersuchungen eine präbiotische Eigenschaft nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß das Levan von *L. sanfranciscensis* das Wachstum von Bifidobakterien präferentiell fördert (119; 120).

2.6 Ziel der Arbeit

In vielen Studien konnte bereits ein protektiver Effekt von lebenden Lactobacillen bezüglich einer vaginalen *Candida*-Infektion gezeigt werden. Jedoch wurde bisher nicht nachgewiesen, welche Komponenten der Bakterien oder welche Mechanismen zu diesem Effekt beitragen.

Da sowohl die Zellwand der Lactobacillen als äußere Hülle der Bakterien als auch von Lactobacillen produzierte Faktoren in erster Linie mit dem Epithel und dem Hefepilz in Kontakt kommen, ist es Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung von *Lactobacillus*-Bestandteilen, insbesondere der Zellwand, sowie von Exopolysaccharid auf die Vaginalkandidose zu beurteilen. Hierzu werden die zellulären Veränderungen histologisch und biochemisch sowie die immunologische Reaktion des Epithels molekularbiologisch untersucht. Durch die Ergebnisse sollen Erkenntnisse zur Wirkungsweise der Lactobacillen bei diesem Krankheitsbild gewonnen werden sowie Ansatzpunkte für eine klinische Anwendung einzelner *Lactobacillus*-Substanzen bei der Vaginalkandidose identifiziert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Das Vaginalschleimhautmodell

Als Modell für die Vaginalschleimhaut wurde ein rekonstituiertes humanes Epithel der Firma Skinethic (Nizza, Frankreich) verwendet. Dieses ist in Ultrastruktur und Funktionalität dem menschlichen Epithel *in vivo* äquivalent. Die Zellen entstammen der Zelllinie A431, die aus einem humanen Epidermoidkarzinom der Vulva gewonnen wurde. Sie werden auf einem 0,5 cm² großen Polycarbonatfilter, der als Dermisersatz dient, fünf Tage lang in einem chemisch definierten Medium angezüchtet und bilden ein mehrschichtiges, unverhorntes Epithel.

In den hier durchgeführten Versuchen betrug die Dicke des Epithels am 6. Tag 41 µm (Versuchsreihe 1), 85 µm (Versuchsreihe 2) bzw. 80 µm (Versuchsreihe 3). Die Viabilität lag im MTT-Test bei OD=0,897 (Versuchsreihe 1), OD=1,017 (Versuchsreihe 2) bzw. OD=0,938 (Versuchsreihe 3). Die 0,5 cm² großen Vaginalschleimhautmodelle befanden sich jeweils in einem Plastikinsert und waren in Agarose-Nährlösung eingebettet. Aus dieser wurden die Inserts herausgenommen und in 1,0 ml chemisch definiertes, antimykotika- und serumfreies MCDB 153 Spezialmedium (Clonetics, San Diego, USA) gestellt. Nach Zugabe der zu testenden Substanzen bzw. der Kontrollsubstanz wurde das rekonstituierte humane Vaginalepithel (RHVE)-Modell bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) inkubiert.

3.2 Herstellung und Präparation der Testsubstanzen

Es wurden acht verschiedene Substanzen in ihrer Wirkung auf die experimentelle *Candida*-Infektion des Vaginalepithels getestet: *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* in abgetöteter Form (hitzeinaktiviert), einzelne Zellwandbestandteile (Zellwandfragmente, Lipoteichonsäure, Peptidoglycan, Peptidoglycan/Lipoteichonsäure), säurebehandelte (Lipoteichonsäure-freie) *Lactobacillus rhamnosus GG*, Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* und ein Exopolysaccharid, das ein Syntheseprodukt von *Lactobacillus sanfranciscensis LTH2590 (TMW1.392)* ist. Als Negativkontrolle wurde PBS (*phosphate-buffered saline*, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) verwendet. Die Herkunft und Herstellung der Testsubstanzen wird im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Einstellung der Keimdichte und Abtötung der *Lactobacillen*

Als probiotischer Keim wurde *Lactobacillus rhamnosus GG* verwendet. Dieser wird als Nahrungsergänzungsmittel in Kapselform von der Firma InfectoPharm Arzneimittel und Consilium GmbH, Heppenheim, D vertrieben. Laut Hersteller enthält eine Kapsel mindestens 5×10^9 gefriergetrocknete lebensfähige *Lactobacillen*. Der Inhalt einer Kapsel wurde in 1.000 μl Raumtemperatur-warmes PBS gegeben und eingerührt.

Um eine definierte Keimdichte zu erreichen, wurde ein Trübungsvergleich unter Verwendung des Trübungsstandards nach McFarland (121) durchgeführt. Eine gewisse Konzentration von Bakterien in einer Suspension bewirkt eine bestimmte Trübung, die in einem Densitometer (Eppendorf, Hamburg, D) gemessen werden kann. Die *LGG*-Suspension wurde in einem Glasröhrchen durch Zugabe von PBS unter Vergleich der Trübung auf den McFarland Trübungsstandard 0,5 eingestellt. Dies entspricht einer *Lactobacillen*-Konzentration von $1,5 \times 10^8$ Keimen/ml.

Anschließend wurde die *Lactobacillen*-Suspension 15 Minuten bei 90°C im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert und die Milchsäurebakterien somit abgetötet.

Um die Inaktivierung der *Lactobacillen* zu überprüfen, wurde ein Teil dieser Suspension auf eine MRS-Agar-Platte aufgetragen. Nach Kultivierung konnte kein Wachstum der Bakterien nachgewiesen werden.

3.2.2 Herstellung der Zellwandfraktionen von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Das Vorgehen zur Herstellung der *Lactobacillus*-Zellwandfraktionen erfolgte in Anlehnung an das von Chan et al, 1985 beschriebene Procedere (89).

Zur Anzüchtung und Aufreinigung der *Lactobacillen* wurde eine Kapsel *Lactobacillus GG* in 20 ml MRS Broth (Difco, Sparks, Maryland, USA) gelöst und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 Liter MRS Broth wurde die Zellsuspension 24 Stunden bei 37°C erneut inkubiert. Anschließend wurde diese siebenmal mit PBS gewaschen: Hierzu wurde die Suspension jeweils zentrifugiert (1. Zentrifugieren: Beckman J-6 *centrifuge* (Beckmann, München, D): 3.000 rpm, 20 min, 22°C ; 2. Zentrifugieren: Hermle Z 383K (Hermle, Wehingen, D): 3.000 rpm, 15 min, 22°C ; 3.-7. Zentrifugieren: Hermle Z 513K, 5.000 rpm, 15 min, 22°C), der Überstand verworfen und der Bodensatz wiederum in PBS gelöst. Der zuletzt gewonnene Bodensatz wurde ein

weiteres Mal in PBS gelöst und in gleichen Mengen auf vier Gefäße verteilt, um mittels der unten beschriebenen Verfahren die Fraktionen Zellwandfragmente von *LGG*, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *LGG*, Peptidoglycan von *LGG* sowie aus dem vierten Teil Lipoteichonsäure von *LGG* und säurebehandelte Lactobacillen zu gewinnen.

3.2.2.1 Zellwandfragmente

Zur Herstellung der aus Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG* bestehenden Fraktion wurden die aufgereinigten Lactobacillen in 10 Ultraschallzyklen (UP 200S Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH, Teltow, D) von jeweils 30 Sekunden Dauer behandelt und zwischen den Zyklen mit Eis gekühlt, anschließend bei 23 °C mit 7.000 x g für 10 min zentrifugiert (Hermle Z 382K). Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz in einer Lösung von 10 ml [20 mM Tris (pH 7,4)-8 mM MgCl₂], 10 mg RNase A (Sigma, Steinheim, D) und 1,5 µl Desoxyribonuclease I (Sigma) suspendiert. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für drei Stunden inkubiert, dann dreimal mit PBS gewaschen: hierzu wurde jeweils die Suspension zentrifugiert (Zentrifuge: Hermle Z 383K: 12.000 x g, 10 min, 23 °C), der Überstand verworfen und der Bodensatz wiederum in PBS gelöst. Nach dem dritten Zentrifugieren wurde der Bodensatz in 5 ml PBS resuspendiert und als Zellwandfragmente enthaltende Fraktion bei -20 °C aufbewahrt.

Die Behandlung der Lactobacillen-Suspension mit Ultraschall dient dem Zellaufschluss. Die DNase I, die aus dem Pancreas der Kuh stammt, schneidet doppelsträngige oder einzelsträngige DNA zu einer Mischung von Mono- und Oligonucleotiden, mit 5'- oder 3'-OH-Enden. Diese katalytische Aktivität ist von divalenten Ionen abhängig. In Anwesenheit von Mg²⁺ hydrolysiert die DNase I jeden Strang zufällig und unabhängig.

Ribonuclease A ist eine Endoribonuclease, die einzelsträngige RNA am 3'-Ende von Pyrimidin-Resten schneidet. Sie degradiert die RNA in 3'-phosphorylierte Mono- und Oligonucleotide. Mit Hilfe der DNase I und RNase A und dem anschließenden Waschen mit PBS soll sowohl DNA als auch RNA aus der Probe eliminiert werden.

Die nach diesen Behandlungsschritten gewonnene Suspension enthält sowohl Fragmente der Zellmembran als auch sämtliche Komponenten der Zellwand wie Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Wandteichonsäure sowie zellmembran- und zellwandassoziierte Proteine (*S-Layer*).

3.2.2.2 Peptidoglycan und Lipoteichonsäure

Um als Testsubstanz eine aus Peptidoglycan und Lipoteichonsäure bestehende Fraktion von *Lactobacillus rhamnosus GG* zu erhalten, wurde zunächst in gleicher Weise verfahren wie bei der Herstellung der Zellwandfragmente. Im Anschluss an diese Schritte wurde der so gewonnene Bodensatz in 20 ml PBS mit 1 % SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Merck, Darmstadt, D) für 4 Stunden bei 100 °C erhitzt, dreimal mit PBS gewaschen (Verfahren wie oben beschrieben, verwendete Zentrifuge: Hermle Z 383K, 12.000 x g, 10 min, 22 °C) und dialysiert. Hierzu wurde ein dünnwandiger Schlauch (Visking® *dialysis tubing* 20/32, Durchmesser 16 mm, MWCO (*molecular weight cut off*) 12.000-14.000, Porendurchmesser 25Å, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D) aus in Wasser gequollener Zellulose, der tags zuvor abgekocht wurde, verwendet. Ein Ende des Schlauches wurde verknotet, der Schlauch mit der bearbeiteten Lactobacillen-Suspension befüllt und anschließend auch das andere Schlauchende verknotet. Der so verschlossene Schlauch wurde in 1 Liter 1 %iges bovines Serum Albumin (BSA), gelöst in destilliertem Wasser, gelegt. Nach 18 Stunden unter ständigen Rühren eines Magnetrührers in der Kühlkammer bei 4 °C wurde der Schlauch herausgenommen, der Inhalt abgefüllt, mit PBS gewaschen, in 5 ml PBS resuspendiert und als Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* enthaltende Fraktion bei -20 °C aufbewahrt.

Das Natriumdodecylsulfat (SDS), welches durch Veresterung von Schwefelsäure mit Dodekanol entsteht, ist ein Molekül mit einem lipophilen Schwanz und hydrophilen Kopf. Es lagert sich an Proteine an und unterbricht nicht-kovalente Bindungen, wodurch die Proteine ihre native Form (Konformation) verlieren. Die Anionen von SDS binden an die (Haupt) Peptidkette mit einem Verhältnis von einem SDS Anion pro zwei Aminosäure-Reste. Dies verleiht dem Protein eine negative Ladung, die proportional zu der Masse des Proteins ist (ungefähr 1,4 SDS pro Gramm Protein) und die signifikant größer als seine Originalladung ist. Die elektrostatische Abstoßung, die durch die Bindung des SDS erzeugt wird, führt dazu, dass sich die Proteine entfalten. Durch das Erhitzen der Proben werden die Proteine ebenfalls denaturiert, sodass sie sich entfalten.

Die Dialyse ist ein Prozess, bei dem Substanzen in Lösung durch ihr unterschiedliches Molekulargewicht getrennt werden. Die Dialyseschläuche sind semipermeable Membranen, die eine Gel-ähnliche Struktur haben. Die treibende Kraft ist der Konzentrationsunterschied zwischen den zwei Lösungen an den beiden Seiten der Membran. Die in dem Schlauch enthaltenen Moleküle mit einer molaren Masse unter der des Porendurchmessers der

Membran des Schlauches diffundierten somit durch seine Wand und verteilten sich in dem Gesamtvolumen. Da das Volumen der Lösung außerhalb des Schlauches erheblich größer war als das in dem Schlauch, wurde die Konzentration der ursprünglich vorhandenen kleineren Moleküle auf ein vernachlässigbares Maß reduziert. BSA hat ein Molekulargewicht von circa 66.000 g/mol und kann deshalb nicht die Membran des Dialyseschlauches permeieren. SDS hingegen mit einem Molekulargewicht von 288 g/mol diffundiert durch die Membran, lagert sich an das BSA an und wird somit aus dem Inneren des Schlauches entfernt. Durch die Behandlung mit SDS konnten die *S-Layer*-Proteine der *Lactobacillen*-Zellwand entfernt werden. Peptidoglycane und Lipoteichonsäuren hingegen konnten den Dialyseschlauch nicht verlassen und sind daher Hauptbestandteil dieser Fraktion.

3.2.2.3 Peptidoglycan

Zur Gewinnung der aus Peptidoglycanen bestehenden Fraktion aus *Lactobacillus rhamnosus GG* wurde zunächst wiederum wie zur Herstellung der Fraktion aus Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG* vorgegangen. Der so gewonnene Bodensatz wurde mit SDS behandelt, wie für die Gewinnung der aus Peptidoglycan und Lipoteichonsäure bestehenden Fraktion von *Lactobacillus rhamnosus GG* beschrieben, und anschließend mit 10 ml 0,1 N H₂SO₄ 30 min inkubiert. Nach Neutralisation mit NaOH wurde die Suspension zentrifugiert (Hermle Z 383K, 12.000 x g, 10 min, 22 °C), zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen (Verfahren wie bei Waschen mit PBS, s.o., Zentrifuge: Hermle Z 383K, 12.000 x g, 10 min, 22 °C) und 72 Stunden in 4 l destilliertem Wasser dialysiert (Visking® *dialysis tubing* 20/32, Durchmesser 16 mm, MWCO (*molecular weight cut off*) 12.000-14.000, Porendurchmesser 25 Å, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D). Zuletzt wurde das Dialysat zentrifugiert (Hermle Z 383K, 12.000 x g, 10 min, 22 °C) und der Bodensatz in 5 ml PBS gelöst.

Durch die Behandlung mit Schwefelsäure wurden die säurelabilen Komponenten der Suspension entfernt, wie zum Beispiel Lipoteichonsäure, so dass Peptidoglycane als Bestandteil dieser Fraktion übrig blieben.

3.2.2.4 Lipoteichonsäure

Um Lipoteichonsäure (LTA) aus *Lactobacillus rhamnosus GG* zu isolieren, wurden 8,4 g der wie oben beschrieben gewonnenen Lactobacillen-Suspension (siehe 3.2.2) eine Stunde lang in 24 g 100 %igem Phenol gekocht. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen, in PBS suspendiert und über Nacht unter Rühren bei 4 °C gegen Wasser dialysiert. Zum Schluss wurde das Dialyse-Produkt zentrifugiert und der Bodensatz in 5 ml PBS aufgenommen.

3.2.3 Lipoteichonsäure-freie Lactobacillen

Zur Präparation Lipoteichonsäure-freier Lactobacillen wurden 4,7 g der aufgereinigten Lactobacillen-Suspension mit 15 ml 0,1 N H₂SO₄ 3 min inkubiert und anschließend mit NaOH neutralisiert, zentrifugiert und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen (Verfahren s.o., Zentrifuge: Hermle Z 383K, 8.000 x g, 10 min, 22 °C). Danach wurde der Bodensatz in 5 ml PBS resuspendiert. Durch die Behandlung mit Säure wurden die säurelabilen Komponenten der Lactobacillen, unter anderem Lipoteichonsäure, aus der Bakterienwand entfernt.

3.2.4 Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*

Zum Vergleich der Wirkung von Lipoteichonsäuren verschiedener Herkunft wurde neben der Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* die von *Staphylococcus aureus* als weitere Testsubstanz verwendet. Sie wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, D) bezogen und in einer Konzentration von 50 µg/ml, die durch Zugabe von PBS eingestellt wurde, eingesetzt.

3.2.5 Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*

Das verwendete Exopolysaccharid (EPS) wird von *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 (TMWI.392) aus Saccharose synthetisiert. Der *Lactobacillus*-Stamm spaltet durch das Enzym

Levansucrase die Saccharose, wobei er die freiwerdende Glucose als Energiequelle nutzt und über den Pentose-Phosphat-Weg abbaut, während er die Fructose zu einem Exopolysaccharid polymerisiert. Dieses ist ein Homopolymer vom Levantyp (β -2,6 Fructan) und hat nach Dialyse ein Molekulargewicht von $>2 \times 10^6$ Dalton. Das Exopolysaccharid wurde als Trockensubstanz (überlassen von Korakli, M., TU München) (122) in PBS suspendiert und auf eine Konzentration von 10 g/l eingestellt.

3.3 Synchronisation der *C. albicans*-Stämme

Für die Infektion des RHVE-Modells wurde der *C. albicans*-Stamm SC5314 verwendet. Zur Synchronisation wurde der eingefrorene Stamm aufgetaut und mit einer Platinimpföse auf Kimmig-Agar-Platten (Merck, Darmstadt, D) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator (Heraeus, Hanau, D) angezüchtet. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine dicke Öse abgenommen und in 5 ml steriler, 0,9 % Natriumchlorid (NaCl)-Lösung suspendiert, gevortext (Gerät: Snijders, Tilburg, Niederlande) und anschließend 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert (Sigma 3-18 K). Der Überstand wurde abgekippt und der Waschvorgang mit jeweils 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung zweimal wiederholt. Im Folgenden wurde der Bodensatz in 5 ml NaCl-Lösung resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Nach entsprechender Verdünnung mit NaCl wurden 2×10^5 Zellen/ml in autoklaviertes YPD-Medium (*Yeast-Extract-Peptone-Dextrose*, Hefeextract-Pepton-Glukose, Difco, Detroit, USA) eingesät und 24 Stunden bei 37 °C und 150 U/min im Schüttelinkubator (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine erneute Zellzählung durchgeführt, die *C. albicans*-Suspension wurde auf 4×10^6 Zellen/ml mit NaCl-Lösung verdünnt, in YPD-Medium eingesät und wiederum bei 37 °C und 150 U/min für 24 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und dreimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Zellzahl bestimmt und mit PBS auf 4×10^7 Zellen/ml verdünnt. Zur Infektion des RHVEs wurden hiervon je 50 μ l verwendet.

3.4 Versuchsaufbau: Infektion und Inkubation des Schleimhautmodells

Die einzelnen RHVEs wurden mit je 50 µl einer Suspension, welche jeweils eine der folgenden Fraktionen enthielt, inkubiert: Zellwandfragmente, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, Peptidoglycan, Exopolysaccharid, Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG*, Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*, hitzeinaktivierte Lactobacillen, Lipoteichonsäure-freie Lactobacillen und als neutrale Kontrollsubstanz PBS. Nach 12 Stunden Inkubation wurde jede Schleimhautprobe mit 50 µl *C. albicans*-Suspension infiziert. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Epithel einschließlich der Polycarbonatträgerschicht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Plastikinsert gelöst und halbiert. Der eine Teil wurde in Karnovsky-Lösung fixiert und für die histologische Untersuchung aufbereitet, der andere Teil wurde schockgefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung mittels Reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) aufbewahrt. Der Überstand wurde abpipettiert und für die Laktatdehydrogenase (LDH)- Bestimmung verwendet.

Der oben beschriebene Versuchsablauf wurde auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt: die RHVEs wurden zu Versuchsbeginn mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 infiziert und 12 Stunden inkubiert, im Anschluss daran mit den jeweiligen Testsubstanzen bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt und weitere 12 Stunden inkubiert.

Zur Kontrolle wurde bei jedem Versuchsdurchgang eine Schleimhautprobe 24 Stunden nur mit der neutralen Substanz PBS inkubiert.

Die beschriebene Versuchsanordnung wurde in gleicher Weise dreimal durchgeführt.

3.5 Lichtmikroskopie

3.5.1 Fixierung und Einbettung der Schleimhautproben

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Proben für fünf Stunden bei 4 °C in eine nach Karnovsky modifizierte Lösung gelegt. Diese setzt sich aus 2,5 %iger Glutaraldehyd- (Serva, Heidelberg, D) und 2,0 %iger Formaldehyd-Lösung (Merck) in 0,1 M Phosphatpuffer (Merck) zusammen. Der pH-Wert der Lösung beträgt 7,3. Nach Ablauf der fünf Stunden wurde die Lösung bei Raumtemperatur abpipettiert. Daraufhin wurden die Schleimhäute dreimal gewaschen, indem jeweils 0,1 M Phosphatpuffer zugegeben und nach 15 min wieder abpipettiert wurde. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten bei Raumtemperatur mit

1% Osmiumtetroxid (OsO₄, Serva)-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer nachfixiert und zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden die Epithelien für jeweils 15 Minuten in Lösungen steigender Alkoholkonzentrationen (30, 50, 70, 90, 100 %) (Apotheke der Innenstadtkliniken der LMU, München, D) gelegt, was zur Entwässerung der Schleimhaut führte. Zur Einbettung wurde die Glycidethereinbettung nach Luft (123) angewendet: Hierzu wurde eine aus zwei Komponenten bestehende Kunstharzlösung hergestellt, wobei sich die eine Komponente aus 100 ml Glycidether (Serva) und 89 ml Methylnadicanhydrid (Serva), die andere aus 62 ml Glycidether (Serva) und 100 ml Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (Serva) zusammensetzte. Die Komponenten wurden im Verhältnis 3:2 gemischt und mit 1,5 % p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) als Polymerisationsbeschleuniger versetzt. Es folgten drei Schritte, in denen die Epithelien jeweils in Mischungen aus Kunstharz und Ethanol (1. Schritt: Verhältnis 1:1 für 1 Stunde, 2. Schritt: Verhältnis 2:1 für 2 Stunden) bzw. in reines Kunstharz (für 3 Stunden) gegeben wurden. Hierauf wurde die reine Kunstharzlösung erneuert und die Proben über Nacht bei 4 °C gekühlt. Am folgenden Tag erfolgte die Entfernung des Restalkohols aus den Proben, indem sie eine Stunde lang auf 37 °C erwärmt wurden. Danach wurden die Schleimhäute unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, D) mit einer Rasierklinge zerteilt und in Einbettungsformen, die mit flüssiger Kunstharzlösung gefüllt worden waren, gelegt. Zur Aushärtung des Kunstharzes wurden diese 7 Tage bei 60 °C in einen Inkubator (Heraeus) gestellt.

3.5.2 Lichtmikroskopische Aufbereitung

Nachdem die Kunstharzblöcke ausgehärtet waren, wurden sie getrimmt (Ultracut, Reichert, Wien, Österreich). Im Folgenden wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert) Semidünnschnitte von 1 µm Dicke hergestellt und diese mit einer Mischung (Verhältnis 1:4) aus 1% Pyronin G-Lösung (Merck) und 1% Toluidinblau (Merck), gepuffert mit 1% Dinatriumtetraborat, für 5 Minuten bei 60 °C auf einer Heizplatte (Medax, München, D) gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden bei 60 °C getrocknet und bei 400facher Vergrößerung lichtmikroskopisch (Zeiss, Oberkochen, D) ausgewertet.

3.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

3.6.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wird in fünf Schritten durchgeführt: Homogenisation, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen der RNA und Lösen der RNA. Für den ersten Schritt (Homogenisation) wurde zu den bei -80 °C schockgefrorenen Proben je 1 ml *peqGOLD RNAPure* (PeqLab, Erlangen, Deutschland) hinzugegeben, welches Phenol und Guanidinisothiozyanat in einphasiger Lösung enthält. Daraufhin wurden die Proben jeweils zwei Minuten mit dem Ultraturax (IKA T25, Staufen, D) behandelt, um die Zellen aufzuschließen und eine homogene Suspension zu erhalten. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Als nächster Schritt folgte die Phasentrennung. Hierzu wurden die Proben mit 200 μl Chloroform versetzt, 30 Sekunden lang mit Hilfe des Vortex durchmischt und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur stengelassen. Daran schloss sich eine fünfminütige Zentrifugation (Zentrifuge: Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 12.000 U/min an, die zur Trennung der Proben in drei Phasen führte: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere, farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Während die DNA und die Proteine sich in den unteren beiden Phasen befinden, reichert sich die RNA in der obersten Phase an. Zur RNA-Präzipitation wurde die obere Phase in ein neues Röhrchen pipettiert und mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) versetzt. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend für zehn Minuten bei 12.000 x g in der Kühlzentrifuge (Biofuge Fresco) bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA ausgefällt und am Boden des Röhrchens sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Es folgte das Waschen der RNA. Hierfür wurde 1 ml 75 %iges Ethanol zum RNA-Pellet gegeben und zehn Minuten bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und der Waschvorgang wiederholt. Um die RNA zu lösen, wurde das RNA-Pellet leicht getrocknet (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, D), und mit 1 μl *RNAse OUT Ribonuklease Inhibitor* (Invitrogen, Karlsruhe, D) und 8 μl Diethylpyrocarbonat (DEPC) - Wasser (Sigma) versetzt. Dadurch wurde die enzymatische Zersetzung der RNA durch RNAsen verhindert. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe eines Photometers (Biophotometer, Eppendorf, D) bestimmt. Hierzu wurde zunächst ein Nullabgleich gegen 1 µl Lösung von *RNAse Inhibitor* in DEPC-Wasser, die dem Verhältnis der Proben entspricht, verdünnt mit 99 µl DEPC-Wasser, durchgeführt. Im Anschluss daran wurde jeweils 1 µl RNA-Probe mit 99 µl DEPC-Wasser verdünnt, in eine Kunststoffküvette (Uvette, Eppendorf, D) gegeben und die Proben bei 260 nm und 280 nm vermessen. Somit erhielt man die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe und konnte so den Verdünnungsfaktor berechnen, um 1 µg RNA für die Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion zu erhalten. An dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich erkennen, ob die RNA mit Proteinen, Guanidinisothiocyanat oder Phenol kontaminiert ist, was zu einer Störung der RT-Reaktion führen könnte. Optimalerweise sollte das Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0 liegen, anderenfalls sollte sich ein weiterer Waschschrift mit Ethanol anschließen.

3.6.3 DNase-Verdau

Für den DNase-Verdau und die anschließende RT-Reaktion wird 1 µg RNA eingesetzt. Diese wird mit 1 µl 10 x *Reaction Buffer* (Invitrogen) und 1 µl DNase I *Amplification Grade* (Invitrogen) versetzt und mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufpipettiert. Die Mischung wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugegeben, um überschüssige Metallionen zu binden. Es folgte eine zehnmünütige Erhitzung bei 65 °C (Thermocycler, Biometra, Göttingen, D) um die DNase I zu inaktivieren. Im Anschluss daran wurden die Proben auf 4 °C (Thermocycler) gekühlt.

3.6.4 RT-Reaktion

Die RT-Reaktion dient der Umschreibung der mRNA in cDNA und wurde unter Verwendung des *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV) (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Nach dem DNase-Verdau wurden die Proben jeweils mit 1 µl *Oligo-p(dT) Primer* und 1 µl H₂O versetzt. Nach 5 min, in denen sich der Primer an die mRNA anlagern konnte,

wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl *Transcriptor RT Reaction Buffer* (5x), 0,5 µl *Protector RNase Inhibitor* (40 U/µl), 2 µl *Deoxynucleotide Mix* (10 mM) und 0,5 µl *Transcriptor Reverse Transcriptase*. Diese Mischung wurde kurz gevortext und abzentrifugiert. Daraufhin wurden folgende Inkubationsschritte in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt: 30 Minuten bei 55 °C, um die mRNA in cDNA umzuschreiben und 5 Minuten bei 85 °C, um die Reaktion zu beenden. Zuletzt wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Die 20 µl cDNA-Lösung wurden mit 180 µl DEPC-Wasser verdünnt, sodass für die PCR insgesamt 200 µl cDNA-Lösung zur Verfügung standen

3.6.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.6.5.1 Prinzip der PCR

Die Methodik der PCR wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und ermöglicht den Nachweis selbst sehr kleiner Mengen an DNA. Sie verläuft in drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden: Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese. Im ersten Schritt wird die Ziel-DNA (*template*) durch Erhitzen auf 94-100 °C denaturiert und somit in DNA-Einzelstränge aufgetrennt (Abbildung 2). Bei der Hybridisierung lagern sich die zugegebenen Primer an die komplementären Enden der einzelsträngigen *template*-DNA an. Dies geschieht bei 45-65 °C, der *Annealing* (Anlagerungs)-Temperatur (Abbildung 3). Bei der DNA-Synthese verlängert die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) bei einer Temperatur von 72 °C, von dem *Primer* ausgehend, den komplementären zweiten DNA-Strang entlang der *templates* (Abbildung 4). Dieser dreischrittige Zyklus wird ungefähr 30-60 mal wiederholt, wobei jedes Mal eine Verdoppelung der durch das *Primer*-Paar definierten Ziel-Sequenzen stattfindet. Nach Ablauf von n Zyklen erhält man somit maximal 2^n doppelsträngige Kopien der *template*-DNA.

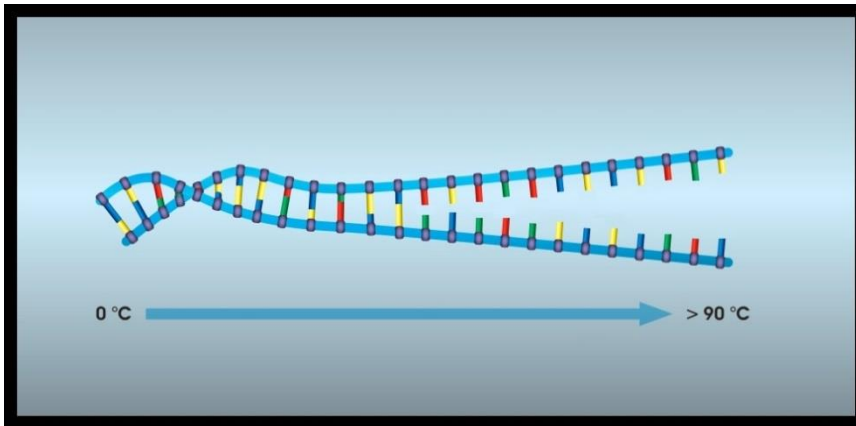


Abbildung 2: Denaturierung: Der DNA-Doppelstrang trennt sich bei Temperaturen von rund 94-100 °C in seine Einzelstränge auf (nach (124)).

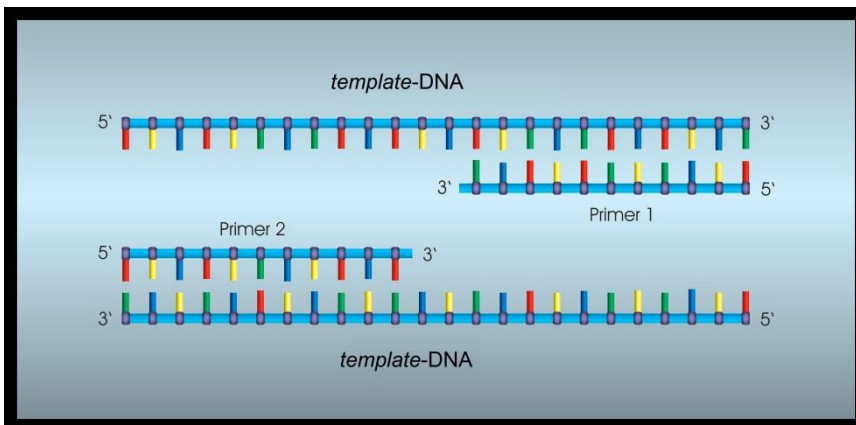


Abbildung 3: Hybridisierung: *Primer* binden an jeden der beiden Einzelstränge an genau den Stellen, an denen die Kopie der DNA beginnen soll (nach (124)).

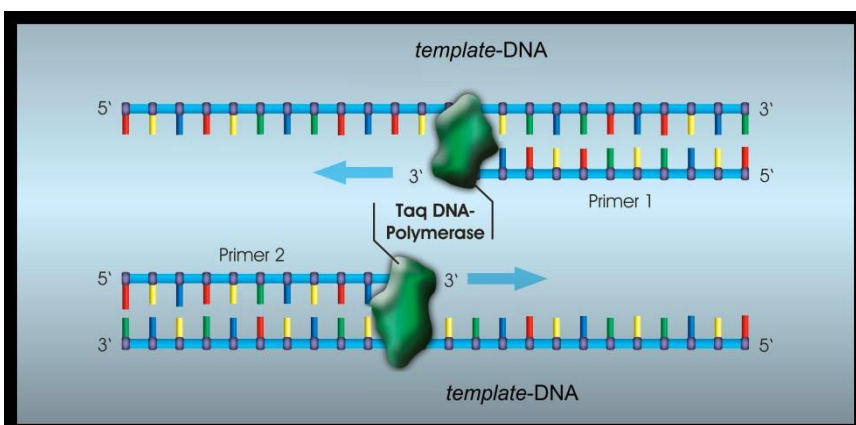


Abbildung 4: DNA-Synthese: *Taq*-Polymerasen verlängern den Primer mit den ebenfalls zugesetzten DNA-Einzelbausteinen. So wird die einzelsträngige DNA wieder zum Doppelstrang komplettiert (nach (124)).

3.6.5.2 Quantitative *realtime*-PCR mit dem *LightCycler*

Der *LightCycler*

Die quantitative *realtime*-PCR wurde mit dem Roche-*LightCycler* (*LightCycler* 1.0, Roche Diagnostics, Mannheim, D) durchgeführt. Dieser besitzt eine Thermokammer, in welcher sich ein software-gesteuerter rotierender Glaskapillarenhalter befindet. Die PCR und die Fluoreszenzmessung finden in optisch klaren Borsilikat-Glaskapillaren statt, die durch Luft abgekühlt beziehungsweise erhitzt werden. Durch die Verwendung von Luft, mit ihrer geringen Wärmekapazität als Wärmeträger und dem großen Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Glaskapillaren ist eine schnelle Veränderung der Temperatur und somit Verkürzung der Phasendauer möglich.

Fluoreszenzoptische Bestimmung der DNA-Menge mit Hilfe des *SYBR[®]-Green I-Fluoreszenzfarbstoffes*

Mit Hilfe der Echtzeit-PCR im *LightCycler* lässt sich die Genexpression quantitativ erfassen. Die Amplifikation der DNA wird hierbei mit der quantitativen Bestimmung der *template*-DNA-Menge durch fluoreszenzoptische Methoden kombiniert. Hierzu wird ein Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR[®] Green*, Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet, der durch eine Blaulicht (470 nm) emittierende Diode angeregt wird (Abbildung 5). Der Farbstoff lagert sich in die *minor groove* (kleine Furche) doppelsträngiger DNA ein. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um das 800 bis 1000fache erhöht (Abbildung 6). Während der Elongation binden mehr und mehr Fluoreszenzfarbstoffmoleküle an die neu-synthetisierte DNA. Bei kontinuierlichem Reaktionsmonitoring ist ein Fluoreszenz-Anstieg in Echtzeit zu beobachten, wobei die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA ist (Abbildung 7). Unter Denaturierung der DNA in der Phase der Erhitzung werden die Fluoreszenz-Moleküle freigesetzt und das Fluoreszenz-Signal fällt.

Nach jedem Zyklus wird im *LightCycler* die emittierte Fluoreszenz gemessen und in Echtzeit (*realtime*) in Form einer Kurve, welche die Intensität der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl graphisch darstellt, aufgezeichnet.

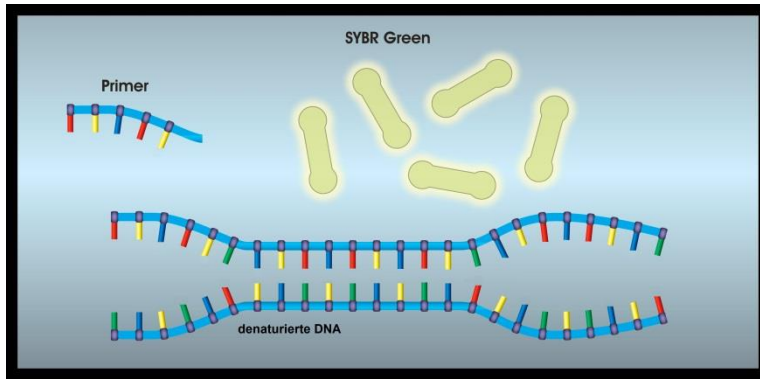


Abbildung 5: Zu Beginn der Amplifikation beinhaltet der Reaktionsansatz die denaturierte DNA, die *Primer* und den Fluoreszenzfarbstoff. Die ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle fluoreszieren schwach, wobei sie ein minimales Fluoreszenz-Hintergrundsignal produzieren, welches während der Computer-Analyse subtrahiert wird (nach (125)).

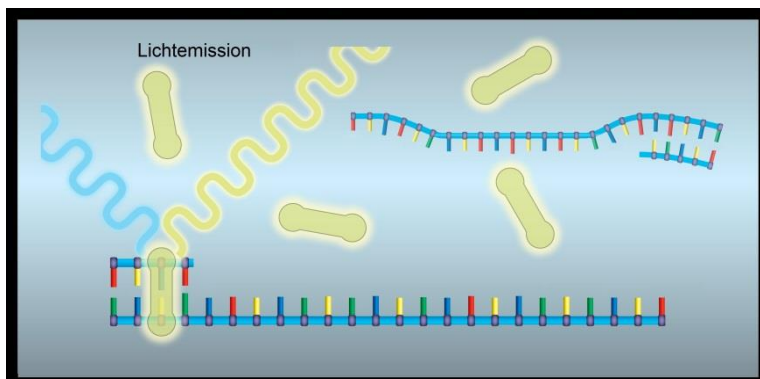


Abbildung 6: Nach dem Anlagern der *Primer* können wenige Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle an den Doppelsträngen anbinden. Das Binden an der DNA führt zu einem deutlichen Anstieg der Lichtemission der *SYBR[®] Green*-Moleküle (nach (125)).

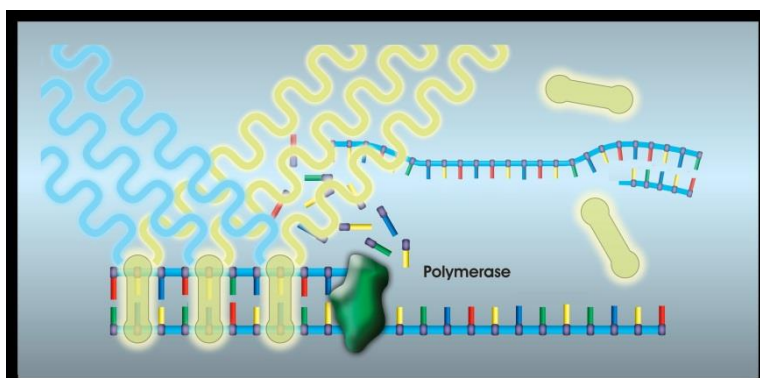


Abbildung 7: Während der Elongation binden zunehmend mehr Fluoreszenzfarbstoffmoleküle an die neu-synthetisierte DNA. Bei kontinuierlichem Reaktionsmonitoring ist ein Fluoreszenz-Anstieg in Echtzeit zu beobachten (nach (125)).

Die Messung und Darstellung der DNA-Menge im zeitlichen Verlauf: die Amplifikationskurve

Die Anzahl der DNA-Moleküle nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$N = N_0 \times E^n$$

| | |
|-----------------------|--|
| N: | Anzahl der DNA-Doppelstränge bei einem bestimmten Zyklus |
| N₀: | Anfangszahl der DNA-Doppelstränge vor Beginn der PCR |
| E: | Amplifikationseffizienz |
| n : | Zykluszahl |

Bei graphischer Darstellung der Anzahl der DNA-Doppelstränge bezogen auf die Zykluszahl n ergibt sich eine Kurve mit einem sigmoiden Verlauf, welcher durch die sich ständig verändernde Effizienz E bedingt ist. Dies ist Folge der sich verschiebenden Konzentrationsverhältnisse der Reaktionspartner.

Das Fluoreszenzsignal wird abhängig von der Zahl der Ausgangskopien erst nach einer bestimmten Zykluszahl messbar, die umso kleiner ist, je mehr *template*-DNA sich im Reaktionsansatz befunden hat. Grund hierfür ist, dass das Signal unterhalb der Sensitivität des Fluorimeters liegt.

In der initialen *lag*-Phase sind relativ zu viele Reaktionsreagenzien wie Polymerase und Nukleotide, aber relativ zu wenig Substrat, nämlich Matrizen-DNA, vorhanden.

Im Laufe der Zyklen nimmt die Anzahl der Matrizen-DNA zu, sodass ein ausgewogenes Verhältnis von Substrat und Reaktionsreagenzien herrscht. Diese optimalen Amplifikationsbedingungen herrschen jedoch nur für kurze Zeit, für die Dauer von wenigen Zyklen (*log*-Phase). Währenddessen kommt es zu einer exponentiellen Synthese von DNA.

Im Folgenden wird ein Sättigungspunkt erreicht, nämlich wenn mehr Matrizen als Enzyme vorhanden sind. Das exponentielle Wachstum geht in ein lineares Wachstum über.

Limitierender Faktor der Reaktion ist schließlich die Anzahl der vorhandenen Nukleotide. Die Amplifikationskurve zeigt ein Plateau, da keine weiteren Kopien mehr angefertigt werden können (Plateauphase).

Im *LightCycler* wird für jede Probe die Fluoreszenz, welche proportional zu der vorhandenen *template*-DNA ist, gemessen und jeweils als eine Kurve graphisch gegen die Zykluszahl

dargestellt. Die Kurve wird umso weiter nach links verschoben, je mehr *template*-DNA in der Probe vorhanden war (Abbildung 8).

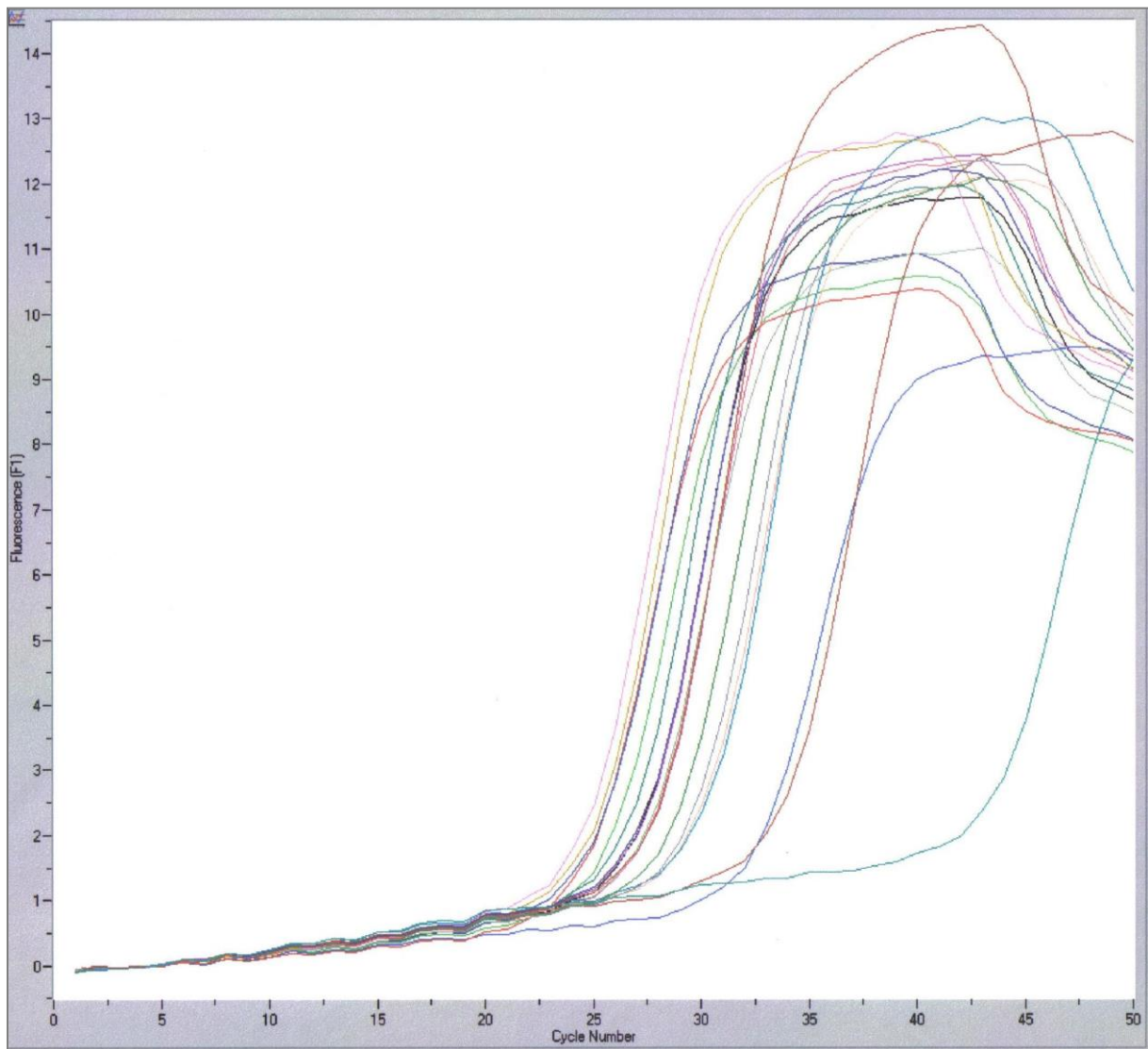


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Kinetik der PCR: Die entstehende Kurven, die Amplifikationskurven der einzelnen Proben, spiegeln die Kinetik der PCR mit jeweils exponentiellem Wachstum und, nach einem linearen Verlauf, Übergang in eine Plateauphase wider. Die Kurven sind umso weiter nach links verschoben, je mehr *template*-DNA in der jeweiligen Probe vorhanden war.

Schmelzkurve

Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR*[®] *Green I* lagert sich unspezifisch in doppelsträngiger DNA ein. Deshalb wird nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität der gebildeten DNA-Doppelstränge bestimmt werden kann. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen.

Hierzu wurden die Proben zunächst auf 65 °C (bzw bei IL-8: 70 °C) abgekühlt, um im Anschluss mit 0,1 °C pro Sekunde bis auf 99 °C erhitzt zu werden. Dabei wurde gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Nach einem langsamen Abfall des Fluoreszenzsignals zu Beginn des Temperaturanstieges, kommt es im Verlauf zu einem steilen Abfall auf nahezu Null. Grund hierfür ist, dass die jeweiligen als DNA-Doppelstrang vorliegenden Produkte an einem für sie charakteristischen Schmelzpunkt zu zwei einzelsträngigen Molekülen denaturiert werden. Je länger und somit in der Regel spezifischer ein DNA-Produkt ist, desto höher ist seine Schmelztemperatur. Durch das Schmelzen werden eingelagerte *SYBR*[®]-*Green*-Moleküle freigesetzt, wodurch die Fluoreszenz sinkt. Mit dieser Methode ist somit eine Unterscheidung zwischen unspezifischen und spezifischen DNA-Produkten möglich (Abbildung 9).

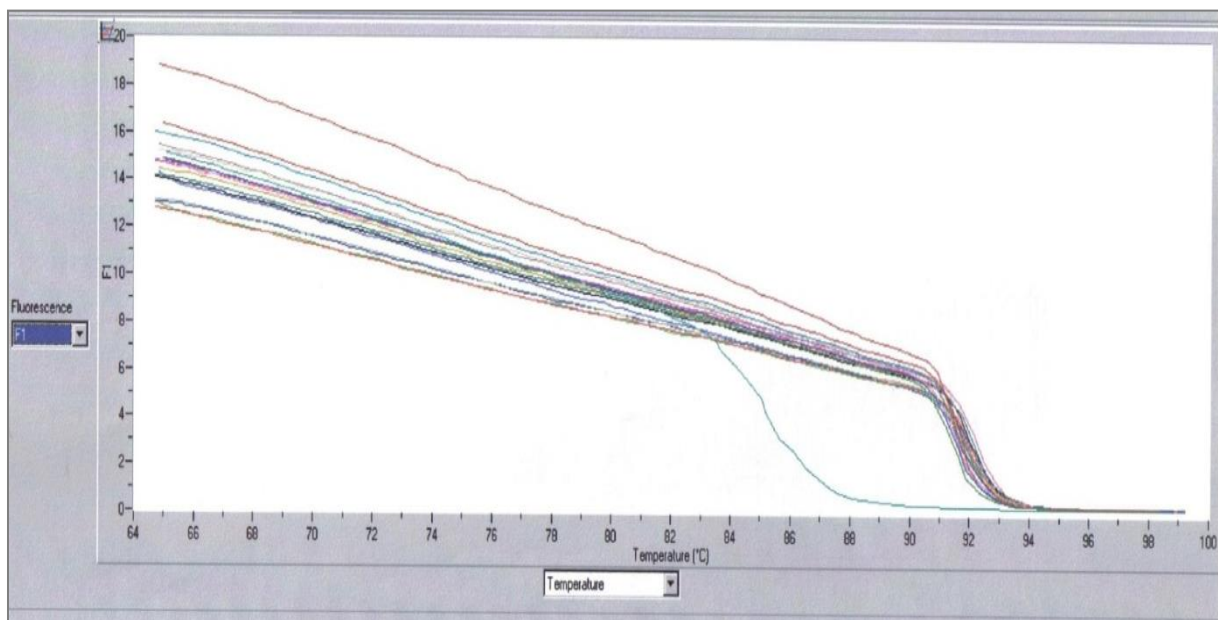


Abbildung 9: Schmelzkurven der dsDNA (hier des GM-CSF-Gens bzw H₂O) verschiedener im Versuchsaufbau untersuchter Schleimhautproben. Die Schmelzkurven der einzelnen Proben sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Nach einem zunächst langsamen kontinuierlichen Abfall des Fluoreszenzsignals zu Beginn des Temperaturanstieges, kommt es im Verlauf zu einem steilen Abfall auf nahezu Null, wenn die spezifische Schmelztemperatur der jeweiligen DNA-Produkte erreicht ist. Die Schmelzkurve von H₂O zeigt einen früheren Abfall, da in dieser Probe unspezifische DNA-Produkte mit entsprechend niedrigerer Schmelztemperatur entstanden sind.

Schmelzkurvenanalyse

Die *LightCycler*-Software rechnet das Fluoreszenz/Temperatur-Diagramm in ein Diagramm um, welches die Fluoreszenzänderung pro Temperaturänderung (entspricht der negativen 1. Ableitung der Schmelzkurve, mathematisch: $-dF/dT$) auf der y-Achse gegen die Temperatur auf der x-Achse graphisch dargestellt. An den Wendepunkten der Schmelzkurven ist der Fluoreszenzabfall am stärksten, die Fluoreszenzstärke ändert sich am meisten, das heißt $-dF/dT$ wird maximal. Dies entspricht dem Peak in der Schmelzkurvenanalyse. Bei dieser Temperatur liegt der für das PCR-Produkt charakteristische Schmelzpunkt. Bei gleichartigen PCR-Produkten hat der Peak daher eine eher spitze Form, wohingegen er sich bei Vorhandensein vieler verschiedener Nebenprodukte breitbasiger und niedriger darstellt. Die Fläche unterhalb des Peaks korreliert ungefähr mit der Menge an spezifischer DNA (Abbildung 10).

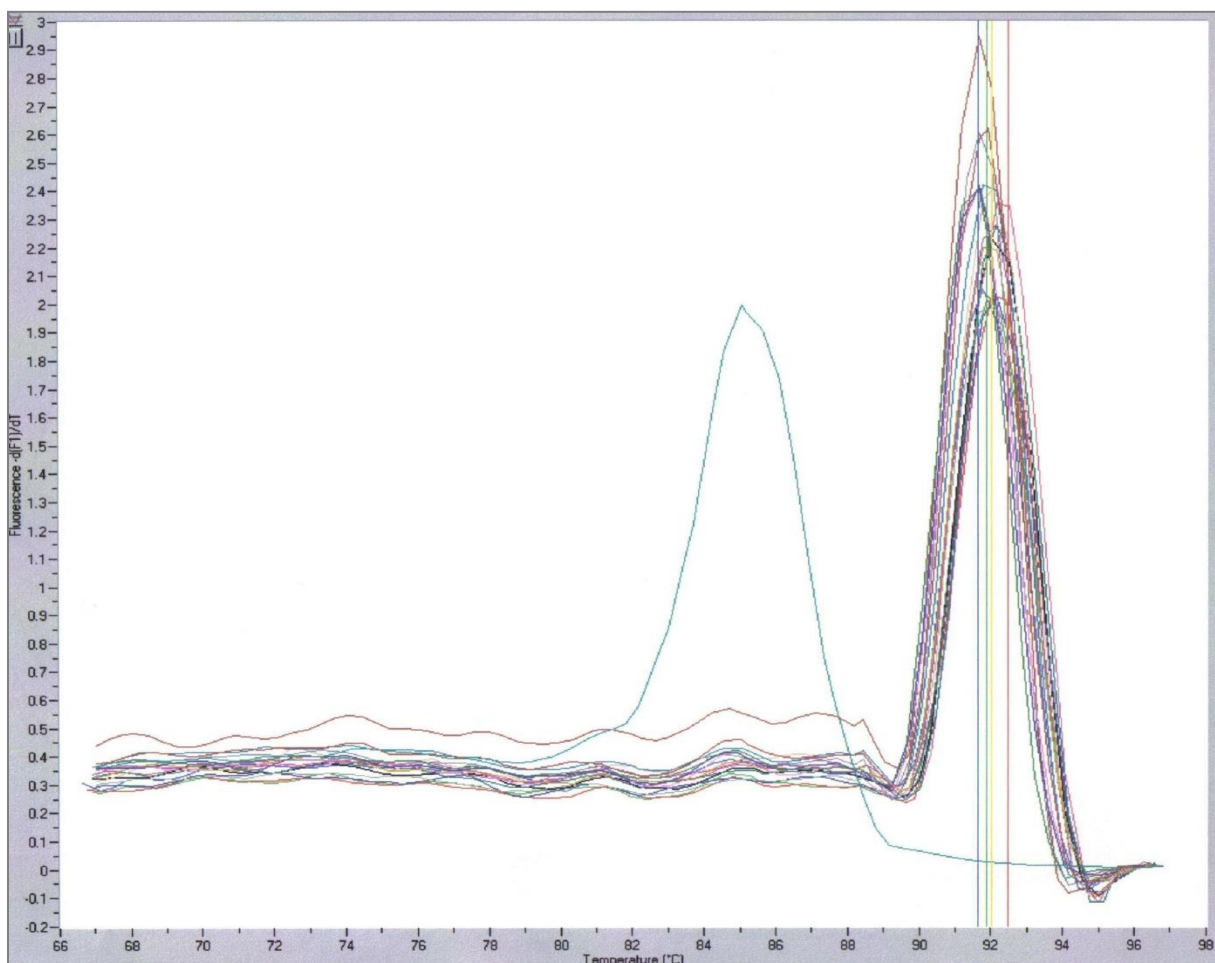


Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate nach PCR mit *SYBR® Green I*. Es zeigt sich bei 92 °C ein Gipfel, welcher der Schmelztemperatur des gewünschten Amplifikats entspricht, sowie bei 85 °C ein breitbasigerer Gipfel, der die Schmelztemperatur des aus Wasser gebildeten Amplifikats anzeigt.

Schwierigkeiten in den quantitativen Untersuchungen ergaben sich dadurch, dass *SYBR[®] Green I* unspezifisch doppelsträngige DNA detektiert. Bei geringen cDNA-Konzentrationen im PCR-Ansatz entstanden neben den gewünschten Amplifikaten vermehrt Primerdimere, in welche sich der Farbstoff einlagerte. In der folgenden Schmelzkurvenanalyse ergab sich dadurch ein zweiter Gipfel, welcher nicht die Schmelztemperatur des gesuchten Amplifikats aufwies (Abbildung 11). Das Vorliegen von störender doppelsträngiger DNA, die nicht der Zielsequenz entsprach, machte eine quantitative Auswertung solcher Proben unmöglich. Bei Einsatz von höheren Konzentrationen eingesetzter cDNA verschwand der zweite Schmelzkurvengipfel.

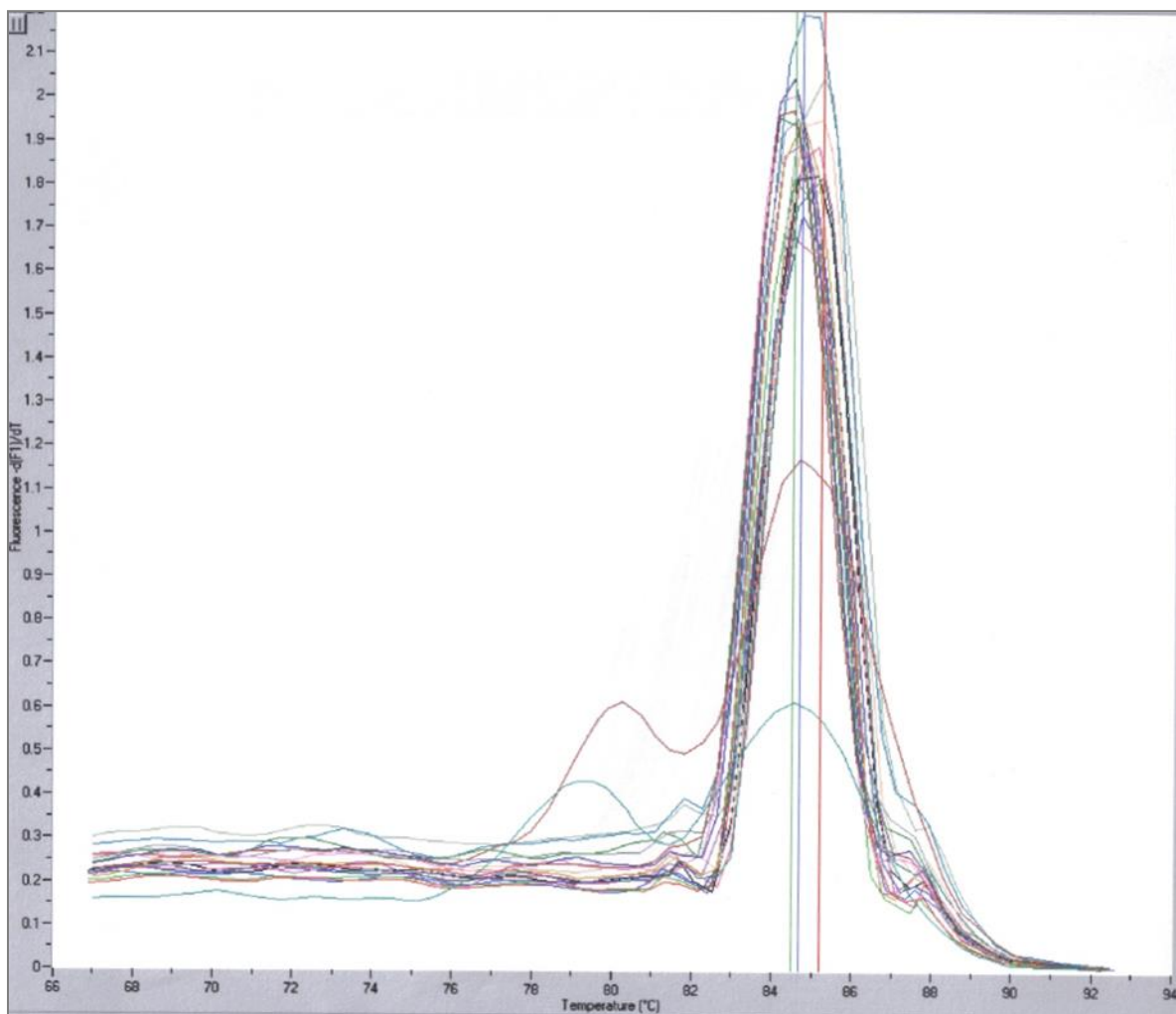


Abbildung 11: Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate nach PCR mit *SYBR[®] Green I* (dargestellt in unterschiedlichen Farben) . Es zeigt sich bei 85 °C ein Gipfel, welcher der Schmelztemperatur des gewünschten Amplifikats entspricht, sowie bei 79 °C bzw. 80 °C jeweils ein weiterer, deutlich kleinerer Gipfel, der das Vorliegen von störender doppelsträngiger DNA zeigt, die nicht der Zielsequenz entspricht und eine exakte Quantifizierung dieser für die jeweiligen Proben unmöglich macht.

Durchführung der PCR

Zur Herstellung des Reaktionsansatzes für die quantitative PCR wurde das *FastStart DNA Master^{PLUS}*-Kit der Firma Roche verwendet.

Die Zusammensetzung des Versuchsansatzes wurde in Testdurchläufen variiert, bis optimale Schmelzkurvenanalysen ohne Darstellung von Nebenprodukten erreicht wurden. Der so experimentell festgestellte optimale Versuchsansatz für je eine Probe enthielt je 1 µl H₂O, 1 µl 20 µM *Primer*-Paar (*Forward*, *Reverse*), 2 µl *SYBR[®]-Green*-Reaktionsmix (enthält *SYBR[®]-Green*, *FastStart Taq*-Polymerase, Poly-dNTP-Mix, Reaktionspuffer und 1 mM MgCl₂) und 6 µl des zu untersuchenden cDNA-*Templates*.

Eine Glaskapillare pro Lauf enthielt als Negativkontrolle DEPC-Wasser anstatt der *template*-DNA. Nachdem die Proben kurz anzentrifugiert worden waren, um das Reaktionsgemisch in die Spitze der Glaskapillaren zu platzieren, wurden sie in den Probenkranz des *LightCyclers* eingesetzt.

Die verwendeten *Primer* waren bereits im Vorfeld in unserem Labor etabliert worden. Die Synthese erfolgte durch TIB Molbiol (Berlin, D).

Folgende *Primer*-Sequenzen wurden verwendet:

| | |
|---------|---|
| GAPDH: | 5'- GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC C 3'- GTC TGA GTG TGG CAG GGA CTC |
| GM-CSF: | 5'- GTG GCC TGC AGC ATC TCT GCA C 3'- CCT GGA CTG GCT CCC AGC AGT C |
| TNF-α: | 5'- GGG ACC TCT CTC TAA TCA GCC CTC TGG 3'- GAC GGC GAT GCG GCT GAT GG |
| IL-1α: | 5'- CAC TCC ATG AAG GCT GCA TGG 3'- ACC CAG TAG TCT TGC TTT GTG G |
| IL-1β: | 5'- CGA TCA CTG AAC TGC ACG CTC CG 3'- GGT GAA GTC AGT TAT ATC CTG GCC G |
| IL-8: | 5'- GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA G 3'- GCA TCT GGC AAC CCT ACA ACA G |

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten *Primer*

Für die verwendeten *Primer* ergaben sich unterschiedliche optimale Amplifikationszeiten und *Annealing*-Temperaturen:

| Primer | Annealing-Temperatur (°C) | Amplifikationszeit (sek) |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| GAPDH | 72 | 28 |
| GM-CSF | 72 | 19 |
| TNF-α | 72 | 12 |
| IL-1α | 68 | 10 |
| IL-1β | 72 | 26 |
| IL-8 | 69 | 10 |

Tabelle 2: Amplifikationszeiten und *Annealing*-Temperaturen der einzelnen *Primer*

Das *Cycle*- und Schmelzprotokoll setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Denaturierung

| | Temperatur (°C) | Zeit (sek) |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| Denaturierung | 95 | 600 |

2. Amplifikation (45 – 50 Zyklen)

| | Temperatur (°C) | Zeit (sek) |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Denaturierung | 95 | 10 |
| Annealing | <i>Primer-spezifisch (s.o.)</i> | <i>Primer-spezifisch (s.o.)</i> |
| Amplifikation | <i>Primer-spezifisch (s.o.)</i> | <i>Primer-spezifisch (s.o.)</i> |
| Fluoreszenzmessung | <i>Primer-spezifisch (s.o.)</i> | 1 |

3. Schmelzen

| | Temperatur (°C) | Zeit (sek) |
|------------------|------------------------|-------------------|
| Abkühlung | 65 (bzw. bei IL-8: 70) | 10 |
| Schmelzen | 99 | - |

Während der Erhitzung auf 99°C (0,1 °C / sek) erfolgte eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz.

3.6.6 Identifizierung der PCR-Produkte durch die Gelelektrophorese

Um neben der Schmelzkurvenanalyse mit einer weiteren Methode zu überprüfen, ob in der einzelnen Probe tatsächlich nur die cDNA des jeweils gewünschten Zielgens und nicht verschiedene unerwünschte Nebenprodukte amplifiziert wurden, wurde im Anschluss an die Amplifikation bei Stichproben eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Längen im elektrischen Feld. Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose (Invitrogen) in 100 g TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA; T9650Sigma) suspendiert und durch Erhitzen in der Mikrowelle (Mikrowelle HMG 3103 Bosch Hausgeräte, Stuttgart) vollständig gelöst und anschließend in Elektrophoresekammern (Elektrophoresegerät E734 Consort, Turnhout, B) gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen des Farbstoffmarkers *Blue Juice*® (Invitrogen, Karlsruhe, D) versetzt, und das Proben-Farbstoff-Gemisch wurde in die Taschen des Gels pipettiert und nach Auftragen in die Geltaschen in 1 x TAE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 150 V über 60 min hinweg aufgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in einem Ethidiumbromidbad (Endkonzentration 0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 305 nm mit dem UV-Transilluminator (UV-Transilluminator TFX 20M Biometra, Göttingen) ausgewertet und fotografiert.

3.7 Auswertungsmethodik

Relative Quantifizierung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *LightCycler DataAnalysis*-Software von Roche, Version 3.5, welche die Phase der logarithmischen Amplifikation der PCR ermittelt. Bei Auswahl der *Second Derivative* Maximum-Methode berechnet die Software das Maximum der zweiten Ableitung der Funktion, die die Fluoreszenz F in Abhängigkeit von der Zykluszahl n beschreibt (mathematisch $(dF/dn)/dn$). Das Maximum der zweiten Ableitung stellt den Wendepunkt des Graphen der Funktion dar und wird als *Crossing point* (Cp) bezeichnet. Er gibt die Anzahl der Zyklen an, nach der die logarithmische Phase der Amplifikation beginnt und ist ein indirektes Maß dafür, wie hoch die *template*-DNA-Konzentration in der Probe ist. Je mehr cDNA in dem Reaktionsansatz vorhanden ist, desto früher erreicht die Reaktion diese Phase und desto kleiner ist der Cp-Wert.

Bei der hier angewendeten relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens (*target-Gen*) auf ein Referenzgen bezogen. Hierfür wird ein sogenanntes *housekeeping gene* verwendet, welches nicht reguliert und somit stabil exprimiert wird. *Housekeeping*-Gene kodieren für Proteine, die für den Grundstoffwechsel von Zellen benötigt werden, zum Beispiel für den Glucose-Stoffwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurde GAPDH verwendet. Das relative Verhältnis von Ziel- und Referenzgen-DNA wird für jede Probe und eine Bezugsprobe (*calibrator*), die in jeden *LightCycler*-Lauf aufgenommen wird, bestimmt. Damit werden die Variationen korrigiert, die durch Unterschiede in der Qualität und Quantität der Nukleinsäuren verursacht werden. Als Bezugsprobe wurde eine 24 Stunden mit PBS inkubierte Schleimhaut verwendet.

Die Berechnung der relativen DNA-Menge eines jeden Ziel- oder Referenzgens erfolgt gemäß der allgemeinen PCR-Gleichung ($N=N_0 \times E^n$) und basiert auf den *Crossing points* der jeweiligen Probe und der Effizienz der PCR Reaktion.

$$N_T = N_{T0} \times E_T^{CpT}$$

$$N_R = N_{R0} \times E_R^{CpR}$$

| | |
|------------------------|---|
| N_T: | Relative DNA-Menge eines jeden Zielgens (<i>target gene</i>) |
| N_{T0}: | Anfangszahl der DNA-Doppelstränge des Zielgens vor Beginn der PCR |
| E_T: | Amplifikationseffizienz des Zielgens |
| CpT: | <i>Crossing point</i> des Zielgens |

| | |
|------------------------|---|
| N_R: | Relative DNA-Menge eines jeden Referenzgens (<i>reference gene</i>) |
| N_{R0}: | Anfangszahl der DNA-Doppelstränge des Referenzgens vor Beginn der PCR |
| E_R: | Amplifikationseffizienz des Referenzgens |
| CpR: | <i>Crossing point</i> des Referenzgens |

Um das auf die Bezugsprobe vereinheitlichte relative Verhältnis (*normalized ratio*) zu berechnen, wird die relative Menge von Ziel- zu Referenzgen-DNA jeder Probe ($N_{T(S)}/N_{R(S)}$) durch das Verhältnis der Ziel- zu Referenzgen-DNA der Bezugsprobe ($N_{T(C)}/N_{R(C)}$) geteilt. Hierdurch werden die verschiedenen Sensitivitäten bei der Detektion des Ziel- und Referenz-

Amplikons korrigiert, die durch unterschiedliches *Annealing* der Proben verursacht werden. Nach Umformen (siehe Anhang) ergibt sich folgende Gleichung:

$$\begin{aligned}
 &\text{Normalized ratio} = \\
 &= (N_{T0(S)}/N_{R0(S)}) / (N_{T0(C)}/N_{R0(C)}) = \\
 &= (E_T^{CpT(C)}/E_R^{CpR(C)}) / (E_T^{CpT(S)}/E_R^{CpR(S)}) = \\
 &= (E_T^{CpT(C)}/E_R^{CpR(C)}) \times (E_R^{CpR(S)}/E_T^{CpT(S)}) = \\
 &= E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}
 \end{aligned}$$

| | |
|------------------------|--|
| N_T: | Anzahl der Zielmoleküle am <i>Crossing point</i> |
| N_R: | Anzahl der Referenzmoleküle am <i>Crossing point</i> |
| CpT: | Zykluszahl bei Erreichen der Detektionsschwelle des Zielgens = <i>Crossing point</i> des Zielgens (<i>target gene</i>) |
| CpR: | Crossing point des Housekeepinggens (<i>reference gene</i>) |
| C : | Bezugsprobe (<i>calibrator</i>) |
| S : | jeweilige Probe (<i>sample</i>) |
| E_T : | Amplifikationseffizienz des Zielgens |
| E_R : | Amplifikationseffizienz des Housekeepinggens |

Die optimale Amplifikationseffizienz bei der Polymerasekettenreaktion liegt bei 2, was die Replikation aller vorhandener *templates* bedeuten würde. Tatsächlich ist die Effizienz jedoch niedriger. Die *real-time* PCR Effizienz (E) wurde für die jeweiligen Primer aus den Steigungen externer Standardkurven, welche aus unterschiedlichen DNA-Verdünnungsstufen erstellt wurden, nach der Formel $E=10^{-1/\text{Steigung}}$ bestimmt. Die Effizienzen betragen für GAPDH: 1,88, GM-CSF: 1,87, TNF- α : 1,93, IL-1 α : 1,85, IL-1 β : 1,92 und IL-8: 1,94).

3.8 Lactatdehydrogenase-Test

Die Lactatdehydrogenase ist ein Enzym, welches eine zentrale Funktion im anaeroben Stoffwechsel hat. Sie katalysiert in Gegenwart des Coenzym NAD⁺ die Oxidation von Lactat, das bei der anaeroben Glycolyse gebildet wird. Hierbei entsteht Pyruvat, und der Elektronencarrier NADH wird regeneriert. Das Enzym ist ein Tetramer, das aus zwei verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut ist. Durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten dieser Untereinheiten können fünf verschiedene Isoenzyme

entstehen, deren Verteilung für die verschiedenen Organe charakteristisch ist. Kommt es zu einer Schädigung der Zellen, wie zum Beispiel beim Herzinfarkt, so erhöht sich der LDH-Spiegel im Serum. Werden die Zellen der Vaginalschleimhaut geschädigt, so kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der LDH-Konzentration im Erhaltungsmedium. Diese kann durch Messung der NADH-Abnahme photometrisch bei 340 nm nach der Wroblewski-La Due-Methode (126) indirekt bestimmt werden. Nach Beendigung der Inkubation der RHVE wurden jeweils die LDH-Konzentrationen in den Erhaltungsmedien bestimmt.

3.9 Statistik

Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Resultate der *realtime*-PCR wurde die Software REST[®] 2009 (127) verwendet. Die Ergebnisse sind graphisch in Form von *Whisker-box-plots* mit Darstellung des Medians, der Quartilen sowie der Maximal- und Minimalwerte wiedergegeben. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet, die Normalisierung der relativen Quantifizierung erfolgte in Bezug auf die RHVE-Proben, welche für 24 Stunden mit PBS versetzt worden waren. Statistische Signifikanz der Ergebnisse, welche hier durch $p < 0,05$ definiert wird, ist jeweils durch das Symbol * gekennzeichnet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Morphologische Beurteilung der Gewebeproben

Ziel der histologischen Untersuchungen des rekonstituierten humanen Vaginalschleimhautepithels (RHVE) war die Beurteilung der morphologischen Epithelveränderungen nach Infektion mit *C. albicans* und die evtl. Beeinflussung dieser Veränderungen durch vorherige bzw. nachfolgende Inkubation mit verschiedenen modifizierten *Lactobacillus GG*- Bestandteilen bzw. eines *Lactobacillus*-Produktes.

Die jeweiligen Versuche wurden drei Mal durchgeführt. Pro Epithelprobe wurden mehrere histologische Schnitte hergestellt und lichtmikroskopisch aufbereitet. Zur besseren Vergleichbarkeit werden im Folgenden die Bilder einer Versuchsreihe, deren Ergebnisse für die morphologischen Veränderungen in den Bildern aller drei Versuchsreihen repräsentativ erschienen, dargestellt.

4.1.1 Morphologie des nicht infizierten RHVE

Zunächst wurden als Kontrollansatz die morphologischen Veränderungen des RHVE nach 24-stündiger Inkubation mit der neutralen Kontrollsubstanz *Phosphate buffered saline* (PBS) betrachtet.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank mit PBS nahm die Dicke der Schleimhaut um 1-2 Keratinozytenzellschichten zu. Die Schleimhaut blieb weitgehend unbeschädigt, insbesondere Ödeme oder Nekrosen waren kaum zu erkennen (Abbildung 12).

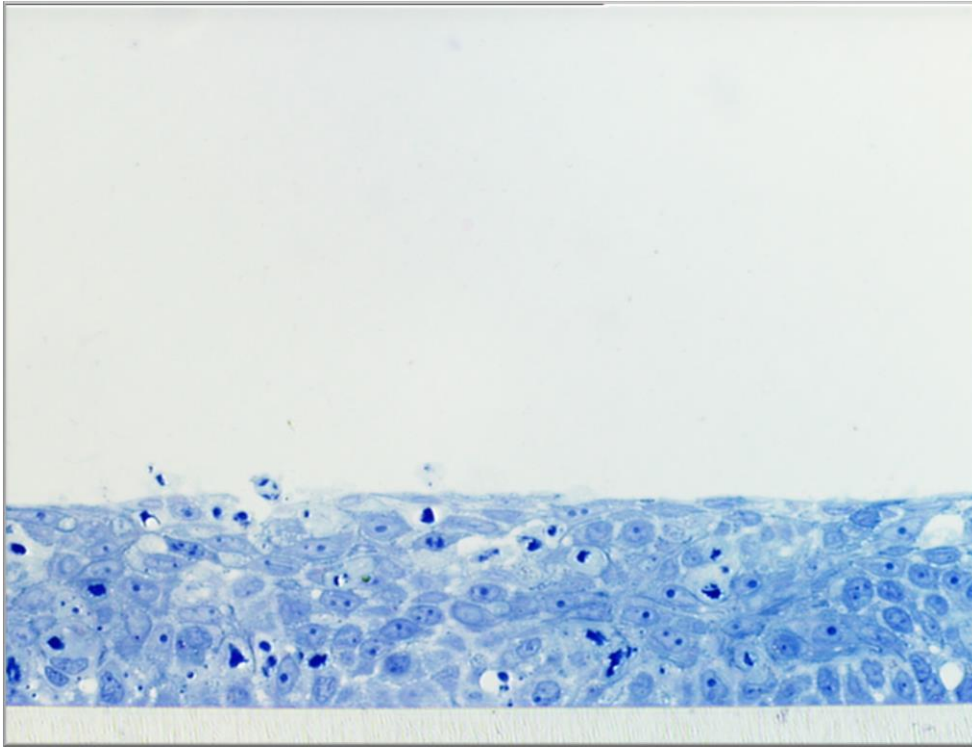


Abbildung 12: Histologisches Bild eines 24 Stunden mit PBS als Kontrollsubstanz inkubierten, nicht infizierten, rekonstituierten Vaginalepithels, bestehend aus 6-8 Zellschichten auf einer Polycarbonatträgerschicht. Die Zellen sind weitgehend intakt, es finden sich kaum Ödeme oder Nekrosen. Vergrößerung x 400.

4.1.2 Morphologie des RHVE nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314

Als Modell der Vaginalkandidose wurde das RHVE mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infiziert. Analog zu den im Folgenden untersuchten Testsubstanzen wurde das RHVE zunächst für 12 Stunden mit PBS als neutraler Kontrollsubstanz inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *C. albicans* und eine weitere 12-stündige Inkubation. Danach wurde ein histologischer Schnitt gewonnen und dieser nach Färbung lichtmikroskopisch untersucht. Im histologischen Bild wies das RHVE Gewebeschäden mit ödematös geschwollenen und nekrotischen Keratinozyten auf. Zellen lösten sich aus dem Epithelverband ab. Es kam zur Bildung von Vakuolen. Die interzellulären Zwischenräume waren vergrößert, es zeigte sich eine Spongiosis der Schleimhaut. Pilzzellen lagerten sich an der Oberfläche der Schleimhaut an, einige drangen in die oberen Epithelschichten ein (Abbildung 13).

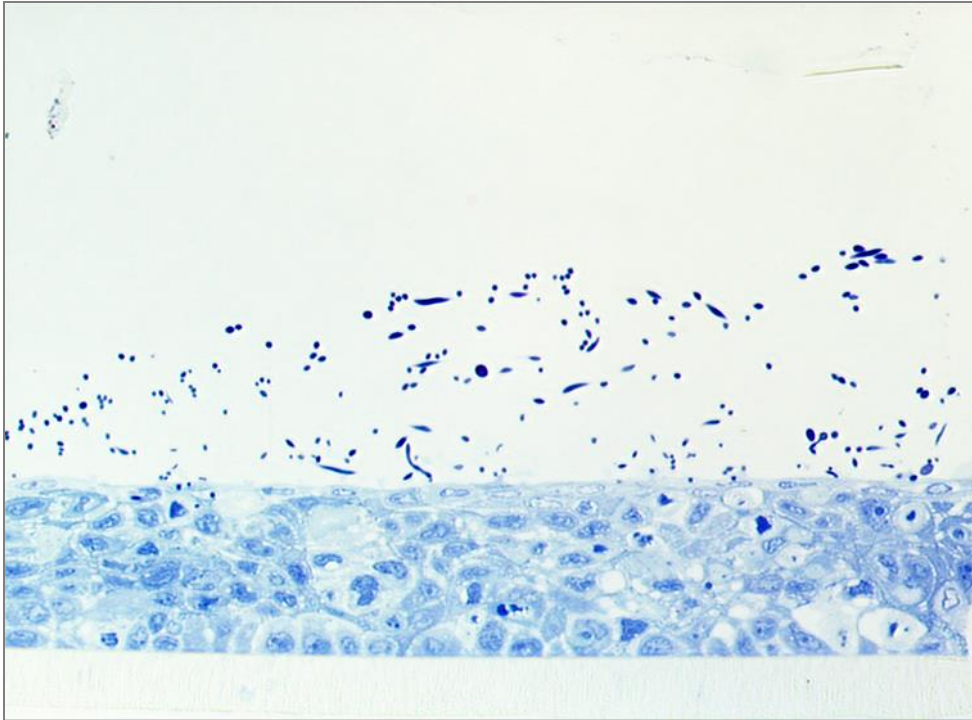


Abbildung 13: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Vakuolen, Ödeme sowie Nekrosen in den oberen und teilweise in den mittleren Zellschichten, Adhäsion von Hefezellen an der Schleimhautoberfläche. Vergrößerung x 400.

Bei der 24 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhaut wurde analog zu der Zugabe der Testsubstanzen in den folgenden Versuchen nach 12 Stunden PBS als Neutralsubstanz hinzugegeben. Unter lichtmikroskopischer Betrachtung zeigte sich, dass das Vaginalepithel deutlich stärker beschädigt war als bei 12stündiger Einwirkzeit des Hefepilzes. Keratinozyten lösten sich aus dem Zellverband, Vakuolen, teilweise konfluierend, waren bis in mittlere Zellschichten zu sehen. Desweiteren waren eine deutliche ödematöse Schwellung sowie Nekrosen der Schleimhautzellen zu beobachten. Zahlreiche Pilzzellen hafteten an der Schleimhautoberfläche an und drangen bis in die mittleren Epithelschichten ein. Somit konnten die Hefepilzzellen in Abhängigkeit von der Infektionsdauer zunehmend tiefer in das Epithel eindringen (Abbildung 14).

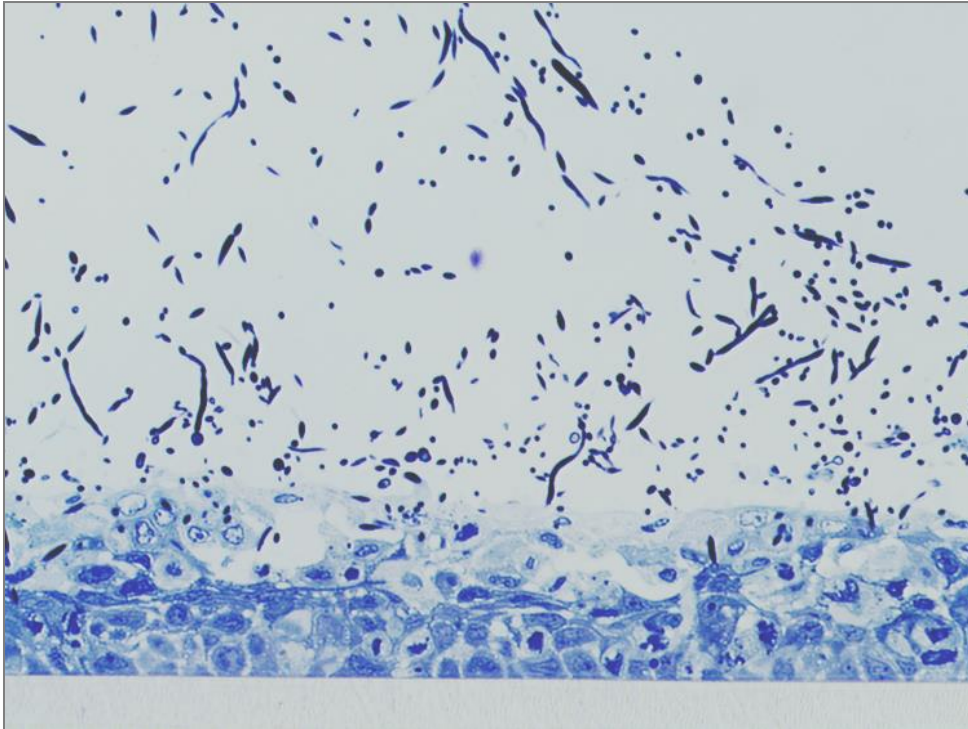


Abbildung 14: Histologisches Bild eines 24 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Starke Schädigung des Epithels, Nekrosen und Ödeme mit Adhäsion und Eindringen von Hefepilzzellen bis in die mittleren Zellschichten. Vergrößerung x 400.

4.1.3 Morphologie der vorinkubierten, infizierten RHVE

Um die Auswirkungen einer Vorinkubation des RHVE mit den verschiedenen *Lactobacillus*-Bestandteilen bzw. eines Lactobacillenproduktes auf die Epithelveränderungen zu beurteilen, wurde die Schleimhaut jeweils für 12 Stunden mit diesen inkubiert, bevor eine 12-stündige zusätzliche Inkubation mit *C. albicans* erfolgte. Anschließend wurden die histologisch aufbereiteten Epithelproben lichtmikroskopisch untersucht und die jeweiligen Veränderungen im Vergleich zu der 12 Stunden mit PBS als Kontrollsubstanz vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* infizierten Schleimhaut beurteilt.

4.1.3.1 Vorinkubation mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Vorinkubation des Vaginalepithels mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG* vor Infektion durch *C. albicans* bewirkte im histologischen Bild eine etwas stärkere Schädigung als eine alleinige Infektion mit gleicher Einwirkdauer des Pilzes.

Lichtmikroskopisch ist zu erkennen, dass die Anzahl der Zellschichten und somit auch die Epitheldicke vermindert ist. Es finden sich größere Vakuolen, nekrotische und ödematöse Keratinozyten bis in die mittleren Epithelschichten. Die Basalzellschicht ist weitgehend intakt (Abbildung 15).

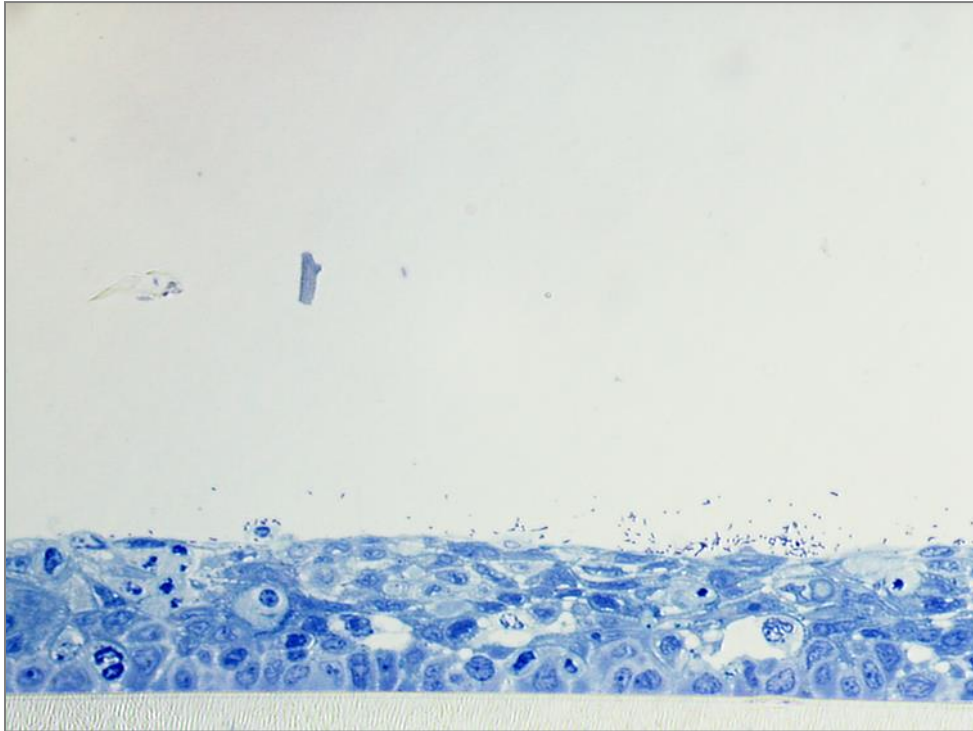


Abbildung 15: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit hitzeinaktivierten *LGG* vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Ödeme, Nekrosen und Vakuolen bis in mittlere und teilweise untere Zellschichten, Ablösung oberflächlicher Epithelzellen, Abnahme der Epitheldicke, intakte Basalzellschicht. Vergrößerung x 400.

4.1.3.2 Vorinkubation mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Vor Testung der spezifischen Zellwandkomponenten wurden die Effekte einer Vorbehandlung des Vaginalkandidosmodells mit der durch Ultraschall fragmentierten gesamten Zellwand von *Lactobacillus rhamnosus GG* untersucht. Diese Suspension enthält sowohl Fragmente der Zellmembran als auch sämtliche Komponenten der Zellwand wie Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Wandteichonsäure sowie zellmembran- und zellwandassoziierte Proteine (*S-Layer*).

Im histologischen Bild erschien die Schleimhaut durch vergrößerte interzelluläre Zwischenräume sowie konfluierende Vakuolen aufgelockert. Es fanden sich zahlreiche ödematös vergrößerte und nekrotische Keratinozyten. Die Zeichen der Schädigung waren bis in tiefe Zellschichten erkennbar. Pilzzellen konnten nicht dargestellt werden (Abbildung 16). Die Ausprägung der Gewebsschädigung in diesem Ansatz geht über das Ausmaß der nur mit PBS als neutralen Kontrollsubstanz vorbehandelten und im Anschluss daran infizierten Epithelprobe hinaus.

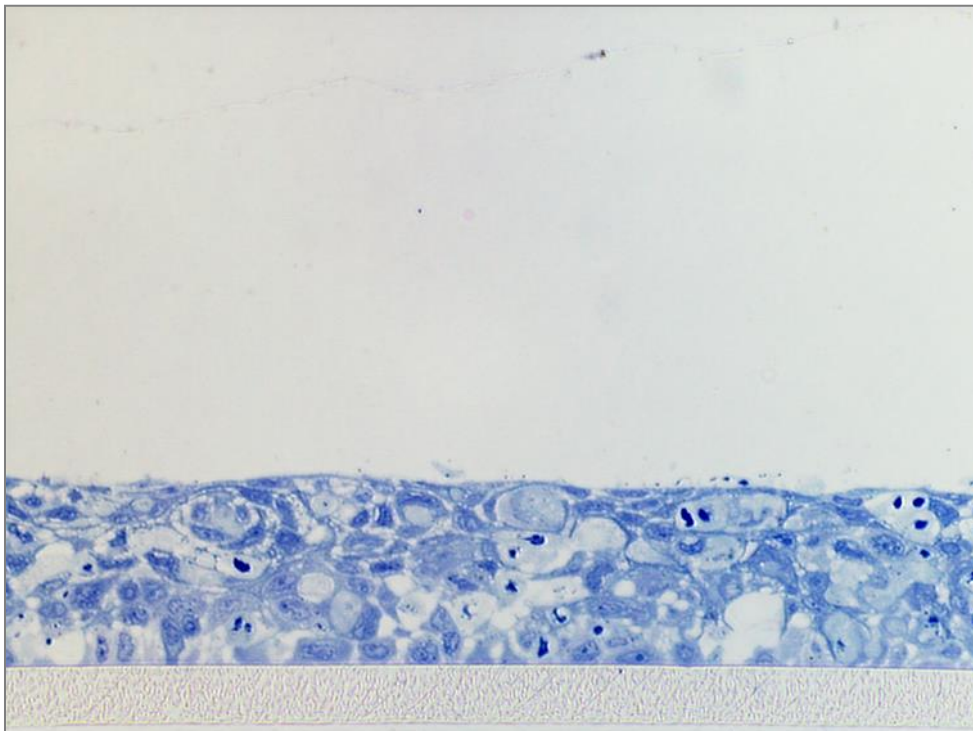


Abbildung 16: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit ultraschallbehandelten Lactobacillen (Zellwandfragmente von *LGG*) vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Vergrößerte interzelluläre Zwischenräume und Vakuolen bis in die basale Zellschicht, dadurch aufgelockert wirkende Schleimhaut. Zahlreiche Ödeme und Nekrosen. Vergrößerung x 400.

4.1.3.3 Vorinkubation mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Vorinkubation der Schleimhaut mit Peptidoglycan, dem Hauptbestandteil der Zellwand von *Lactobacillus rhamnosus GG*, reduzierte den Gewebeschaden im Vergleich zu der mit PBS vorbehandelten, infizierten Epithelprobe.

Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigte sich eine auf die oberen Zellschichten beschränkte Epithelschädigung. Hier stellten sich wenige Vakuolen dar, durch Herauslösung von Zellen aus den oberen Zellschichten kam es zu einer Abnahme der Schleimhautdicke. Die unteren Zellschichten hingegen waren weitgehend intakt (Abbildung 17).

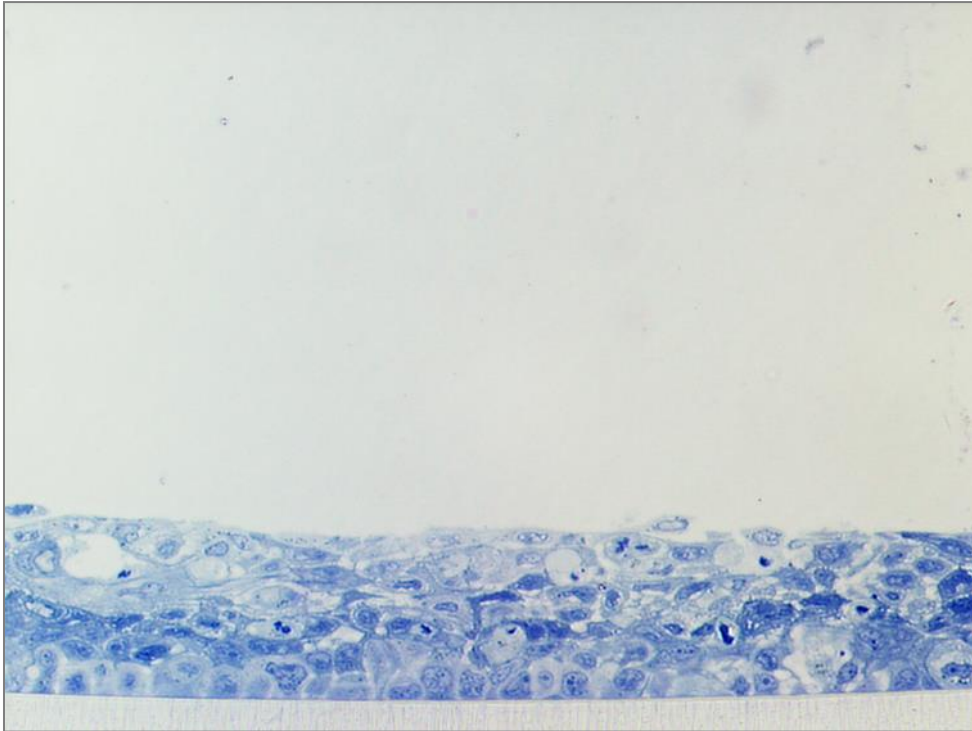


Abbildung 17: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit Peptidoglycan von *LGG* vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Begrenzung des Epithelschadens auf die oberen Zellschichten mit Vakuolen, Ablösung oberflächlicher Keratinozyten und dadurch leichter Verminderung der Epitheldicke. Weitgehend intaktes Epithel in den tieferen Zellschichten. Vergrößerung x 400.

4.1.3.4 Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus GG*

Als weiterer spezifischer Bestandteil der Bakterienzellwand wurde Lipoteichonsäure, welche durch Phenolbehandlung von *Lactobacillus GG* gewonnen wurde, in ihrer Wirkung auf eine anschließend ausgelöste Vaginalkandidose untersucht.

Die Epithelschädigung war nach Vorinkubation mit diesem amphiphilen Glycolipid deutlich stärker ausgeprägt als bei der mit PBS als Kontrollsubstanz vorbehandelten, infizierten Schleimhaut. Unter dem Lichtmikroskop konnte eine massive Schädigung des Epithels beobachtet werden. Große, konfluierende Vakuolen waren bis in mittlere und tiefe

Zellschichten erkennbar. Es fanden sich zahlreiche ödematöse und nekrotische Keratinozyten bis in die basale Zellschicht. Die Gewebestruktur war zum Teil aufgehoben. Insgesamt waren nur wenige Pilzzellen sichtbar, einige waren bis in tiefere Lagen eingedrungen (Abbildung 18).

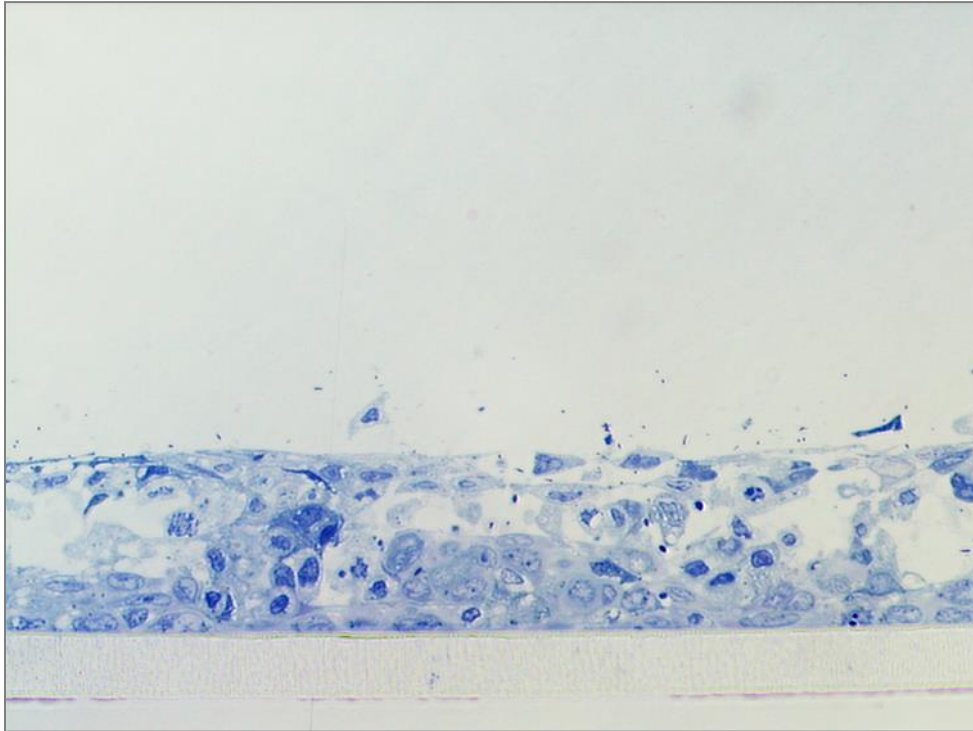


Abbildung 18: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *LGG* vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Massive Schädigung mit Ödemen, Nekrosen und großen, konfluierenden Vakuolen bis in tiefe Zellschichten, dadurch teilweise Zerstörung der Gewebestruktur. Vergrößerung x 400.

4.1.3.5 Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*

Nachdem die Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von Lactobacillen zu einer ausgeprägten Gewebedestruktion geführt hatte, wurde zum Vergleich die Auswirkung einer Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* auf das Vaginalkandidosemodell untersucht. Im histologischen Bild wirkt die Schleimhaut durch das Ablösen von Keratinozyten aus den oberen Schichten ausgefranst. Einige Epithelzellen liegen frei im Bild. Zudem finden sich durch alle Zellschichten hindurch viele Vakuolen und ödematöse sowie nekrotische Zellen. Die Schleimhautdicke ist aber wegen der ödematösen Schwellung der noch vorhandenen Zellen kaum verändert. Zahlreiche Pilzzellen konnten sich an die Schleimhautoberfläche

anlagern und einige auch eindringen (Abbildung 19). Im Vergleich zum mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus GG* vorinkubierten Epithel ist die Schädigung etwas geringer ausgeprägt.

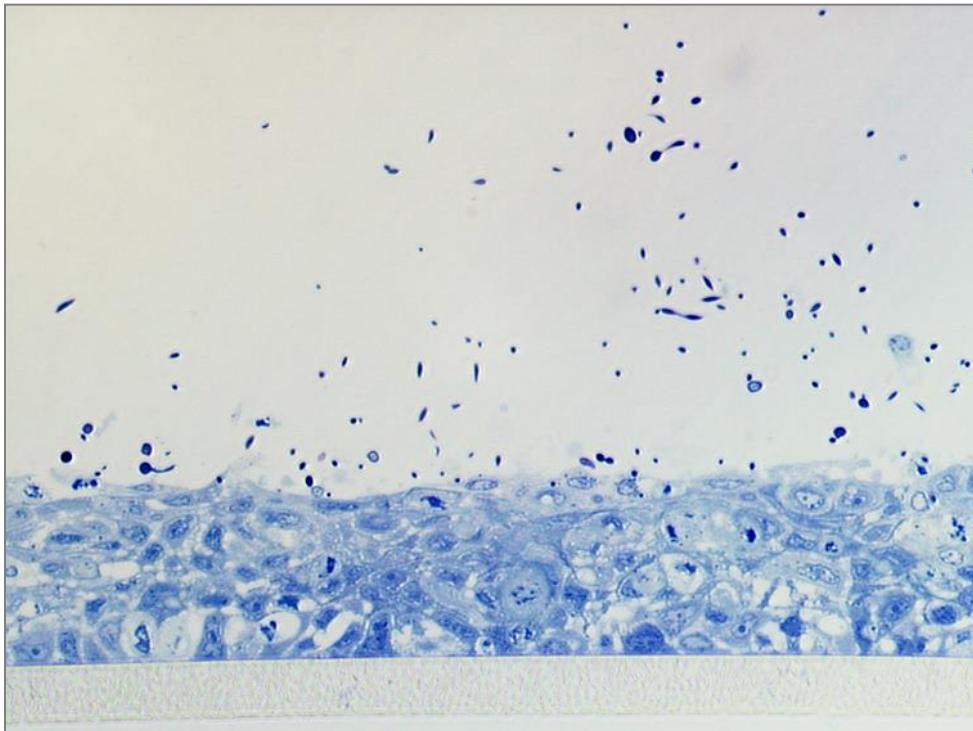


Abbildung 19: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Ödematös geschwollene Keratinozyten, Nekrosen sowie Vakuolen bis in die Basalzellschicht. Ablösung zahlreicher oberflächlicher Keratinozyten. Anlagerung von Pilzzellen an die Schleimhautoberfläche, teilweise Eindringen in das Gewebe. Vergrößerung x 400.

4.1.3.6 Vorinkubation mit Lipoteichonsäure-freien *Lactobacillus rhamnosus GG*

Zur Untersuchung des Einflusses Lipoteichonsäure-freier Lactobacillen auf das Vaginalkandidosemodell, wurde die Lipoteichonsäure als säurelabile Komponente durch Behandlung der Lactobacillen mit Schwefelsäure aus der Zellwand entfernt und das RHVE vor Infektion mit *C. albicans* mit den so modifizierten Lactobacillen vorinkubiert.

Nach Ablauf der insgesamt 24-stündigen Inkubationsdauer stellte sich unter dem Lichtmikroskop eine ausgefranst wirkende Schleimhautoberfläche dar. Keratinozyten hatten sich aus dem Epithelverbund herausgelöst und lagen frei im Bild. An die Schleimhautoberfläche hatten sich Pilzzellen angelagert, einige konnten auch in das Epithel

eindringen. Das gesamte Gewebe wirkte durch die Vakuolen und vergrößerten interzellulären Räume aufgelockert (Spongiosis). Es fanden sich nekrotische und ödematöse Zellen bis in die Basalzellschicht (Abbildung 20). Die Schädigung war stärker ausgeprägt als bei Vorinkubation mit PBS. Die säurebehandelten Lactobacillen bewirkten in diesem Versuchsaufbau somit eine zusätzliche Schädigung des Epithels.

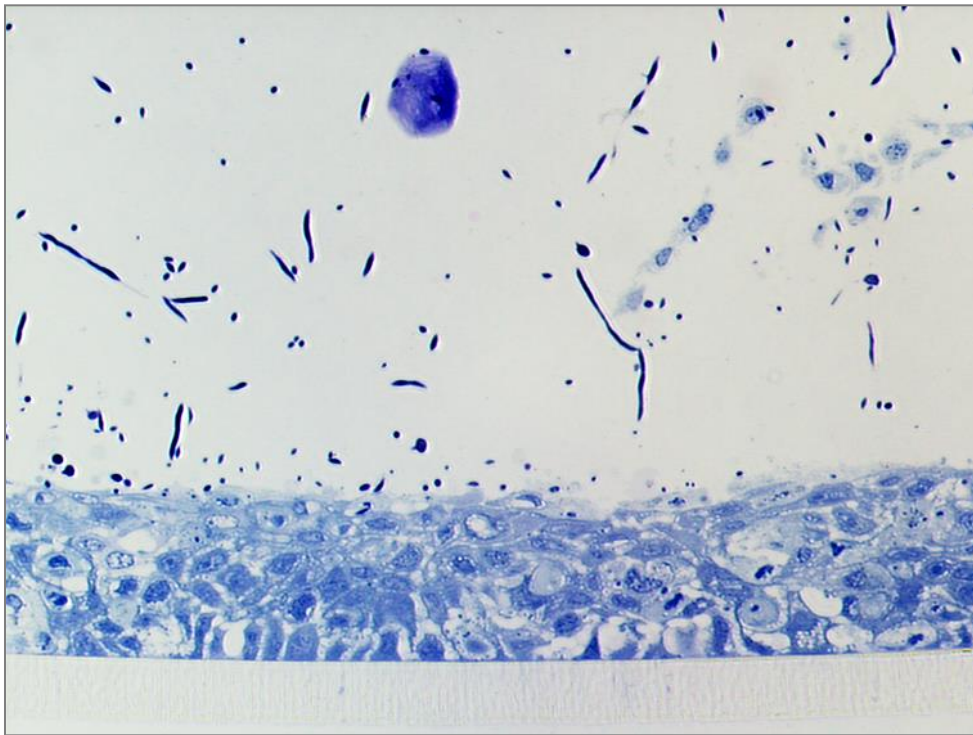


Abbildung 20: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit säurebehandelten (LTA-freien) *LGG* vorinkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten RHVE. Ausgefranst wirkende Schleimhautoberfläche durch Herauslösung von Keratinozyten aus dem Epithelverbund. Spongiosis, Nekrosen und Ödeme in allen Zellschichten. Vergrößerung x 400.

4.1.3.7 Vorinkubation mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Während die Vorbehandlung mit Peptidoglycan eine protektive Wirkung gegenüber einer Vaginalkandidose gezeigt hatte, bewirkte die Vorinkubation der Schleimhaut mit einer Suspension aus Lipoteichonsäure und Peptidoglykan, wie auch die Vorbehandlung mit Lipoteichonsäure alleine, eine massive Epithelschädigung.

Dabei fanden sich ausgedehnte konfluierende Vakuolen bis in tiefe Zellschichten. Die meisten Zellen waren ödematös geschwollen oder nekrotisch mit aufgetriebenen Zellkernen. Dadurch wirkte die Schleimhaut aufgelockert und in der Breite verdickt (Abbildung 21).

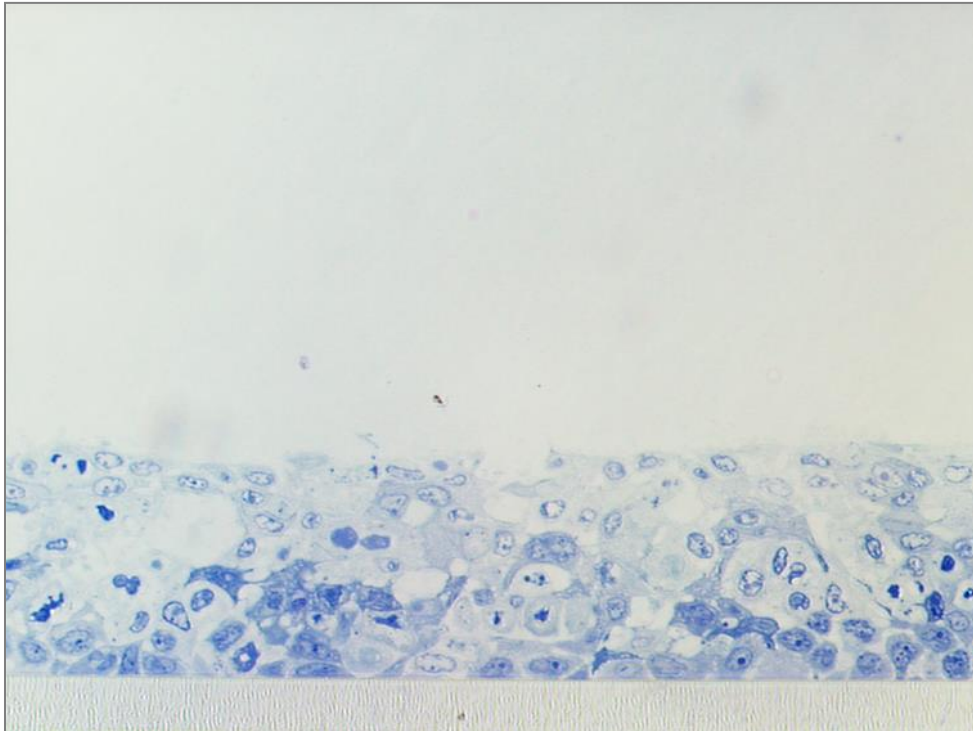


Abbildung 21: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *LGG* vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten und erneut 12 Stunden inkubierten RHVE. Große konfluierende Vakuolen, stark ödematös geschwollene und nekrotische Keratinozyten bis in tiefe Zellschichten, welche das Epithel aufgelockert und verdickt erscheinen lassen. Vergrößerung x 400.

4.1.3.8 Vorinkubation mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*

Da neben Bestandteilen der Zellwand von Lactobacillen auch von diesen gebildete Produkte mit dem Epithel bzw. bei einer Vaginalkandidose mit den *C. albicans*-Zellen in Kontakt kommen, wurden die Effekte einer Vorinkubation des Vaginalkandidosemodells mit dem Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* untersucht. Dieses ist ein von *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 (TMW1.392) aus Sachharose synthetisiertes Produkt, welches von den Bakterien sezerniert wird.

Bei der Betrachtung der histologisch aufgearbeiteten Schleimhautprobe unter dem Lichtmikroskop zeigte sich, dass das Epithel nur geringgradig geschädigt war. Es fanden sich

wenige Nekrosen oder Ödeme der Keratinozyten. Die im Anschluss an die Vorinkubation hinzugegebenen Hefepilzzellen konnten sich nicht an die Schleimhaut anheften, sodass sie bei der Fixierung weggespült wurden (Abbildung 22).

Von allen getesteten Substanzen hat das Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* am besten vor einer Schädigung des Epithels durch den *C. albicans* Wildtyp SC5314 geschützt.

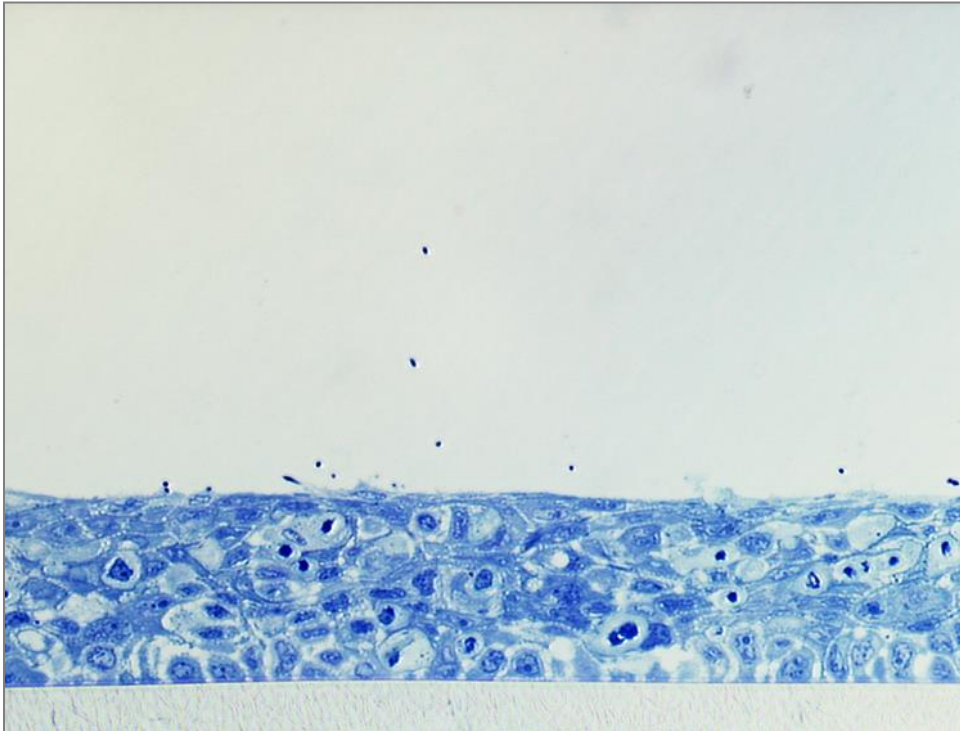


Abbildung 22: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 (TMWI.392) vorinkubierten und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE. Weitgehend intaktes Epithel, keine Adhärenz von Pilzzellen. Vergrößerung x 400.

4.1.4 Morphologie der infizierten, behandelten RHVE

Anhand des Schleimhautmodells wurde auch die Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den Verlauf einer bereits bestehenden *C. albicans*-Infektion untersucht.

Wurde auf eine mit *C. albicans* infizierte Schleimhaut nach 12 Stunden PBS als neutrale Kontrollsubstanz hinzugegeben und das Epithel für weitere 12 Stunden inkubiert, so waren nach Ablauf von 24 Stunden die Pilzzellen bis in tiefe Zellschichten vorgedrungen und das Gewebe bis in untere Zellschichten schwer geschädigt (vgl. 4.1.2, Abbildung 14). Um zu überprüfen, ob sich dieser Verlauf durch die Zugabe verschiedener *Lactobacillus*-Substanzen beeinflussen lässt, wurde in den einzelnen Ansätzen das RHVE jeweils mit *C. albicans* infiziert und 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde jeweils eine der zu testenden Substanzen aufgetragen und die Schleimhaut für weitere 12 Stunden inkubiert.

4.1.4.1 Behandlung mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Behandlung eines *C. albicans*-infizierten Epithels mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG* bewirkte eine stärkere Gewebeschädigung als die Zugabe der neutralen Kontrollsubstanz PBS.

Nach histologischer Aufbereitung der Schleimhautprobe zeigte sich unter dem Lichtmikroskop eine bis in die tiefen Zellschichten reichende Zerstörung des Epithels mit ödematösen und nekrotischen Keratinozyten sowie zahlreichen konfluierenden Vakuolen. Das Epithel wirkte dadurch aufgelockert und war verdickt. Die Gewebestruktur war teilweise aufgehoben, sodass im apikalen Gewebebereich nur noch eine amorphe Masse zu sehen war. Zahlreiche Pilzzellen lagerten sich an die Schleimhaut an und drangen bis in die basale Zellschicht vor (Abbildung 23).

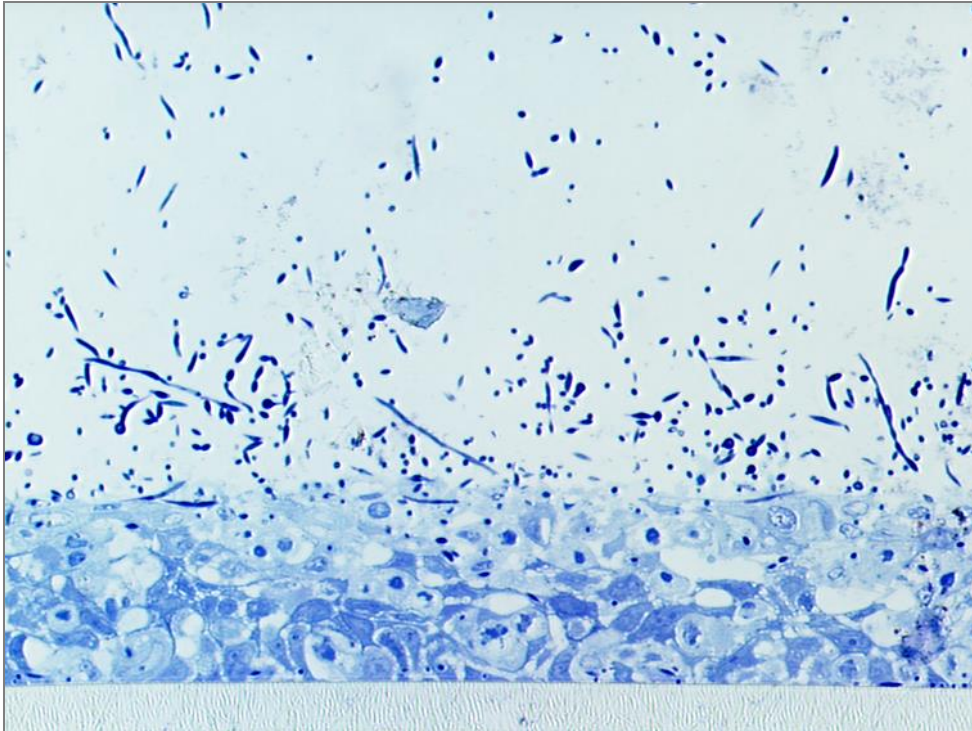


Abbildung 23: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit hitzeinaktivierten Lactobacillen behandelten RHVE. Starke Epithelschädigung, die Schleimhaut wirkt aufgelockert und ist verdickt. Einige *C. albicans*-Zellen sind bis zur Polycarbonatträgerschicht eingedrungen. Vergrößerung x 400.

4.1.4.2 Behandlung mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Behandlung des *C. albicans*-infizierten Epithels mit Zellwandfragmenten von *LGG* hatte kaum Einfluss auf die von dem Hefepilz hervorgerufene Epithelschädigung. Das histologische Bild entsprach in etwa dem der Epithelprobe nach 24-stündiger Einwirkung von *C. albicans* unter Zugabe der neutralen Kontrollsubstanz PBS.

Unter dem Lichtmikroskop wies das Schleimhautepithel zahlreiche Vakuolen, welche bis in die unteren Keratinozytenschichten reichten, auf. Das Epithel war in den oberen bis mittleren Zellschichten zerstört. In den unteren Zellschichten waren Keratinozyten erkennbar, welche zum Teil nekrotisch oder ödematös geschwollen waren. Lediglich die Basalzellschicht war weitgehend intakt. Zahlreiche Hefepilzzellen konnten sich an das Epithel anheften und bis in mittlere Zellschichten eindringen (Abbildung 24).

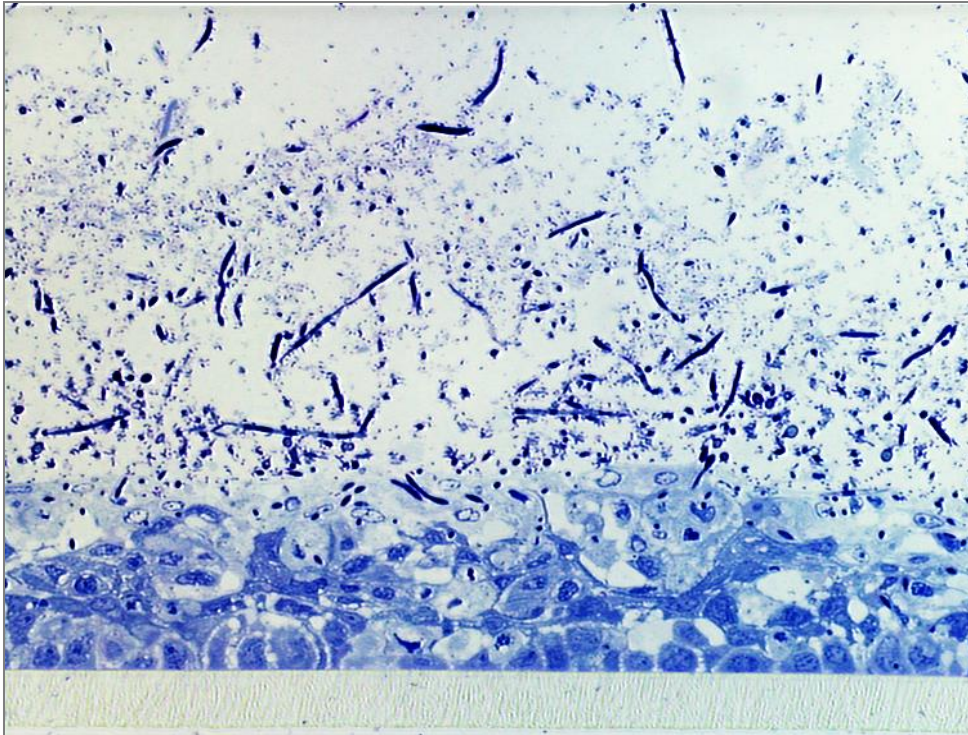


Abbildung 24: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Zellwandfragmenten von *LGG* behandelten RHVE. Nekrosen und Vakuolen bis in die mittleren, zum Teil auch unteren Zellschichten. Die Basalzellschicht ist weitgehend intakt. Vergrößerung x 400.

4.1.4.3 Behandlung mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Bei der mikroskopischen Betrachtung des *C. albicans*-infizierten, mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG* behandelten RHVE zeigte sich eine ausgedehnte Epitheldestruktion mit Vakuolenbildung. Einige Keratinozyten lagen frei im Bild. Die oberen und mittleren Zellschichten waren weitgehend zerstört, in den unteren Zelllagen waren einige Epithelzellen erhalten. Zahlreiche Hefepilzzellen hatten sich an die Schleimhaut angeheftet und waren bis in die mittleren Epithelschichten eingedrungen (Abbildung 25). Im Vergleich zu der Schleimhaut, welcher PBS zugegeben wurde, fiel bei der mit Peptidoglycan behandelten Epithelprobe der histologische Schaden etwas stärker aus.



Abbildung 25: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Peptidoglycan von *LGG* behandelten RHVE. Anheften und Eindringen von *C. albicans* in das RHVE mit Zerstörung des Epithelgewebes bis in die mittleren und teilweise unteren Zellschichten mit konfluierenden Vakuolen, ödematösen und nekrotischen Zellen. Vergrößerung x 400.

4.1.4.4 Behandlung mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Bei Behandlung des infizierten RHVE mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* war eine deutlich stärker ausgeprägte Gewebeschädigung als bei der mit PBS als neutraler Kontrollsubstanz behandelten, mit *C. albicans* infizierten Probe zu beobachten. Das Epithel war in allen Zellschichten weitgehend zerstört, der Zellverbund war aufgehoben. Große Epitheldefekte fanden sich bis in die basale Zellschicht. Zwischen nekrotischem, strukturlosem Gewebe und großen Vakuolen waren nur noch einzelne Inseln mit ödematösen und nekrotischen Keratinozyten zu sehen. Zahlreiche Hefepilzzellen hatten sich an das Epithel angeheftet und konnten bis zur Polycarbonatträgerschicht vordringen. (Abbildung 26).

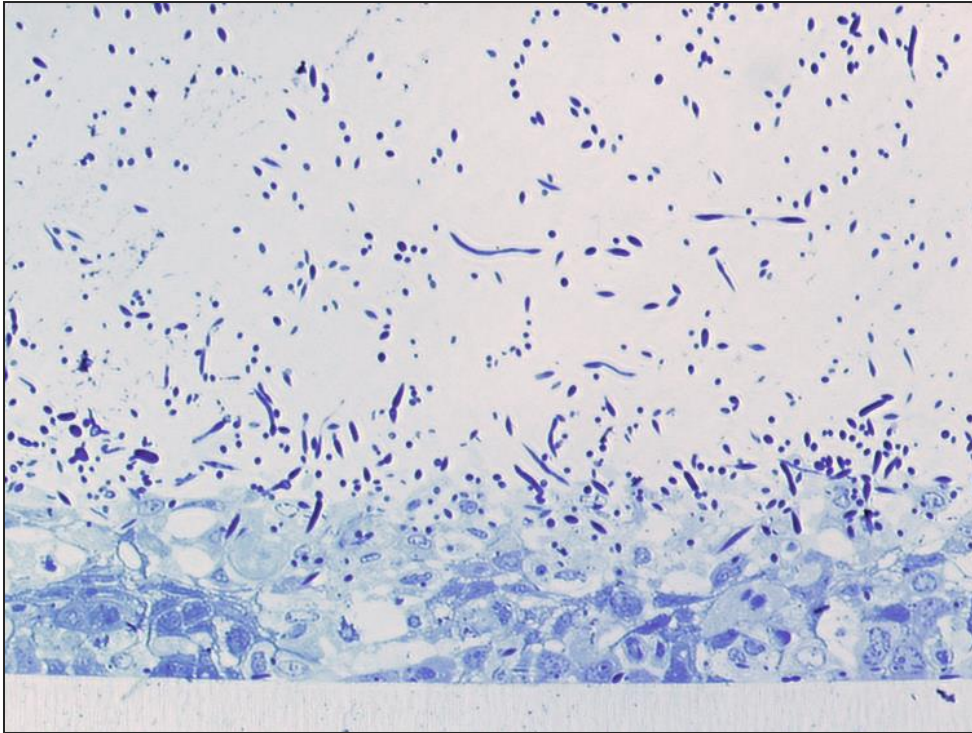


Abbildung 26: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von LGG behandelten RHVE. Große Epitheldefekte bis in die Basalzellschicht. Die Gewebestruktur ist aufgelöst, es sind nur noch einzelne abgrenzbare Keratinozyten zu erkennen. *C. albicans*-Zellen konnten das gesamte Epithel durchdringen. Vergrößerung x 400.

4.1.4.5 Behandlung mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*

Nachdem die Behandlung des *C. albicans*-infizierten Epithels mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* zu einer ausgeprägten Epithelschädigung geführt hatte, wurde zum Vergleich die Auswirkung einer Behandlung mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* auf das Vaginalkandidosemodell untersucht. Nach 12-stündiger Inkubation mit *C. albicans* wurde das Epithel 12 weitere Stunden mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* inkubiert.

Im histologischen Bild zeigten sich auch hier großflächige Vakuolen, die bis in die basale Zellschicht reichten. Der Gewebeverbund war zum größten Teil aufgelöst, die ursprüngliche Struktur war nur noch an wenigen Stellen im unteren Schleimhautbereich vorhanden. Auch in diesem waren die Zellen ödematös geschwollen, mit aufgetriebenen Zellkernen und zum Teil bereits nekrotisch. Zahlreiche Pilzzellen konnten sich an die Schleimhautoberfläche anlagern und bis in mittlere Epithelschichten eindringen (Abbildung 27). Die Schädigung ist ähnlich

stark ausgeprägt wie bei dem mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus GG* behandelten Epithel.

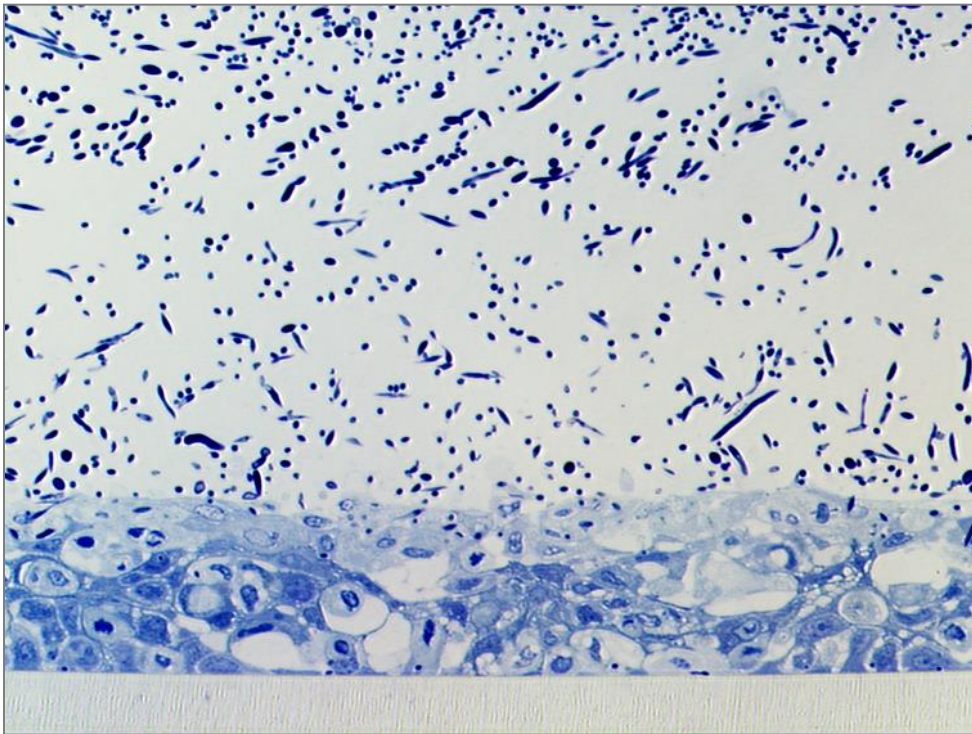


Abbildung 27: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* behandelten RHVE. Großflächig zerstörtes Gewebe mit konfluierenden Vakuolen bis in die Basalzellschicht. Vergrößerung x 400.

4.1.4.6 Behandlung mit Lipoteichonsäure-freien *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Behandlung der experimentellen Vaginalkandidose mit säurebehandelten und somit Lipoteichonsäure-freien *Lactobacillus rhamnosus GG* bewirkte eine deutlich stärker ausgeprägte Schädigung als die Zugabe der neutralen Kontrollsubstanz PBS.

Unter dem Lichtmikroskop stellte sich eine nahezu völlig zerstörte Schleimhaut dar. Es fanden sich nur noch einzelne abgrenzbare Zellen, der Epithelverbund war aufgelöst. Dabei waren massenweise Pilzzellen zu sehen, welche tief in das Gewebe eingedrungen sind. Neben großen Vakuolen war hauptsächlich nekrotisches Zellmaterial zu erkennen (Abbildung 28).

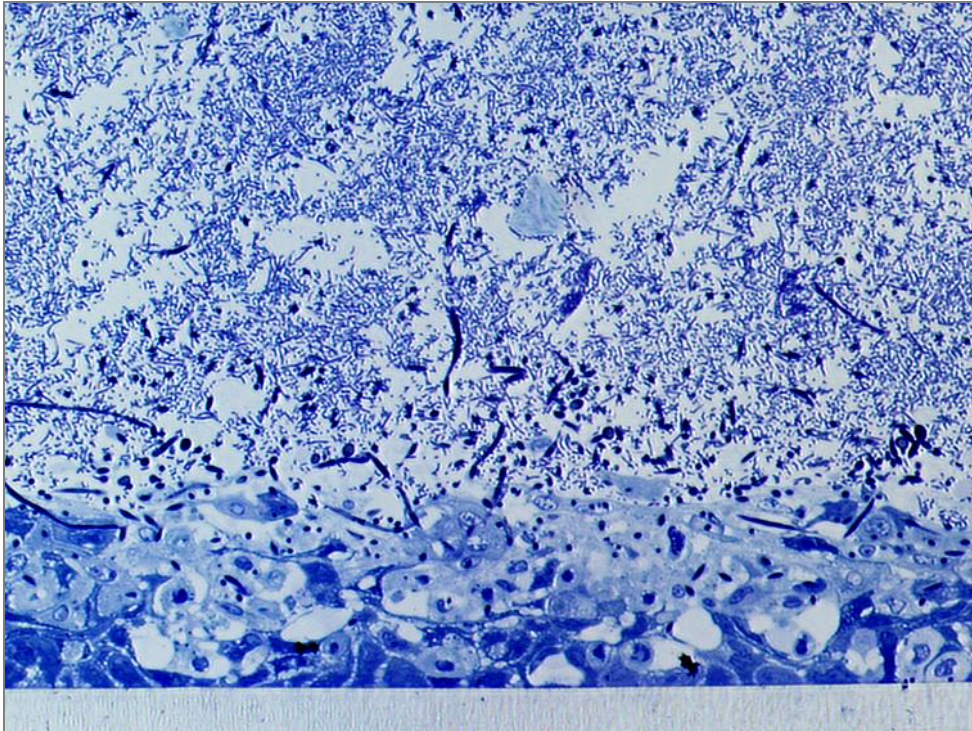


Abbildung 28: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit säurebehandelten (Lipoteichonsäure-freien) *LGG* inkubierten RHVE. Weitgehende Gewebeerstörung mit großen Vakuolen und nekrotischem Zellmaterial bis zu der basalen Zellschicht sowie massenweise Hefepilzzellen, die tief in die Schleimhaut eingedrungen sind. Vergrößerung x 400.

4.1.4.7 Behandlung mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Es wurden die Effekte einer Behandlung der mit *C. albicans* infizierten Schleimhaut mit SDS-extrahierten Zellwandfragmenten, d.h. Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* in Bezug auf histologisch darstellbare Gewebsveränderungen untersucht.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Schleimhautprobe war eine massive Schädigung des Epithels zu erkennen. Das RHVE war bis zur Polycarbonatträgerschicht von ausgedehnten Vakuolen durchsetzt. Neben großenteils nekrotischem Gewebe waren ödematös geschwollene Zellen mit aufgetriebenen Zellkernen sichtbar. Insgesamt wirkte die Schleimhaut dadurch verdickt. Lediglich in der Basalzellschicht waren einige gut abgrenzbare Keratinozyten zu erkennen. Zahlreiche Hefepilzzellen konnten sich an die Schleimhaut angelagern, nur wenige schienen jedoch tiefer in das Gewebe eingedrungen zu sein (Abbildung 29). Die Schädigung der Schleimhaut war in diesem Ansatz deutlich stärker

ausgeprägt als bei der mit *C. albicans* infizierten Probe, bei welcher nach 12 Stunden PBS hinzugegeben wurde.

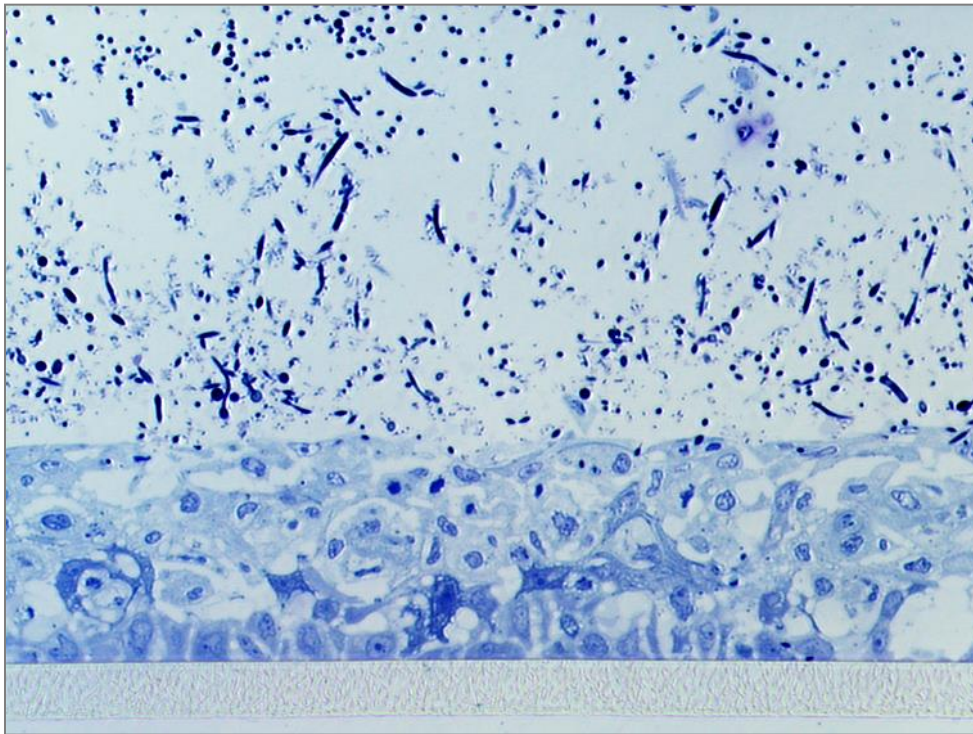


Abbildung 29: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *LGG* behandelten RHVE. Die Struktur des Gewebes ist großflächig zerstört, das Epithel wirkt durch die ödematöse Auflockerung und Spongiosis verdickt. Vergrößerung x 400.

4.1.4.8 Behandlung mit Exopolysaccharid von *L. sanfranciscensis*

Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*, welche eine protektive Wirkung gegenüber der Vaginalkandidose gezeigt hatte, konnte die Behandlung einer bereits bestehenden *Candida*-Infektion mit Exopolysaccharid den Infektionsverlauf nicht positiv beeinflussen.

Nach histologischer Aufbereitung zeigte sich, dass das Epithel in den oberen und mittleren Lagen weitgehend zerstört war. Hier fanden sich große Vakuolen und nekrotisches Zellmaterial. In den unteren Zellschichten war die Gewebestruktur weitgehend erhalten, wobei auch bei diesen Keratinozyten teilweise Zeichen der Zellschädigung zu erkennen waren. Die Hefepilzzellen konnten sich zahlreich an die Schleimhautoberfläche anheften und bis in obere, wenige auch bis in mittlere Zellschichten eindringen (Abbildung 30). Das Ausmaß

der Gewebsschädigung war bei dem mit Exopolysaccharid behandelten RHVE vergleichbar mit den Proben, zu welchen PBS gegeben wurde. Exopolysaccharid konnte somit die von *C. albicans* hervorgerufene Gewebsdestruktion nicht aufhalten, hat jedoch auch keine zusätzliche Epithelschädigung verursacht.

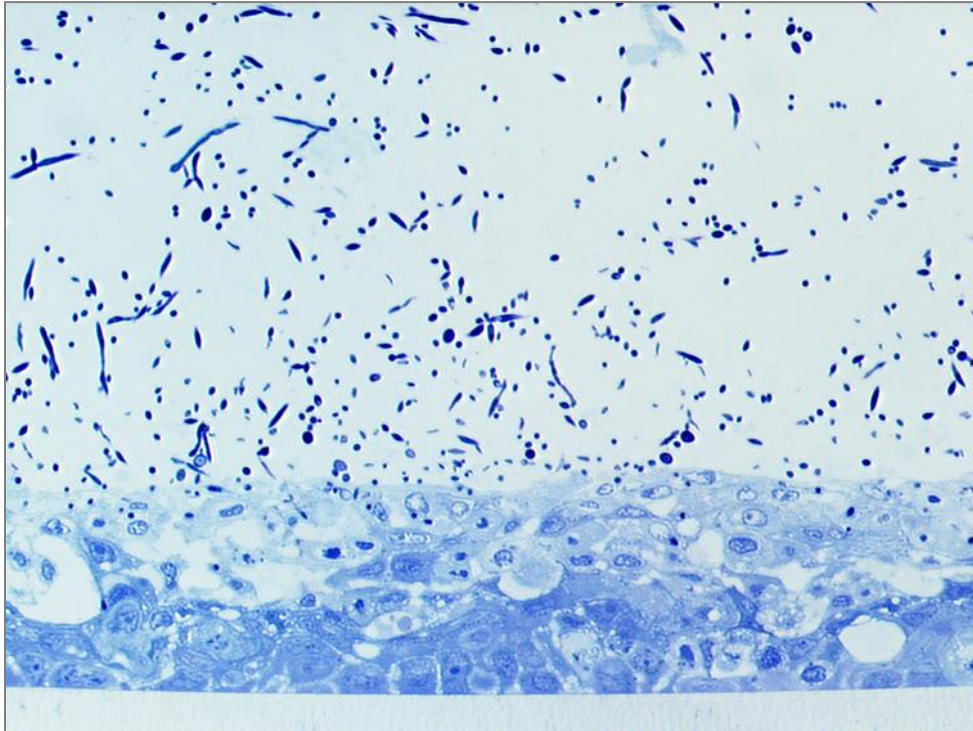


Abbildung 30: Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infizierten und anschließend für 12 Stunden mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* behandelten RHVE. Große konfluierende Vakuolen, z. T. amorphe Masse in oberen und mittleren Zellschichten. Weitgehend erhaltene Gewebestruktur im unteren Bereich. Vergrößerung x 400.

4.2 Quantitative RT-PCR Analyse

Zur Charakterisierung der Immunreaktion in den einzelnen Gewebeproben wurde die Expression der Th1-assoziierten und proinflammatorisch wirkenden Zytokine und Chemokine GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 bestimmt. Hierzu wurde RNA aus den Schleimhautproben isoliert und die relative mRNA-Menge mit Hilfe der Echtzeit Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (*real-time RT-PCR*) quantifiziert. Die Genexpression des jeweiligen Zielgens wurde auf das ubiquitär und homogen exprimierte, nicht regulierte *Housekeeping*-Gen GAPDH bezogen. Außerdem wurden die unterschiedlichen Effizienzen der Amplifikationen mit berücksichtigt.

Die Zytokin-mRNA-Expression wurde ins Verhältnis zu den mRNA-Leveln von nicht infizierten Schleimhautproben, die 24 Stunden nur mit PBS inkubiert wurden, gesetzt (Leerwert-Kontrollen).

Alle Versuche wurden insgesamt drei Mal durchgeführt. Die Ergebnisse sind graphisch in Form von *Whisker-box-plots* mit Darstellung des Medians, der Quartilen sowie der Maximal- und Minimalwerte wiedergegeben. Aufgrund der Bildung von störenden Nebenprodukten in der PCR konnte in einer der 24 Stunden mit PBS inkubierten Proben die TNF- α -Expression, in einer der mit hitzeinaktivierten LGG vorinkubierten RHVE die GM-CSF- und IL-1 β -Expression sowie in einer der mit Zellwandfragmenten behandelten Proben die TNF- α und IL-1 α - Expression nicht bestimmt und somit nicht berücksichtigt werden.

4.2.1 Zytokin-mRNA-Expression des Vaginalkandidosemodells

Um die immunmodulatorische Reaktion der Keratinozyten auf die Infektion mit *C. albicans* zu charakterisieren, wurde nach 12- und nach 24-stündiger Inkubation des Epithels mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 die relative mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β bzw. IL-8, bezogen auf die Leerwert-Kontrolle (24 Stunden PBS), bestimmt.

Parallel zu der Infektion der Schleimhaut, welche insgesamt 24 Stunden mit *C. albicans* inkubiert wurde, wurde das RHVE, auf welches der Hefepilz nur 12 Stunden einwirken sollte, zunächst 12 Stunden mit PBS inkubiert und erst im Anschluss daran mit *C. albicans* infiziert und für weitere 12 Stunden inkubiert.

Mittels *real-time* PCR konnte eine Erhöhung der mRNA-Level aller untersuchten Zytokine im Vergleich zu der nicht infizierten, 24 Stunden mit PBS inkubierten Schleimhaut gemessen werden. Je länger die Infektion bestand, desto mehr mRNA der jeweiligen Gene wurde gebildet. Am stärksten zugenommen hat die mRNA-Bildung von IL-8 und insbesondere GM-CSF (Abbildung 31).

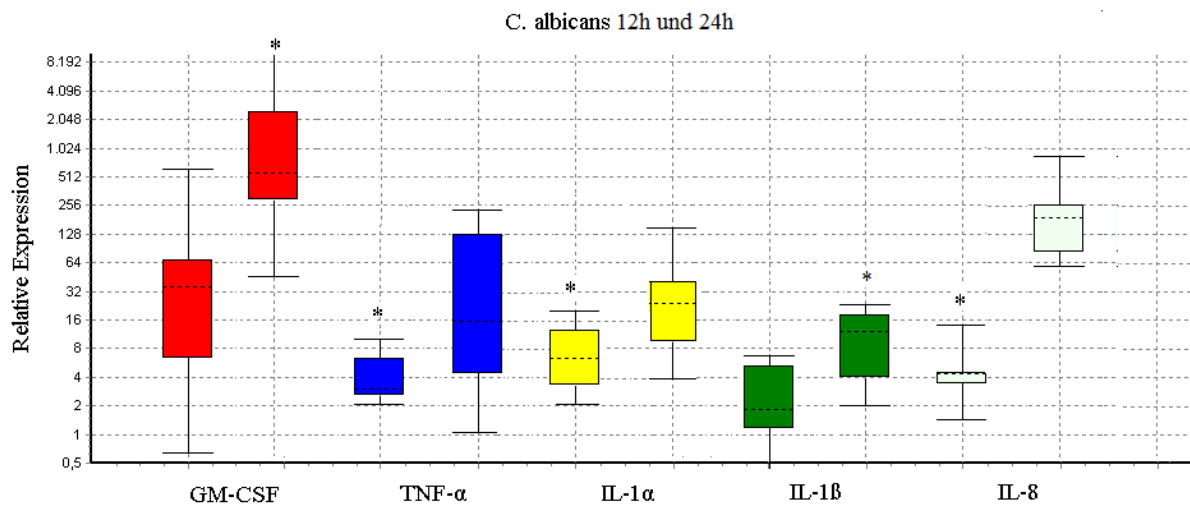


Abbildung 31: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 nach 12-stündiger (jeweils linker Balken einer Farbe) bzw 24-stündiger Inkubation (jeweils rechtsseitiger Balken) mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314. Die mRNA-Expression aller Zytokine steigt abhängig von der Infektionsdauer an. Dieser Anstieg ist besonders ausgeprägt bei GM-CSF und IL-8.

4.2.2. Zytokin-mRNA-Expression der vorinkubierten Vaginalkandidosemodelle

Um den Einfluss einer Vorbehandlung der Epithelien mit den verschiedenen Testsubstanzen auf die durch *C. albicans* hervorgerufene Immunantwort zu beurteilen, wurden die relativen Zytokin-mRNA-Werte der einzelnen Ansätze jeweils mit der Zytokin-mRNA-Expression der infizierten, mit PBS (als Kontrollsubstanz) vorinkubierten Schleimhautprobe verglichen.

Nach 12-stündiger Vorinkubation mit den verschiedenen Substanzen bzw. PBS wurde für weitere 12 Stunden *C. albicans* hinzugegeben. Nach Ablauf der insgesamt 24 Stunden wurde eine RT-PCR mit *Primern* für die verschiedenen Zytokine bzw. für das *house-keeping*-Gen GAPDH durchgeführt und die relative mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-8 und GM-CSF bestimmt.

4.2.2.1 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG*

Bei Vorbehandlung des RHVE mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG* zeigte sich eine Zunahme der mRNA-Expression von GM-CSF und TNF- α im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten und ebenfalls anschließend mit *C. albicans*-infizierten Schleimhaut. Daneben kam es, in geringerem Ausmaß, zu einer Erhöhung von IL-1 β -mRNA, während die Bildung von IL-1 α - und IL-8-mRNA durch die Zugabe der hitzeinaktivierten Lactobacillen nicht wesentlich verändert wurde (Abbildung 32).

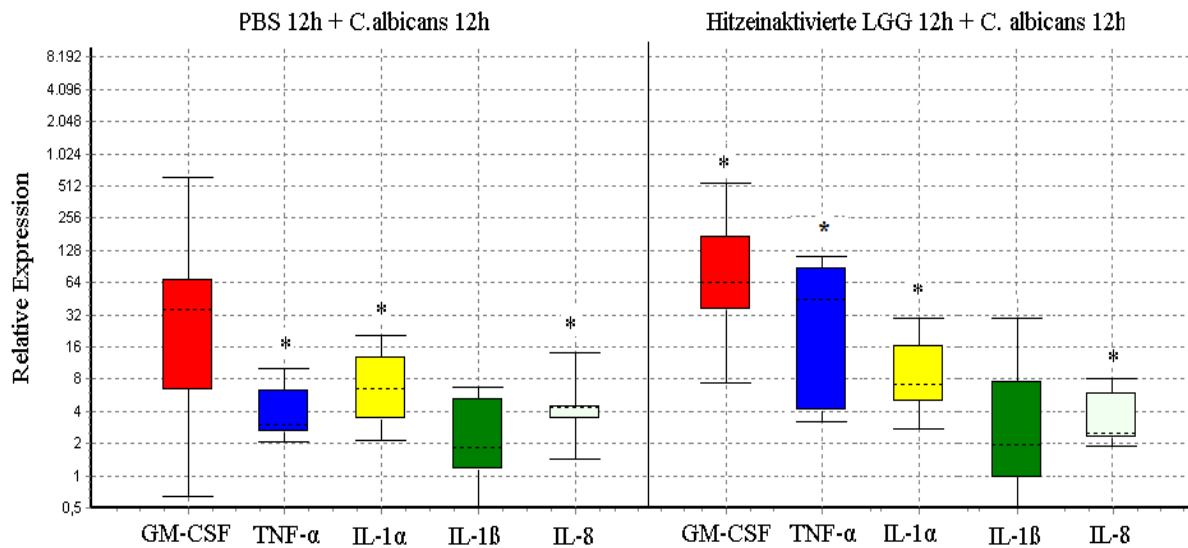


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit hitzeinaktivierten *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls mit *C. albicans* infizierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.2 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Zur Untersuchung der Änderung der von *C. albicans* verursachten Immunantwort nach Vorbehandlung mit *Lactobacillus*-Zellwandfragmenten wurde das RHVE mit einer solchen Suspension 12 Stunden vorinkubiert und anschließend mit *C. albicans* infiziert. Daraufhin wurde eine RT-PCR durchgeführt.

Verglichen mit der mit PBS als Kontrollsubstanz vorinkubierten Schleimhautprobe kam es zu einer Erhöhung der mRNA-Expression aller untersuchten proinflammatorischen Zytokine. Diese war am stärksten bei GM-CSF ausgeprägt, die Bildung von IL-8-, TNF- α -, IL-1 α - und IL-1 β -mRNA war ebenfalls deutlich erhöht (Abbildung 33).

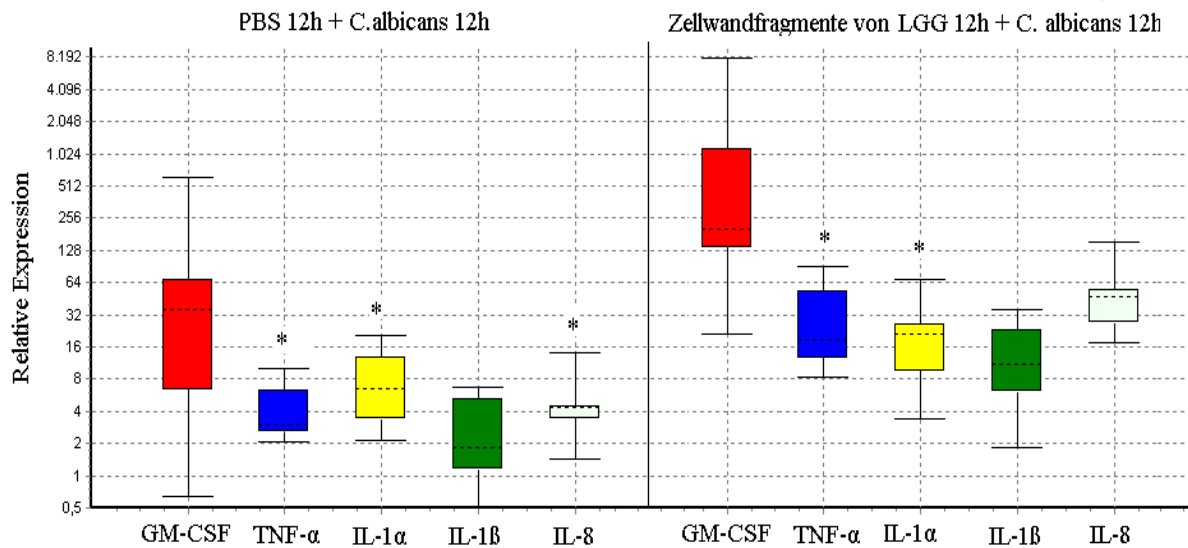


Abbildung 33: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.3 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Die Vorinkubation mit Peptidoglycan, der Hauptstrukturkomponente der Zellwand von *Lactobacillus rhamnosus GG*, führte bei der im Anschluss daran mit *C. albicans* infizierten Schleimhaut zu einer vermehrten Bildung der mRNA aller untersuchten Zytokine (Abbildung 34). Das Ausmaß der Erhöhung war zum Teil weniger stark ausgeprägt als bei Vorinkubation mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG*. Am deutlichsten war der Anstieg bei IL-8 und auch bei GM-CSF, welche als chemotaktische Mediatoren für das Recruitment neutrophiler Granulozyten besonders wichtig sind.

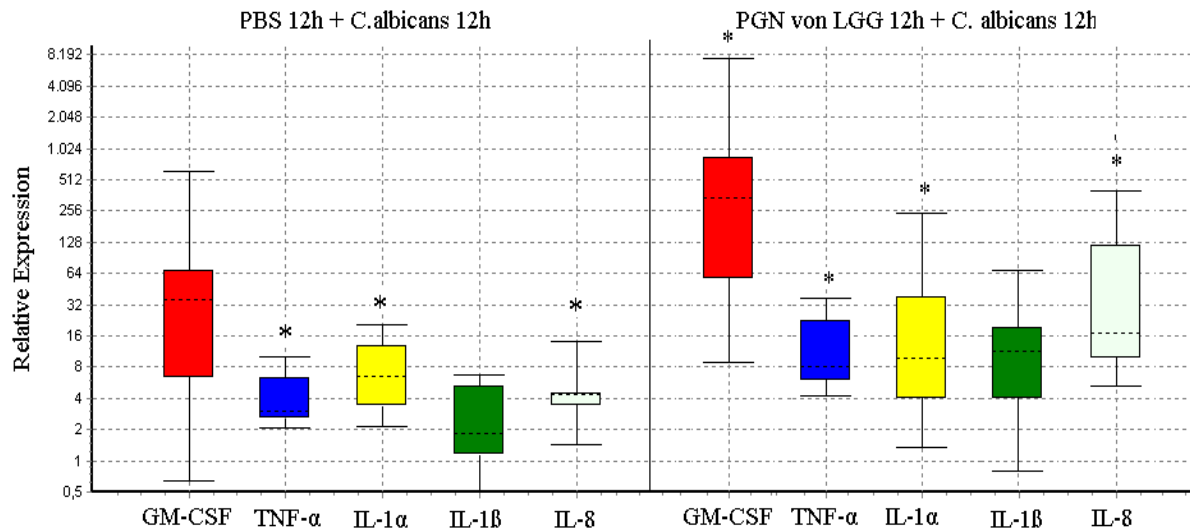


Abbildung 34: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.4 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Lipoteichonsäure

Bei Vorbehandlung des RHVE mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* zeigte sich im Vergleich zur Vorinkubation mit PBS als Kontrollsubstanz eine Zunahme der IL-8-mRNA-Expression. Die anderen untersuchten Zytokine wiesen nur geringe Veränderungen auf, mit minimaler Abnahme der IL-1 α - und Zunahme der IL-1 β -Expression sowie weitgehend unveränderten Werten für TNF- α (Abbildung 35).

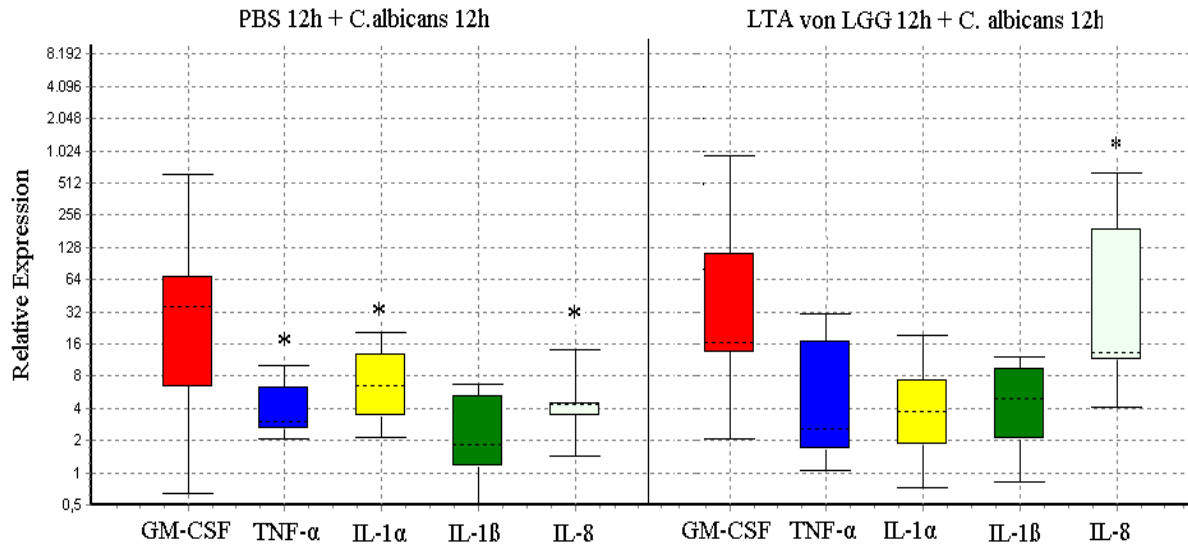


Abbildung 35: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

Zum Vergleich der Immunreaktion auf Lipoteichonsäure verschiedener Herkunft wurden Epithelproben mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* vorinkubiert, bevor sie analog zu den vorherigen Versuchsabläufen mit *C. albicans* infiziert und inkubiert wurden. Auch hier zeigte sich bei Betrachtung der Zytokin-mRNA-Expression eine deutliche Zunahme von IL-8, darüberhinaus aber auch ein moderater Anstieg der anderen untersuchten Zytokine (Abbildung 36).

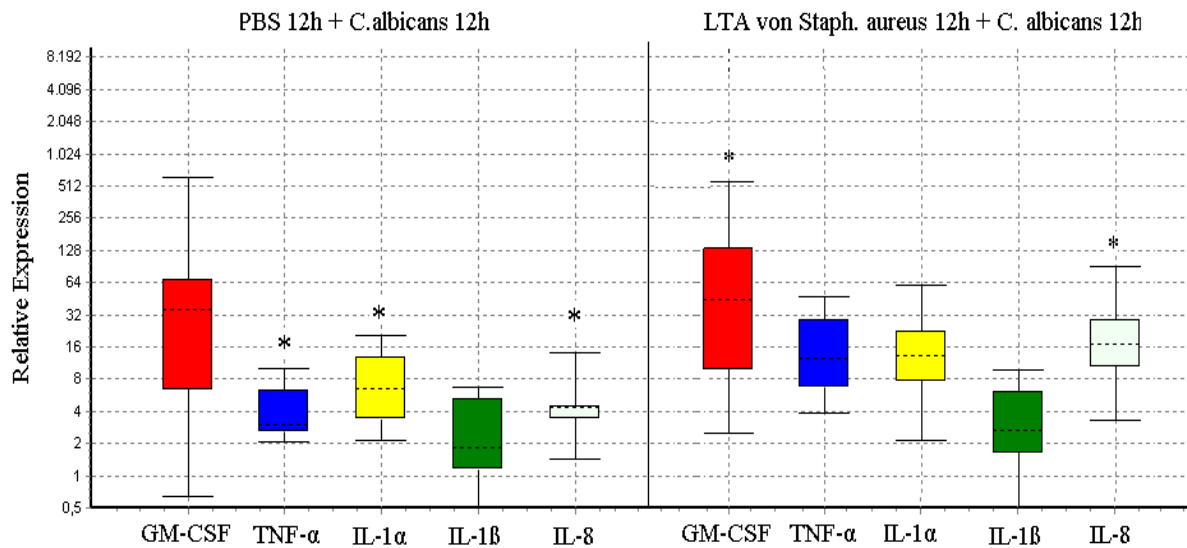


Abbildung 36: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.5 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Lipoteichonsäure-freien *Lactobacillus rhamnosus GG*

Der Einfluss einer Vorinkubation mit säurebehandelten *Lactobacillus rhamnosus GG* auf die Zytokin-mRNA-Expression der im Anschluss daran mit *C. albicans* infizierten Schleimhautprobe auf die Immunreaktion wurde untersucht. Die Behandlung mit Säure diente der Entfernung von säurelabilen Komponenten, insbesondere Lipoteichonsäure, aus der Zellwand der Lactobacillen.

Die Vorinkubation mit dieser Suspension bewirkte einen massiven Anstieg der Bildung von GM-CSF- und IL-8-mRNA, sowie einen starken Anstieg von TNF- α -, IL-1 α - und IL-1 β -mRNA (Abbildung 37).

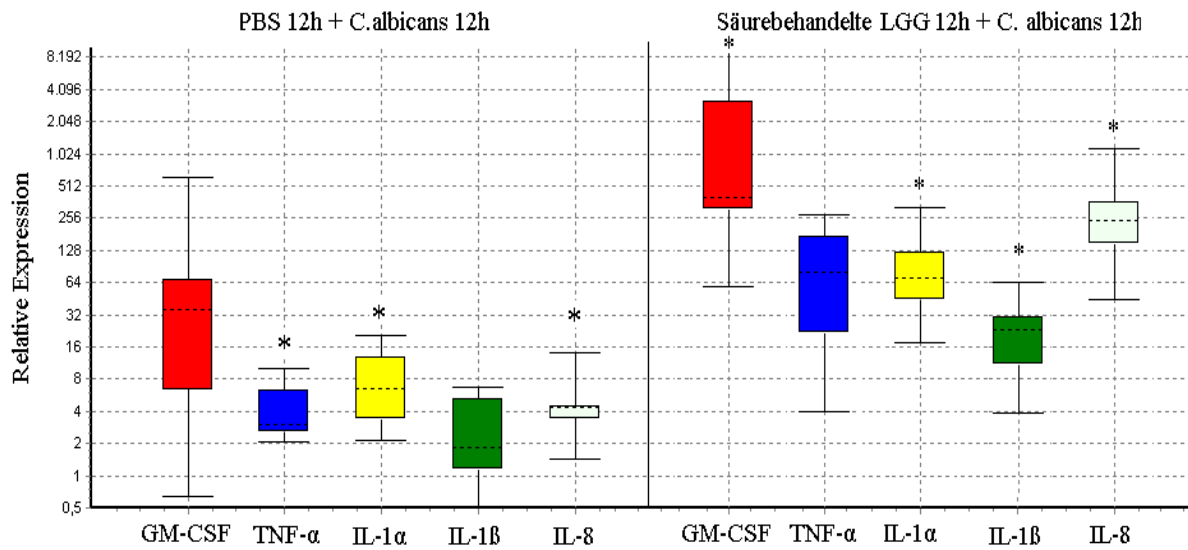


Abbildung 37: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit LTA-freien *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.6 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG*

Eine Vorinkubation der *C. albicans* infizierten Schleimhaut mit einer Suspension aus den beiden Zellwandkomponenten Peptidoglycan und Lipoteichonsäure bewirkte eine massiv erhöhte Bildung von GM-CSF- und IL-8-mRNA (Abbildung 38). Der Anstieg der GM-CSF-mRNA war bei dieser Epithelprobe im Vergleich zu den mit anderen verschiedenen Substanzen vorinkubierten Proben am größten. Die Bildung sowohl von IL-1 α - als auch von IL-1 β -mRNA wurde durch die Vorinkubation mit Lipoteichonsäure und Peptidoglycan von *LGG* deutlich erhöht, in geringerem Ausmaß auch die von TNF- α (Abbildung 38).

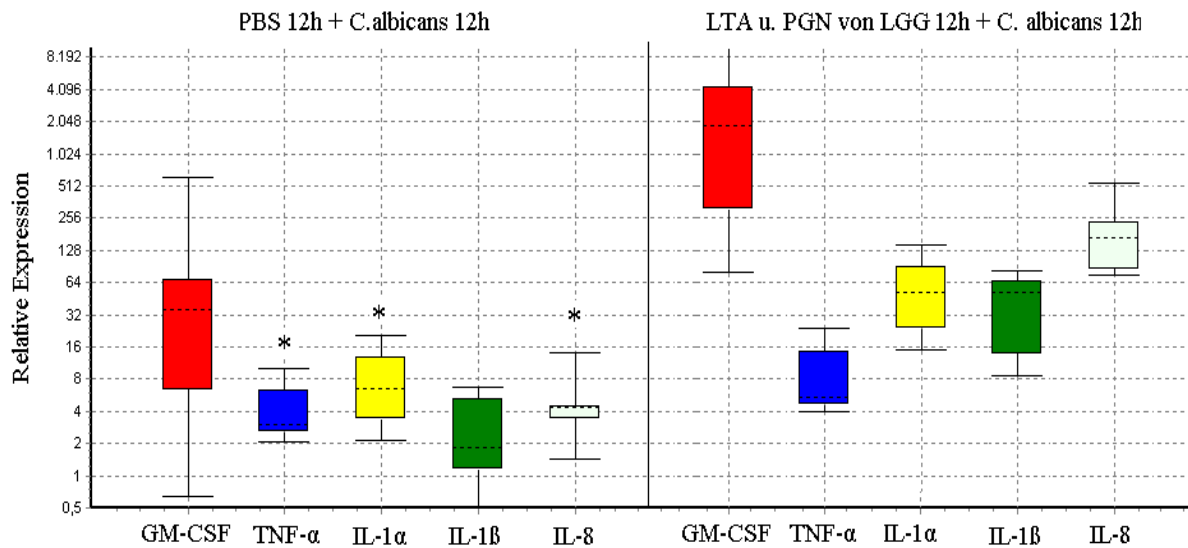


Abbildung 38: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit Lipoteichonsäure und Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus GG* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.2.7 Zytokin-mRNA-Expression bei Vorinkubation mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*

Bei dem mit Exopolysaccharid vorinkubierten RHVE konnte ein deutlicher Anstieg vor allem der TNF- α -Expression im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten Epithelprobe beobachtet werden. Die Expression von GM-CSF-, IL-8-, IL-1 α - und IL-1 β - mRNA stieg dagegen verhältnismäßig gering an (Abbildung 39).

Im Vergleich zu den anderen zur Vorinkubation verwendeten Substanzen hat die Vorinkubation mit Exopolysaccharid zum stärksten Anstieg der TNF- α -mRNA geführt und nur zu einem moderaten Anstieg der Zytokine IL-8 und GM-CSF, welche in den anderen Proben jeweils am stärksten angestiegen waren.

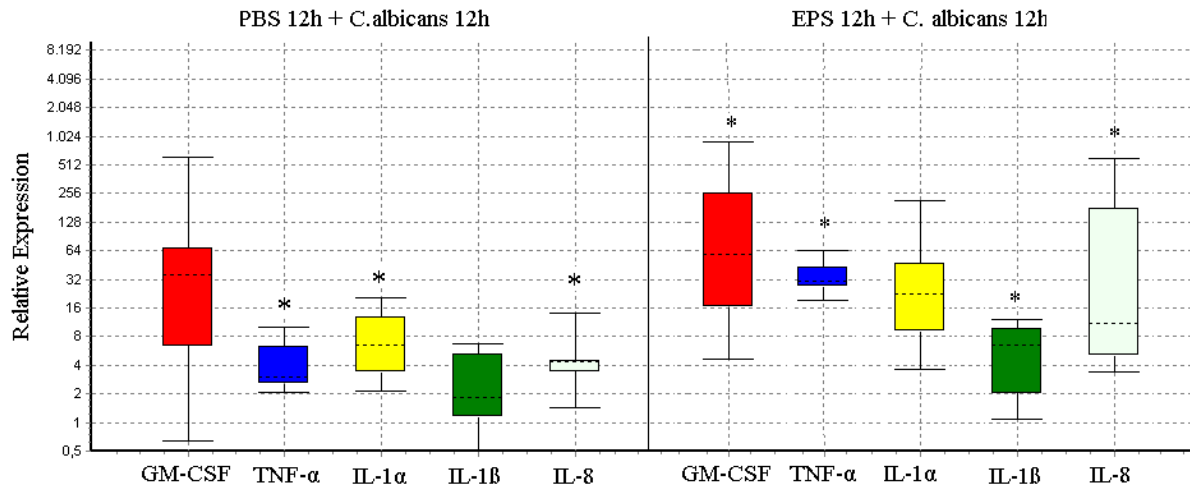


Abbildung 39: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit dem Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* vorinkubierten und für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der mit PBS (als Neutralsubstanz) vorinkubierten und anschließend ebenfalls für weitere 12 Stunden mit *C. albicans* inkubierten Schleimhautprobe (links).

4.2.3 Zytokin-mRNA Expression der behandelten Vaginalkandidosemodelle

Zur Beurteilung, wie sich die Behandlung einer bereits bestehenden Vaginalkandidose durch verschiedene *Lactobacillus*-Substanzen auf die Immunreaktion auswirkt, wurden 12 Stunden nach Infektion mit *C. albicans* für weitere 12 Stunden die jeweiligen Substanzen hinzugegeben und anschließend mittels *real-time* PCR die entsprechenden Veränderungen der Zytokin-mRNA-Expression bestimmt. Der Hefepilz konnte somit in diesen Ansätzen 24 Stunden auf das Epithel einwirken.

Im Gegensatz zur Vorinkubation mit den verschiedenen Substanzen, welche im wesentlichen zu einer Erhöhung der jeweiligen Zytokinexpression führte, zeigten sich bei Nachbehandlung der infizierten Epithelien mit den unterschiedlichen Substanzen jeweils eine Abnahme der Zytokinexpression oder unveränderte Werte.

Bei Behandlung der mit *Candida* infizierten Schleimhaut durch Exopolysaccharid ließ sich – im Vergleich zum infizierten, unbehandelten RHVE- eine deutliche Abnahme der mRNA sämtlicher untersuchten proinflammatorischen Zytokine (GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8) beobachten (Abbildung 40).

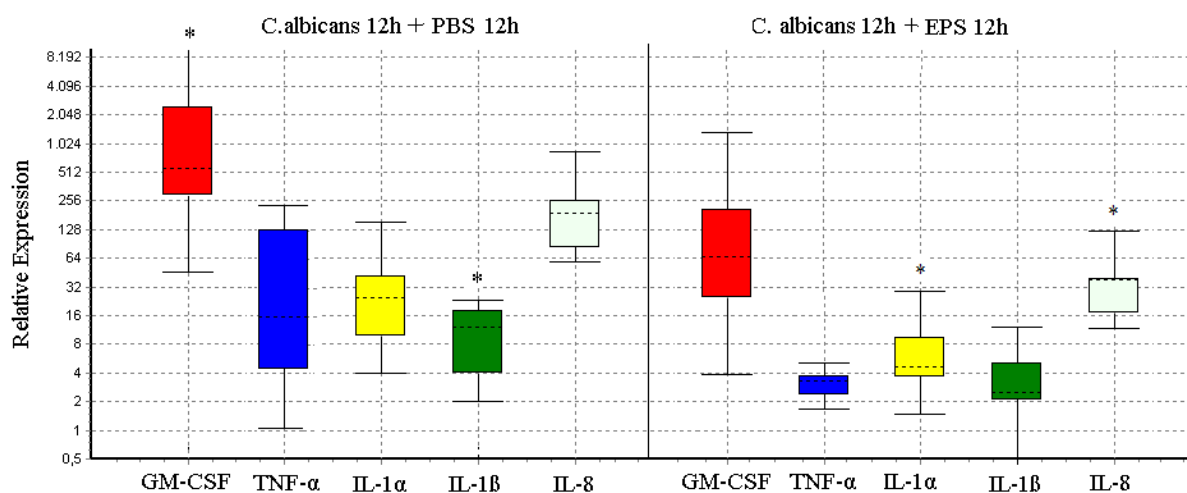


Abbildung 40: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit EPS behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

Ebenfalls ein Rückgang der Zytokinexpression ergab sich bei Behandlung mit hitzeinaktivierten Lactobacillen (Abbildung 41) und bei Zugabe von Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* (Abbildung 42) sowie, etwas geringer ausgeprägt, bei Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* (Abbildung 43).

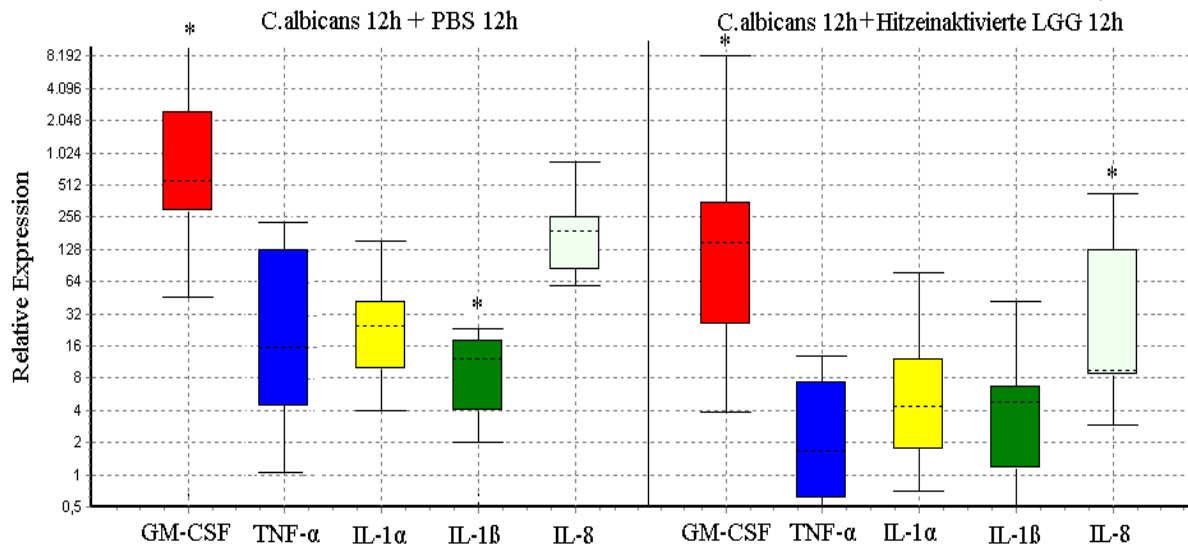


Abbildung 41: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit hitzeinaktivierten LGG behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

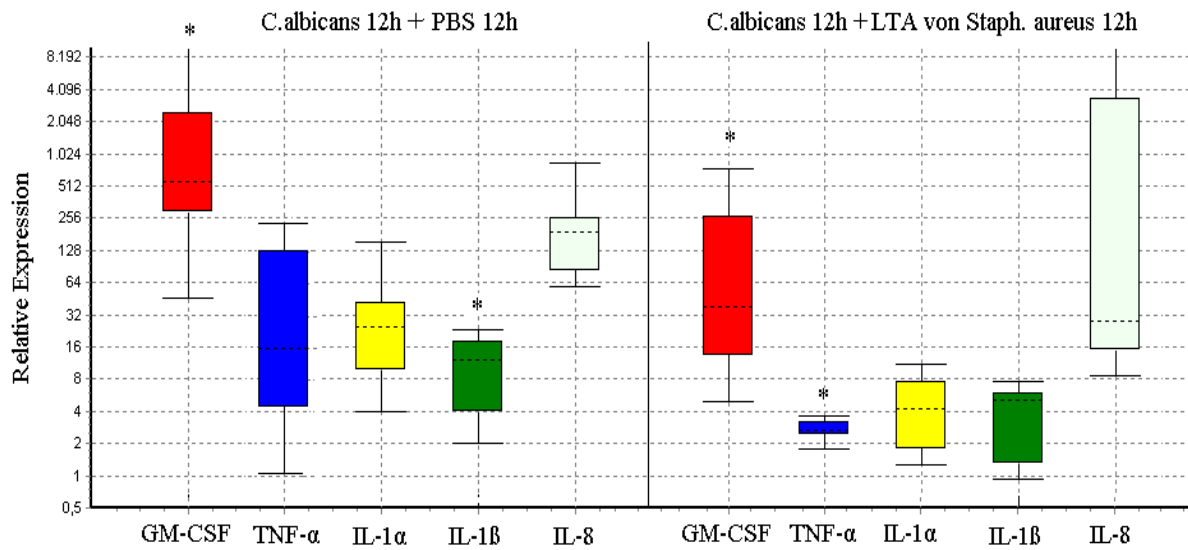


Abbildung 42: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

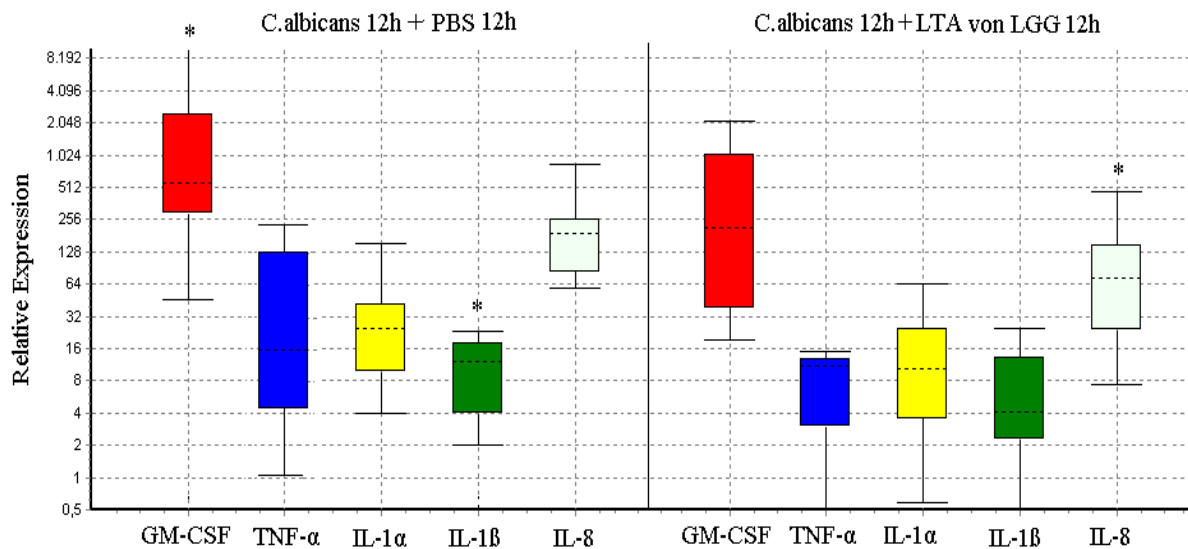


Abbildung 43: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

Bei Behandlung mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG* zeigte sich für die Zytokine IL-1 α und IL-8 ein leichter Rückgang der mRNA-Expression, während sich für die Zytokine GM-CSF, TNF- α und IL-1 β keine wesentlichen Expressionsveränderungen ergaben (Abbildung 44).

Eine Vorinkubation mit dieser Substanz vor Infektion mit *C. albicans* hatte im Gegensatz dazu zu einer Zunahme der mRNA aller untersuchten Zytokine geführt (Abbildung 33).

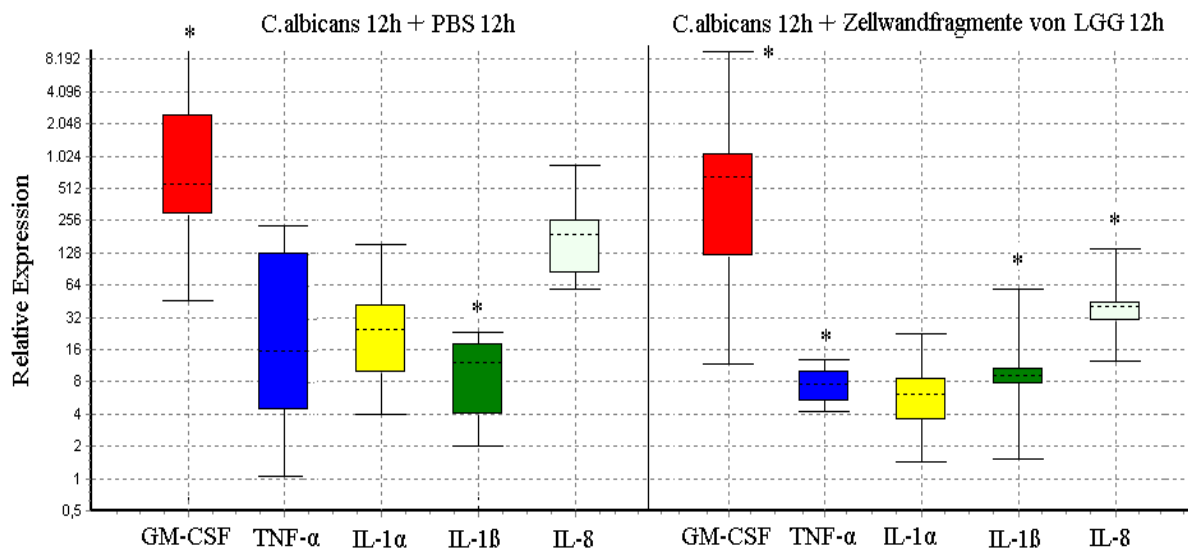


Abbildung 44: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit Zellwandfragmenten von *Lactobacillus rhamnosus GG* behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

Bei den 24 Stunden lang infizierten Proben, welche nach 12 Stunden mit Lipoteichonsäure und Peptidoglykan (Abbildung 45), mit säurebehandelten Lactobacillen (Abbildung 46) bzw. mit Peptidoglykan (Abbildung 47) behandelt wurden, zeigte sich jeweils keine eindeutige Veränderung in der Zytokinexpression.

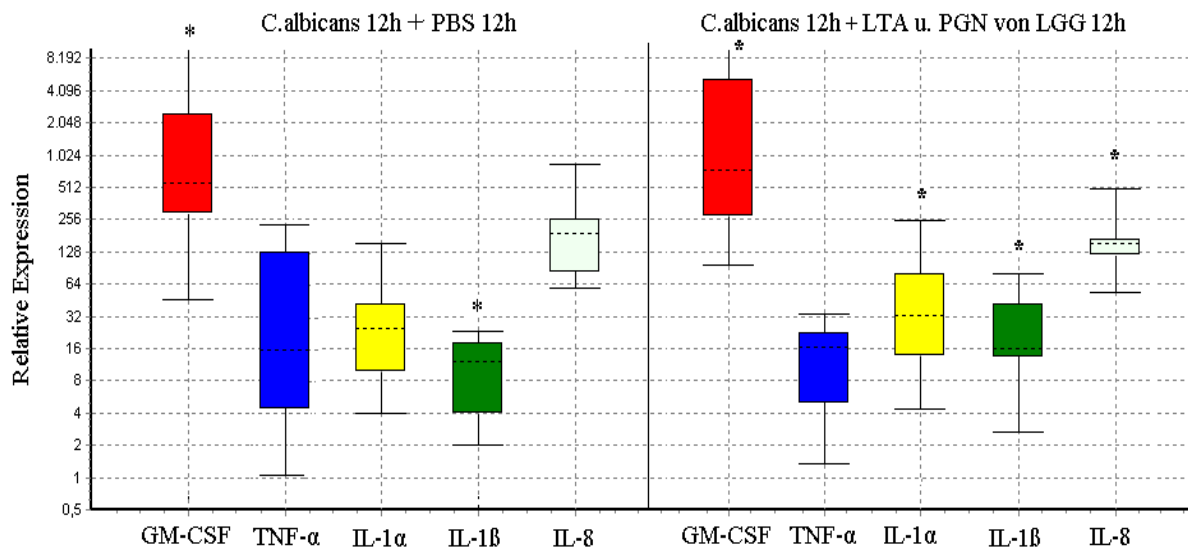


Abbildung 45: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit Lipoteichonsäure und Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus* GG behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

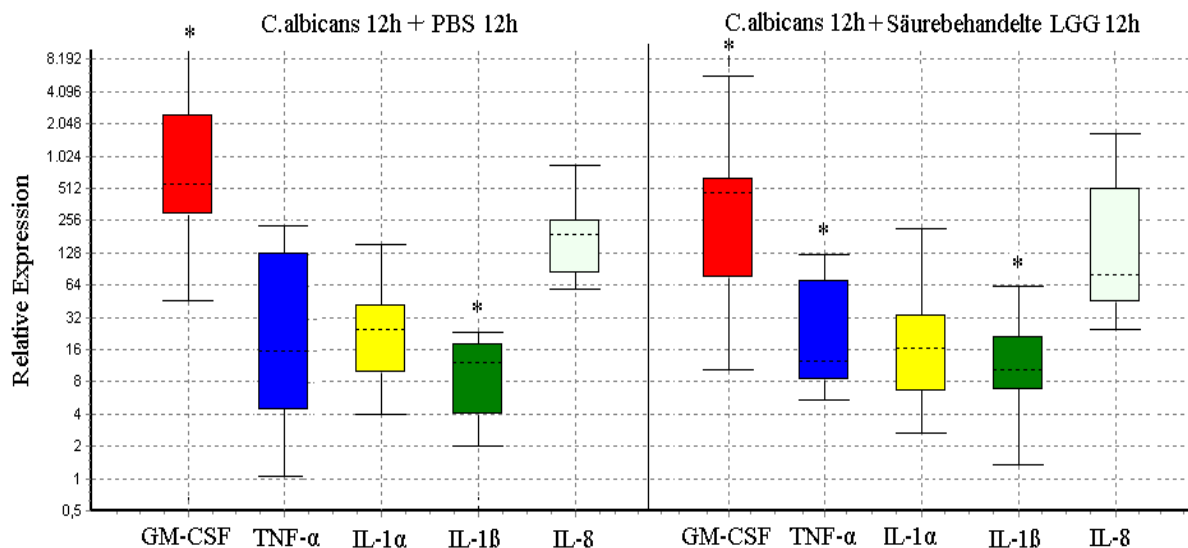


Abbildung 46: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit säurebehandelten *Lactobacillus rhamnosus* GG behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

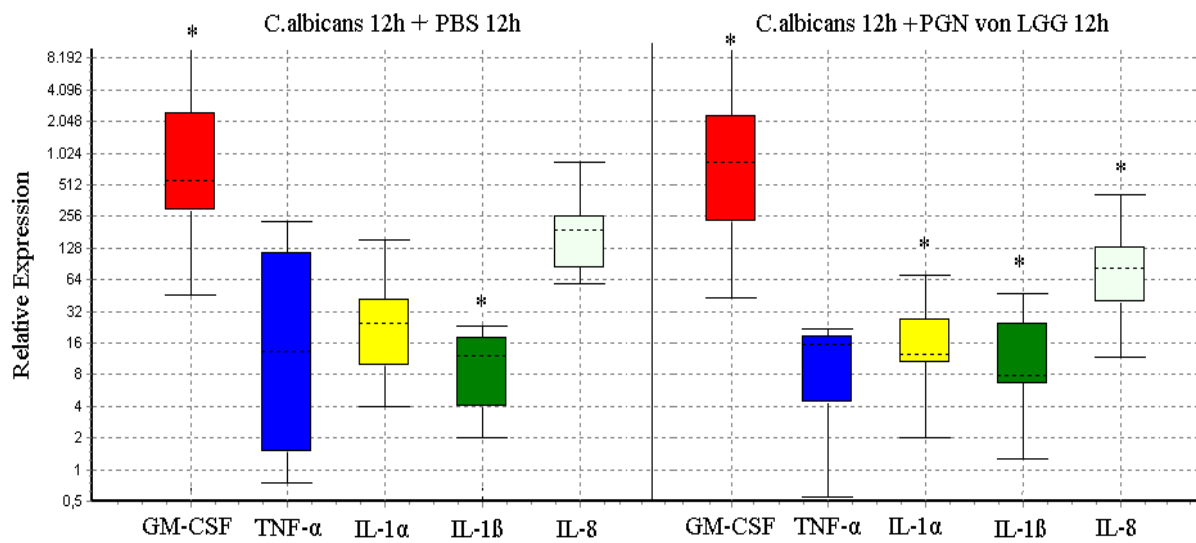


Abbildung 47: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten und anschließend für weitere 12 Stunden mit Peptidoglycan von *Lactobacillus rhamnosus* GG behandelten Schleimhautprobe (rechts) im Vergleich zu der nach Infektion mit *C. albicans* mit PBS (als Neutralsubstanz) behandelten Epithelprobe (links).

4.3 LDH-Test

Bei den sowohl histologisch als auch mittels PCR untersuchten einzelnen Schleimhautproben wurden als laborchemisches Korrelat der Epithelschädigung jeweils auch die Lactatdehydrogenase (LDH)-Konzentrationen im Erhaltungsmedium gemessen. Als intrazelluläres Enzym wird LDH bei der Schädigung von Zellen freigesetzt. Die im Folgenden graphisch dargestellten LDH-Werte sind Mittelwerte der Relativwerte (bezogen auf die jeweils mit 24 Stunden mit PBS als Kontrollsubstanz inkubierten Proben) aus zwei verschiedenen Experimentreihen.

4.3.1 LDH-Konzentration der mit *C. albicans* infizierten Vaginalepithelproben

Die LDH-Freisetzung der Schleimhautzellen wurde in Abhängigkeit von der Infektionsdauer mit *C. albicans* untersucht. Im Vergleich zur LDH-Konzentration einer nicht infizierten, 24 Stunden mit PBS inkubierten Epithelprobe kam es nach 12-stündiger Inkubation der Schleimhaut mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Konzentration im Überstand. Bei der Schleimhautprobe, auf welche *C. albicans* 24 Stunden einwirken konnte, kam es zu einer weiteren deutlichen Zunahme der LDH-Freisetzung (Abbildung 48).

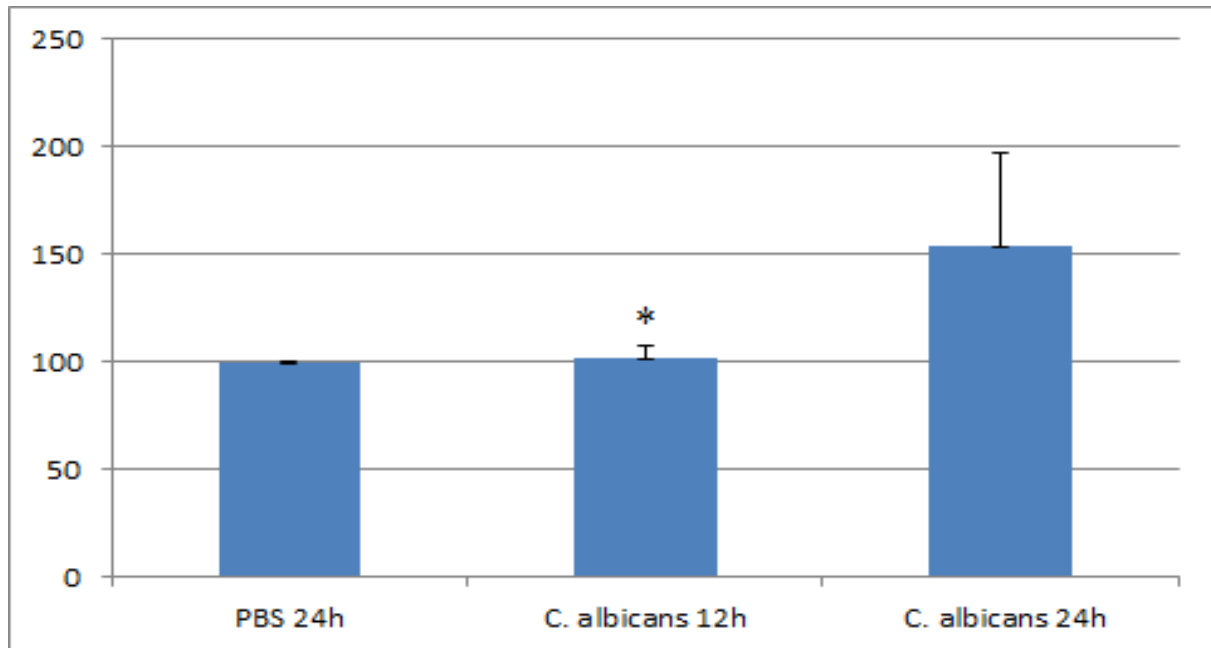


Abbildung 48: LDH-Konzentrationen im Überstand der 24 Stunden mit PBS, 12 Stunden bzw. 24 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubierten Schleimhautproben. Je länger der Hefepilz auf die Epithelien einwirken konnte, desto mehr LDH wurde freigesetzt.

4.3.2 LDH-Konzentration der vorinkubierten, infizierten Vaginalepithelproben

Die Werte der LDH-Konzentration als Zeichen der Zellschädigung waren bei Vorinkubation der RHVE mit Exopolysaccharid vor Infektion mit *C. albicans* signifikant niedriger als bei den mit PBS vorinkubierten Epithelproben. Auch bei den mit Peptidoglykan vorinkubierten Proben ließ sich tendenziell eine Abnahme des LDH-Wertes beobachten. Bei den anderen getesteten *Lactobacillus*-Substanzen ergaben sich ähnlich hohe bzw. höhere LDH-Konzentrationen als bei der mit PBS als Kontrollsubstanz vorinkubierten infizierten Epithelprobe, besonders deutlich war der LDH-Anstieg nach Vorinkubation mit Lipoteichonsäure. (Abbildung 49).

Dies entspricht den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen, welche bei Vorinkubation der Schleimhaut mit Exopolysaccharid bzw. Peptidoglycan eine geringere Epithelschädigung, bei Vorinkubation mit den anderen Testsubstanzen jedoch eine unveränderte bzw. verstärkte Gewebeerstörung gezeigt hatten.

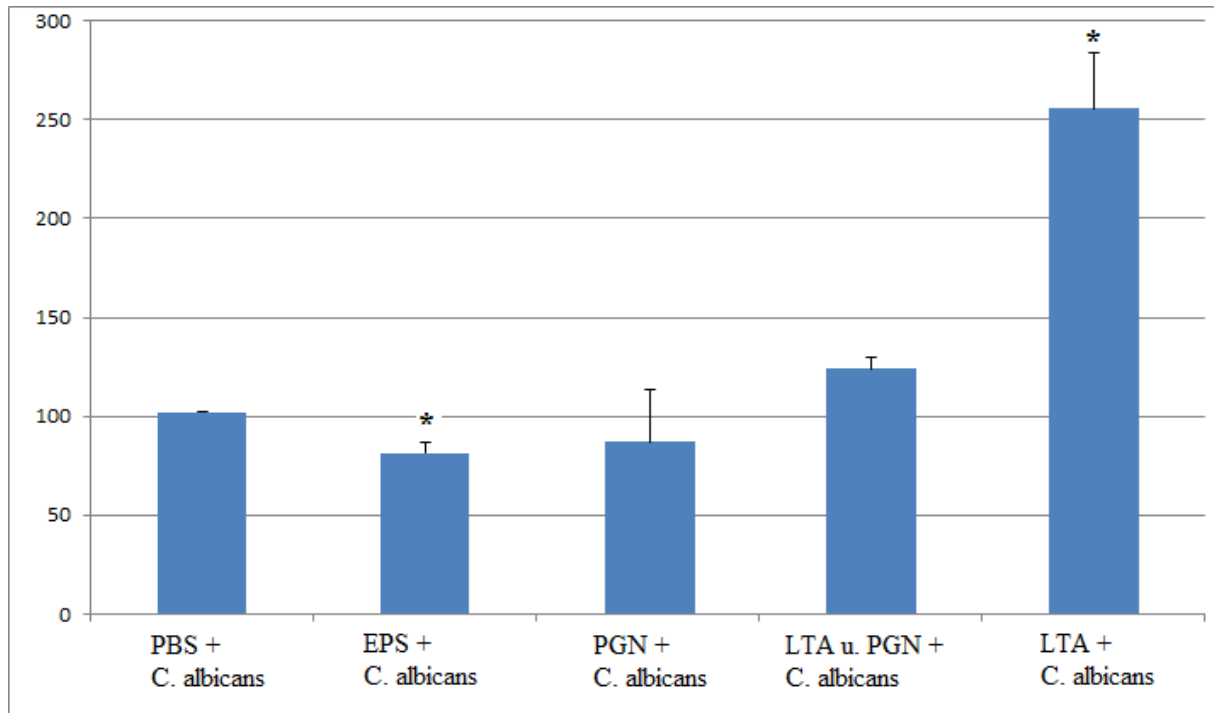


Abbildung 49: Relative LDH-Konzentration (Werte bezogen auf die 24h mit PBS inkubierte Probe) der Epithelien nach Vorinkubation mit PBS (als Kontrollsubstanz) bzw. den verschiedenen Testsubstanzen (Exopolysaccharid, Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und Peptidoglycan, Lipoteichonsäure) und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314.

4.3.3 LDH-Konzentration der infizierten, behandelten Vaginalepithelproben

Nach 12-stündiger Inkubation der Schleimhaut mit *C. albicans* und anschließender Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzen für 12 Stunden konnten bei teils starker Streuung der jeweiligen Einzelwerte im Wesentlichen ähnlich hohe oder höhere LDH-Werte als bei den Epithelproben, welchen PBS als neutrale Kontrollsubstanz zugegeben wurde, gemessen werden. In Abbildung 50 sind die LDH-Werte der mit Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, Peptidoglycan bzw. mit Lipoteichonsäure behandelten infizierten Schleimhautproben im Vergleich zu der mit PBS behandelten Epithelproben graphisch dargestellt.

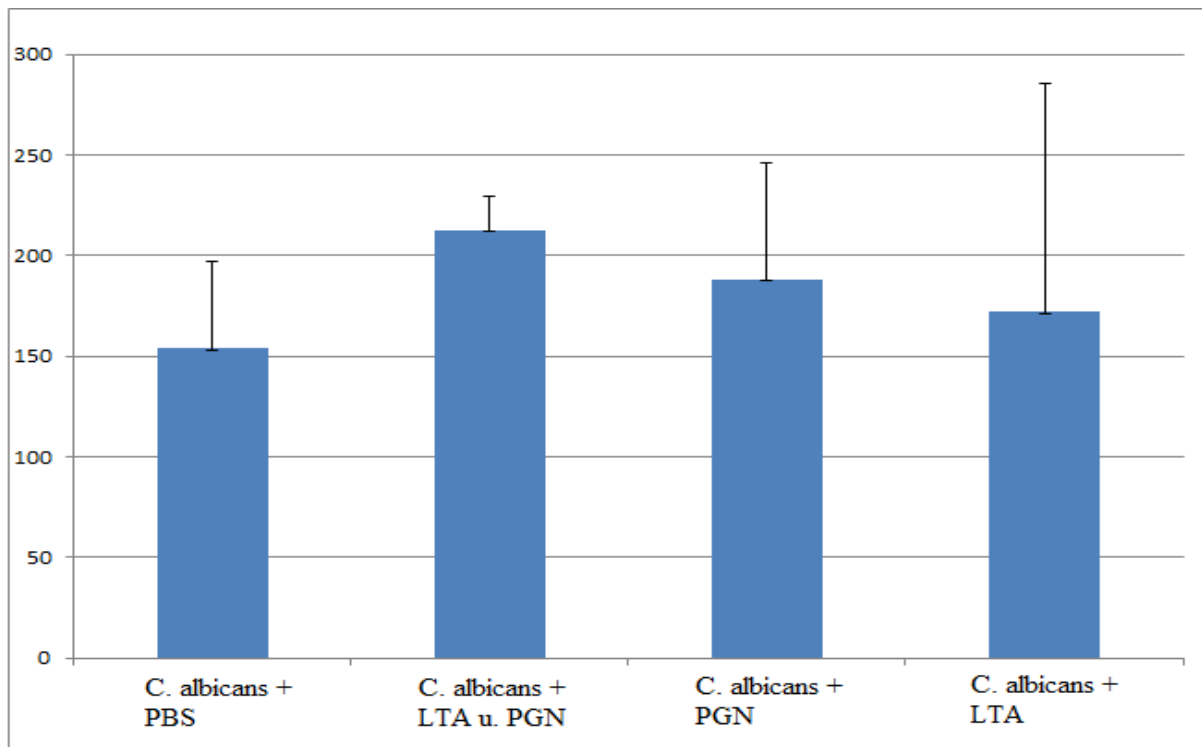


Abbildung 50: Relative LDH-Konzentration in den Überständen der 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und anschließend für weitere 12 Stunden mit den verschiedenen Testsubstanzen (Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, Peptidoglycan, Lipoteichonsäure) bzw. PBS (als Kontrollsubstanz) inkubierten Epithelproben.

5. DISKUSSION

Lactobacillus ist der dominante Mikroorganismus in der Vagina von gesunden Frauen (3; 56). Vaginale Infektionen stehen häufig im Zusammenhang mit einer verminderten Besiedelung der Vaginalschleimhaut durch Lactobacillen (57; 58; 59). Daher wurde in zahlreichen Studien die Wirkung der Lactobacillen, u.a. des Stammes *L. rhamnosus GG*, auf die Vaginalkandidose untersucht, wobei sich Hinweise sowohl für präventive (60; 61; 62; 63; 64; 65; 66) als auch für therapeutische Effekte (67; 68; 69) zeigten. Zur Erklärung der protektiven Wirkung bezüglich einer Vaginalkandidose werden verschiedene Mechanismen der Lactobacillen diskutiert. Zum Beispiel könnten das Aufrechterhalten eines niedrigen pH in der Vagina, der das Wachstum von pathogenen Keimen verhindert, die Produktion antimikrobieller Substanzen wie Milchsäure, Wasserstoffperoxid und Bakteriozinen oder die Produktion eines Biofilms, der die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert, eine Rolle spielen (70; 57; 58; 65; 78). Ein weiterer Mechanismus, mit welchem Lactobacillen das Epithel schützen, könnte die Fähigkeit bestimmter Lactobacillen sein, Aggregate untereinander und mit *C. albicans* zu bilden (80).

In einigen *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Lactobacillen die Anheftung von *C. albicans* und pathogenen Bakterien an urogenitale Epithelzellen durch unspezifische Besetzung des Epithels mit sterischer Hinderung sowie durch kompetitive Hemmung nicht näher definierter Rezeptoren verhindern können (127; 89; 128; 84; 129; 130; 131; 132; 133; 67). Bezüglich des Stammes *L. rhamnosus* konnte in *in vitro* Studien, u.a. an einem rekonstituierten humanen Vaginalepithel, gezeigt werden, dass dieser die Anheftung von pathogenen Bakterien und *C. albicans* an Epithelzellen hemmt und ein vermindertes Wachstum dieser Mikroorganismen bewirkt (67; 134; 85).

Die Zellwand der Lactobacillen tritt als äußere Hülle der Bakterien direkt mit dem Epithel und dem Hefepilz in Interaktion. Daneben kommen auch von den Bakterien produzierte Faktoren direkt mit der Schleimhaut und dem Pathogen in Kontakt. Somit kann vermutet werden, dass an der Wirkung der Lactobacillen auf die Vaginalkandidose insbesondere Zellwandbestandteile der Bakterien sowie von diesen gebildete Produkte beteiligt sind.

C. albicans-Infektion des Vaginalepithels

Bei Infektion des RHVE mit *C. albicans* zeigte sich in dieser Arbeit eine zeitabhängige, zunehmende Gewebeschädigung, der Hefepilz konnte im zeitlichen Verlauf zunehmend tiefer

in die Keratinozytenschichten des Epithels eindringen. Parallel dazu stiegen die LDH-Werte als Zeichen einer Zellschädigung an.

Die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine zeigte einen zeitabhängigen Anstieg. Vor allem IL-8 und GM-CSF wurden stark vermehrt exprimiert. Diese chemotaktischen Mediatoren sind insbesondere wichtig für die Anlockung von Neutrophilen (41), welche bei der *in vivo* Abwehr gegen invadierende Pilz-Pathogene einen großen Einfluss haben und häufig bei kutanen Kandidosen *in vivo* gesehen werden. Ebenfalls wurde die mRNA-Expression von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α erhöht.

In Tierstudien konnte sowohl für systemische (30) als auch für lokale, d.h. vaginale (32; 33; 34; 35; 36; 37) und orale (31) *Candida*-Infektionen gezeigt werden, dass das Outcome der Infektion vom dominanten Zytokin-Profil abhängt. Zytokin-stimulierte T-Helfer (Th) 1-Zell-Entwicklung führte zur Abwehr und zu einer protektiven Immunität, wohingegen eine Th2-Antwort mit einer erhöhten Anfälligkeit verbunden war. Erhöhte Transkriptionslevel für IL-1 α , IL-1 β und TNF- α , stimuliert durch die experimentelle *C. albicans*-Infektion, sind *in vivo* verbunden mit einer protektiven Th1-Typ Zytokin-Antwort und Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten (41; 42; 30).

In dem hier verwendeten Modell der vaginalen Kandidose wurden somit eine chemotaktisch wirksame Zytokinreaktion und eine Zytokinantwort vom Th1-Typ im frühesten Stadium des Kontaktes mit dem Pathogen und ohne den Einfluss anderer immunkompetenter Zellen induziert.

Das hier untersuchte vaginale Modell der Kandidose zeigte entsprechende Zytokin-Expressionen wie das orale und das kutane Modell der Kandidose (27; 40; 38). Dies könnte darauf hinweisen, dass ähnliche Wirtsabwehrmechanismen für kutane und verschieden lokalisierte Schleimhautinfektionen mit *C. albicans* wichtig sind.

Vorbehandlung mit abgetöteten Lactobacillen

In früheren Arbeiten konnte eine prophylaktische Wirkung von lebenden Lactobacillen verschiedener Stämme auf die Vaginalkandidose gezeigt werden (60; 61; 62; 63; 64; 65; 66), insbesondere konnten präventive Effekte von *Lactobacillus rhamnosus* GG für das hier verwendete Vaginalkandidosemodell nachgewiesen werden (85). Diese protektive Wirkung der lebenden Lactobacillen geht, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, durch die Hitzeinaktivierung der Bakterien verloren. Der durch *C. albicans* verursachte Gewebeschaden scheint durch die Applikation der hitzeinaktivierten Lactobacillen sogar noch zuzunehmen.

Die Expression proinflammatorischer Zytokine wird durch die Vorbehandlung des Epithels mit den hitzeinaktivierten Lactobacillen erhöht.

Die Eigenschaft von hitzeinaktivierten Bakterien, eine erhöhte Zytokinexpression zu induzieren, wurde auch von Jotwani et al. im Jahr 1995 in Studien mit Mäusen gezeigt (135). Die epitheliale Immunantwort auf abgetötete Bakterien, hier Lactobacillen, ist auf unterschiedlichen Mikroorganismen gemeinsame Antigene (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), welche mit den mustererkennenden Rezeptoren (*PRRs*) auf den Keratinozyten in Interaktion treten, zurückzuführen. Mustererkennende Rezeptoren können jedoch nicht erkennen, ob es sich um potentiell pathogene oder symbiontische Mikroorganismen handelt. Die genauen Mechanismen, die ermöglichen, dass ein Wirtsorganismus nicht-pathogene Mikroorganismen toleriert, sind bisher noch nicht geklärt (25). Durch die Abtötung der Lactobacillen scheint dieser Mechanismus verloren gegangen zu sein, sodass die hitzeinaktivierten Lactobacillen vermutlich selbst, zusätzlich zu der von *C. albicans* hervorgerufenen, eine Zytokinexpression induziert haben.

Die Unterschiede zwischen den Wirkungen der lebenden bzw abgetöteten Lactobacillen auf die Vaginalkandidose weisen darauf hin, dass wesentliche protektive Faktoren von den lebenden Lactobacillen ausgehende Eigenschaften sind, wie beispielsweise die Produktion von Exopolysacchariden, Hydrogenperoxid oder Säuren, welche durch die Abtötung der Bakterien verloren gegangen sind.

Eine andere Erklärung für die fehlende protektive Wirkung der abgetöteten Lactobacillen könnte sein, dass durch die Behandlung der lebenden Lactobacillen mit Hitze deren Oberfläche verändert bzw. denaturiert wurde, sodass eine Adhäsion und Besetzung bestimmter Rezeptoren auf der Oberfläche der Vaginalschleimhaut oder eine Interaktion mit Oberflächenmolekülen des Hefepilzes nicht mehr möglich war und somit der Hefepilz besser an das Gewebe anheften, eindringen und es zerstören konnte.

Zellwandfragmente

Auch die Vorinkubation der Schleimhaut mit einer Suspension aus Zellwandfragmenten (enthält sowohl Fragmente der Zellmembran als auch sämtliche Komponenten der Zellwand wie Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Wandteichonsäure sowie zellmembran- und zellwandassoziierte Proteine (*S-Layer*)) und die anschließende Infektion mit *C. albicans* bewirkte eine zusätzliche Schädigung der Schleimhaut und einen Anstieg der Zytokinexpression. Die histologisch sichtbare Gewebeschädigung und die Expressionszunahme der proinflammatorischen Zytokine GM-CSF, IL-8, IL-1 α und IL-1 β

waren noch stärker ausgeprägt als bei der mit hitzeinaktivierten Lactobacillen vorbehandelten Schleimhaut.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die entsprechende Präparation der Substanz nun auch Bestandteile der Zellmembran der Lactobacillen mit dem Epithel in Kontakt kommen konnten. Außerdem sind wohl durch die Zellwandfragmentierung mittels Ultraschall vorher in die Zellwand integrierte, immunogen wirkende Moleküle freigelegt und eventuell auch in ihrer nativen Struktur verändert worden. Diese könnten nun eine toxische Wirkung auf die Epithelzellen ausüben sowie eine vermehrte Zytokin- oder Chemokinproduktion bewirken.

Die im Vergleich zu den abgetöteten Lactobacillen stärkere Zellschädigung und erhöhte Zytokinexpression könnte durch eine fraglich höhere Konzentration der in der Suspension enthaltenen und auf das Epithel schädlich bzw. immunogen wirkenden Komponenten als sie in der Suspension mit abgetöteten Lactobacillen vorlag, bedingt sein, sodass die bereits bei dieser Substanz beobachtete epithelschädigende und immunogene Wirkung verstärkt wurde.

Spezifische Komponenten der Lactobacillen-Zellwand

Die Adhärenz des Pilzes an die Wirtsoberfläche ist der erste Schritt einer Infektion. Sie wird erreicht durch eine Kombination von spezifischen (Ligand- Rezeptor- Wechselwirkungen) und unspezifischen (Mucopolysaccharid-, Protein-Protein-, Lektin-Kohlenwasserstoff-Interaktionen) Mechanismen, die es dem Hefepilz erlauben, sich an viele unterschiedliche Gewebetypen und künstliche Oberflächen anzuheften (136; 137). Hierbei sind verschiedene Adhäsine wie Fimbrien, Pili und Membranproteine beteiligt. Aufgrund seiner Adhäsionsfaktoren bindet *C. albicans* besser an menschliche Oberflächen als andere *Candida*-Spezies (6). Es gibt mehrere Studien, die eine Adhäsionsfähigkeit verschiedener *Lactobacillus*-Stämme an Vaginalepithelzellen gezeigt haben. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Lactobacillen vom Stamm *rhamnosus* den Hefepilz *C. albicans* vom Epithel verdrängten und dessen Wachstum verhinderten (67; 134; 85). Da *C. albicans* sich u.a. an bestimmten Bindungsstellen an das Epithel anheftet, kann vermutet werden, dass durch die Blockierung dieser Rezeptoren durch Oberflächenantigene von Lactobacillen die Anheftung von *Candida* kompetitiv verhindert werden kann, wodurch der Hefepilz seine schädigende Wirkung nicht voll entfalten könnte.

Die Oberfläche der *Lactobacillus*-Zellwand besteht neben den in der Zellwandfragmente-Suspension enthaltenen *S-Layer*-Proteinen aus Peptidoglycanen und daraus herausragenden Lipoteichonsäuren, wobei Peptidoglycan als Hauptstrukturkomponente der Zellwand bis zu

einem Drittel der Bakterienmasse ausmacht und Lipoteichonsäure ein amphiphiles, negativ geladenes Glykolipid darstellt.

Peptidoglycan

Bei Vorinkubation des Vaginalepithels mit Peptidoglycan fiel die Schädigung durch den Hefepilz etwas geringer als bei alleiniger *Candida*-Infektion aus. Bezüglich der Expression proinflammatorischer Zytokine zeigte sich bei Vorinkubation mit Peptidoglycan, welches ein unterschiedlichen Bakterien gemeinsames Antigen und einen Liganden für Rezeptoren des angeborenen Immunsystems darstellt, eine Erhöhung im Vergleich zu der nicht vorinkubierten Schleimhautprobe. Der Anstieg von TNF- α , IL-1 α und IL-8 war jedoch deutlich weniger stark als bei der mit Zellwandfragmenten vorinkubierten Epithelprobe.

Zeichen einer verstärkten Immunantwort nach Zugabe von Peptidoglycan konnten auch in Studien mit Alveolar- bzw. Cornealzellen beobachtet werden. Hier zeigte sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg von IL-8 (138) bzw. IL-8 und TNF- α (139). Auch in einer *in vitro*-Studie mit einer vaginalen Epithelzelllinie induzierte die Zugabe von Peptidoglycan die Expression der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine TNF- α und IL-8 (140).

Die schwächere immunogene Wirkung von Peptidoglycan im Vergleich zur gesamten Zellwand der Lactobacillen konnte auch in einer Studie von Matsuguchi et al., 2003 zur Wirkung von *Lactobacillus*-Fraktionen auf Makrophagen beobachtet werden. In dieser fiel die Sekretion von TNF- α bei Zugabe von Polysacchariden/Peptidoglycan deutlich geringer aus als bei Behandlung der Makrophagen mit der gesamten Zellwand von Lactobacillen (141).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete leicht verminderte Schädigung des Epithels bei Vorbehandlung mit Peptidoglycan könnte durch das Besetzen der Epitheloberfläche durch die makromolekularen Peptidoglycane verursacht sein, wodurch evtl. die Anheftung von *C. albicans* und die folgende Gewebsschädigung eingeschränkt wird. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine Wechselwirkung der Peptidoglycane mit den Hefepilzzellen, z. B. durch die Bildung von Peptidoglycan-*C. albicans*-Konglomeraten, sein, wodurch eine Adhäsion des Hefepilzes verhindert würde.

Bei der Isolation von Peptidoglycan sind die in der Zellwandfragmente-Suspension enthaltenen, das Epithel schädigenden Bestandteile, z. B. *S-Layer*-Proteine, Lipoteichonsäure oder Bestandteile der Zellmembran, offenbar entfernt worden. Peptidoglycan hingegen scheint ein Zellwandbestandteil der Lactobacillen zu sein, welcher zur protektiven Wirkung von Lactobacillen in Bezug auf epitheliale *Candida*-Infektionen beiträgt.

Lipoteichonsäure

Die Vorinkubation des Epithels mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillen* vor Infektion mit *C. albicans* bewirkte in dem hier verwendeten Modell eine Zunahme der im histologischen Bild erkennbaren Schädigung. Diese war noch stärker ausgeprägt als bei Vorinkubation der Schleimhaut mit Zellwandfragmenten. Dementsprechend zeigte sich auch ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung als Zeichen der Zellschädigung.

Direkte schädigende Effekte von Lipoteichonsäure auf Zellen wurden von Simpson et al., 1982 beschrieben. Hier übte Lipoteichonsäure eine toxische Wirkung auf eine Zellkultur von menschlichen Herzzellen ohne Anwesenheit weiterer Zellen aus. Dabei führte Lipoteichonsäure in höheren Konzentrationen zu einer Abtötung der Zellen, während es in niedrigerer Konzentration die Zellteilung stimulierte (142). Diese Effekte von Lipoteichonsäure konnten auch bei Mikrogliazellen und bei menschlichen Atemwegsepithelzellen beobachtet werden (143; 144). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Gewebeschädigung könnte somit durch direkte konzentrationsabhängige toxische Effekte von Lipoteichonsäure hervorgerufen worden sein. Denkbar sind daneben auch Wechselwirkungen mit *C. albicans*.

In der Histologie zeigten sich Unterschiede zwischen Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* und Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* (stärkere Gewebeschädigung durch LTA von *LGG*). Dies könnte auf die unterschiedlichen Konzentrationen der in den Suspensionen vorliegenden Lipoteichonsäuren zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung hierfür ist möglicherweise die unterschiedliche biologische Wirksamkeit der Lipoteichonsäure bei verschiedenen Bakterienspezies (145). Die stärkere Gewebedestruktion durch die Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* könnte jedoch auch durch Verunreinigungen der durch Phenolextraktion gewonnenen Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* verursacht sein. Auch die unterschiedlichen Isolationsmethoden, welche eventuell die native Struktur der Lipoteichonsäure verändert haben, könnten eine Rolle gespielt haben. Ähnliche Faktoren scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass frühere Ergebnisse im Zusammenhang mit der Untersuchung von Lipoteichonsäure auf ihre immunstimulatorische Potenz relativ uneinheitlich sind (146; 147). Die Messung der Zytokinexpression bei Vorinkubation mit Lipoteichonsäure von *Lactobacillus rhamnosus GG* ergab bei dem hier verwendeten Vaginalkandidosemodell insbesondere eine Erhöhung der Expression von IL-8. Eine Induktion der IL-8-Freisetzung durch Lipoteichonsäure ist auch für menschliche Monozyten gezeigt worden (148). IL-8 ist ein Mediator einer akuten Entzündung, ein starkes

Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten, Basophile und T-Zellen und bewirkt deren Aktivierung und Adhäsion. Zur Beurteilung der Effekte der Lipoteichonsäure als Zellwandbestandteil der Lactobacillen in Bezug auf die Vaginalkandidose sind die in der vorliegenden Arbeit vorhandene Konzentration und Isolationsmethode der Lipoteichonsäure, welche womöglich eine Rolle bei den (schädigenden) Wirkungen gespielt haben könnten, zu beachten. Weitere Untersuchungen mit Lipoteichonsäure in unterschiedlichen Konzentrationen könnten über eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte näheren Aufschluss geben.

Eine Vorinkubation der Schleimhaut mit säurebehandelten und somit Lipoteichonsäure-freien Lactobacillen führte ebenfalls zu einer stärkeren Gewebeschädigung als eine alleinige Infektion des Epithels mit *C. albicans*. Dies spricht dafür, dass es neben Lipoteichonsäure noch andere im Rahmen einer Vaginalkandidose gewebeschädigende *Lactobacillus*-Bestandteile, z. B. die *S-Layer*-Proteine, gibt. Diese sind sowohl Bestandteil der Lipoteichonsäure-freien Lactobacillen als auch der Zellwandfragmente-Suspension und der hitzeinaktivierten Lactobacillen, welche bei Vorinkubation alle zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung geführt hatten. Die zusätzliche Schleimhautschädigung in diesem Ansatz könnte zudem durch säurebedingte chemische Veränderungen der Lipoteichonsäure-freien Lactobacillen bedingt sein. Außerdem könnten an der Epithelschädigung normalerweise nicht an der Zellwandoberfläche liegende Bestandteile der Lactobacillen beteiligt sein, die durch die Säurebehandlung freigesetzt wurden und nun mit dem Epithel in Kontakt bzw. mit *C. albicans* in Interaktion treten konnten. Auch die starke immunogene Wirkung der säurebehandelten Lactobacillen, welche sich in Form einer massiven Erhöhung aller untersuchten Zytokine darstellte, könnte durch diese Faktoren erklärt werden.

Lipoteichonsäure und Peptidoglycan

Eine Vorinkubation der Vaginalschleimhaut mit einer Suspension, welche sowohl Peptidoglycan als auch Lipoteichonsäure enthielt, führte zu einer massiven Gewebeschädigung, welche mit der allein durch Lipoteichonsäure hervorgerufenen Schädigung vergleichbar war. Somit überwiegen hier offensichtlich die schädigenden Effekte von Lipoteichonsäure gegenüber der protektiven Wirkung von Peptidoglycan. Die Expression aller untersuchten proinflammatorischen Zytokine wurde sehr stark hochreguliert. Hierbei war festzustellen, dass sowohl die unter Vorinkubation mit Peptidoglycan erhöhte GM-CSF-mRNA-Expression als auch die unter Vorinkubation mit Lipoteichonsäure bzw.

Peptidoglycan erhöhte IL-8-mRNA-Bildung bei kombinierter Gabe von Peptidoglycan und Lipoteichonsäure stark vermehrt nachweisbar waren und sogar höhere Werte als bei Vorinkubation mit den jeweils einzelnen Substanzen aufwiesen.

Aus mehreren Studien, an menschlichem Blut und an Tieren, ist bekannt, dass Peptidoglycan und Lipoteichonsäure bei gemeinsamer Verabreichung im Sinne eines Synergismus eine deutlich stärkere immunologische Reaktion als die einzelnen Substanzen bewirken. Dabei konnten vielfach höhere Zytokinspiegel gemessen werden und es kam eher zum Schock und Multiorganversagen (149; 150; 151; 152; 153). So könnte auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Zytokin-mRNA-Expression durch synergistische Effekte erklärt werden.

Exopolysaccharid

Von allen getesteten *Lactobacillus*-Substanzen in dieser Arbeit zeigte das von *Lactobacillus sanfranciscensis* produzierte Exopolysaccharid die beste protektive Wirkung in Bezug auf eine Vaginalkandidose. Wenn es vor Infektion mit *C. albicans* auf das Epithel gegeben wurde, konnte es die durch den Hefepilz hervorgerufene, histologisch sichtbare Schleimhautschädigung deutlich abschwächen. Auch die niedrigen LDH-Konzentrationen im Probenüberstand wiesen auf eine geringere Zellschädigung als bei den nur mit *C. albicans* infizierten Proben hin. Bei Beurteilung der Zytokin-mRNA-Expression fiel ein mäßiger Anstieg aller untersuchten Zytokine auf. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Proben stiegen TNF- α und IL-1 α etwa im gleichen Maße an wie GM-CSF und IL-8. Eine immunmodulatorische Wirkung ist auch für das Exopolysaccharid von *Lactobacillus rhamnosus RW-9595M* gezeigt worden. Dieses stimulierte in immunkompetenten Zellen des Menschen und der Maus IL-6, IL-12 und TNF- α (118).

Bisher sind als mögliche Wirkfaktoren von Lactobacillen bei der Prävention und Behandlung von Vaginalkandidosen insbesondere die Interferenz von Lactobacillen mit der Adhärenz von *Candida* an Epithelien, die H₂O₂-Bildung der Lactobacillen sowie in letzter Zeit weitere von Lactobacillen gebildete Faktoren wie cyclische Dipeptide (154) untersucht worden. Exopolysaccharide, welche auch präbiotische (114) und anti-ulceröse Effekte (113) aufweisen sollen, stellen somit einen hier neu beschriebenen potentiellen Wirkfaktor der protektiven Effekte von Lactobacillen auf Vaginalkandidosen dar.

Behandlung der Vaginalkandidose

Die Behandlung einer bestehenden Vaginalkandidose mit *Lactobacillus*-Substanzen konnte die Gewebeschädigung durch *C. albicans* nicht verhindern oder abschwächen. Viele der Substanzen führten sogar zu einer zusätzlichen Epithelschädigung, entsprechend hoch waren die LDH-Konzentrationen im Probenüberstand. Die Zytokinexpression ergab kein eindeutiges Bild, tendenziell kam es in Folge der Behandlung zu einer Abnahme der jeweiligen Zytokin-mRNA-Expression. Letztlich konnten somit für keine der *Lactobacillus*-Substanzen Hinweise für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung bei einer manifesten vaginalen *Candida*-Infektion gefunden werden.

Wirkmechanismen

Da bei der Behandlung der Vaginalkandidose auch die prophylaktisch wirksamen *Lactobacillus*-Substanzen, Peptidoglycan und Exopolysaccharid, keine therapeutische Wirkung zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass für die gegen *Candida* gerichteten Effekte von Lactobacillen Faktoren verantwortlich sind, die vor der Anheftung und dem Eindringen des Hefepilzes in das Epithel ihre Wirkung entfalten. Somit scheint der entscheidende Wirkmechanismus in diesem Modell entweder eine Interaktion von Peptidoglycan bzw. Exopolysaccharid mit dem Hefepilz vor der Adhäsion an das Epithel, z. B. durch Bindung an die adhäsiven Polysaccharide, oder eine Besetzung der Epitheloberfläche zu sein. Letztere könnte entweder durch eine unspezifische Bedeckung durch Makromoleküle und somit sterische Hinderung der Anlagerung von *Candida* oder durch Blockade spezifischer Rezeptoren erfolgen.

Diskussion des Modells

Für das Modell des rekonstituierten humanen Vaginalepithels (RHVE) ist gezeigt worden, dass es ein hochdifferenziertes Abbild der menschlichen Vaginalschleimhaut darstellt und auch bezüglich der Morphologie, der Expression von Zytokinen sowie der biochemischen Charakterisierung gut mit der *in vivo*-Situation übereinstimmt (155).

Bei der Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf die Situation *in vivo* ist das Fehlen diverser physiologischer Faktoren, welche den Verlauf von Infektionen und Entzündungen *in vivo* beeinflussen, zu beachten: Blut- und Lymphzirkulation, Beeinflussung durch Hormone, immunkompetente Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems sowie humorale Komponenten wie Antikörper und Komplementsystem. Diese Faktoren werden u.a. durch die hier untersuchten Zytokine in vielfältiger und komplexer

Weise beeinflusst. Daher lässt sich nicht beurteilen, wie sich die beobachteten Veränderungen der Expression bestimmter Zytokine auf die Vaginalkandidose *in vivo* auswirken. Denkbar ist eine Unterstützung bei der Abwehr der Infektion, aber auch eine zusätzliche Schädigung durch überschießende Immunreaktionen und Entzündungsprozesse.

Aus dem isolierten Vorliegen von vaginalen Epithelzellen ergibt sich jedoch auch ein Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten Modells. Hierdurch lässt sich nämlich die Reaktion der Schleimhautzellen auf eine *Candida*-Infektion sowie die Wirkung der verschiedenen *Lactobacillus*-Substanzen untersuchen, ohne dass Einflussgrößen wie andere Zellen, Hormone usw. vorliegen. Eine solche Reduktion der Parameter ermöglicht bei dem komplexen Geschehen erst eine Beurteilung einzelner Größen.

Klinische Relevanz

Im Gegensatz zu den in Bezug auf eine Vaginalkandidose protektiv wirkenden lebenden Lactobacillen wurde durch einige *Lactobacillus*-Zellwandbestandteile, u.a. Lipoteichonsäure, der Gewebeschaden sogar noch verstärkt. Somit sind nicht alle Komponenten von Lactobacillen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung bei vaginalen *Candida*-Infektionen geeignet.

Eine protektive Wirkung und somit einen möglichen Ansatzpunkt zur prophylaktischen Behandlung der Vaginalkandidose zeigten hingegen der *Lactobacillus rhamnosus*-Zellwandbestandteil Peptidoglycan, welcher jedoch bei bereits bestehender *Candida*-Infektion eher zu einer leichten zusätzlichen Epithelschädigung beizutragen schien, und insbesondere das Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*. Übertragen auf die Situation *in vivo* könnte dies für eine mögliche therapeutische Einsetzbarkeit von Exopolysaccharid sprechen, welches auch die am stärksten ausgeprägte protektive Wirkung aufwies.

Überdies könnten sich auch weitere Eigenschaften von Exopolysacchariden positiv auswirken: Exopolysaccharid dient als präbiotische Substanz den zur normalen vaginalen Flora gehörenden Bifidobakterien als Nahrung und fördert deren Wachstum (122). Dadurch könnten pathogene Organismen verdrängt und die normale Mikroflora wiederhergestellt werden. Die Metabolisierung von Exopolysaccharid durch Bifidobakterien führt außerdem durch die Bildung von Lactat und kurzkettigen Fettsäuren zu einem niedrigen pH-Wert, was zu einer zusätzlichen Inhibition von Pathogenen beiträgt (156), (157) und das Wachstum von Lactobacillen, welche bevorzugt in einem sauren Milieu wachsen, begünstigt (44).

Zur näheren Beschreibung der protektiven Eigenschaften von Exopolysaccharid in Bezug auf *Candida*-Infektionen wären zunächst weitere Untersuchungen erforderlich. Hierbei könnte

auch die Wirkung von Exopolysaccharid in verschiedenen Dosen und in Abwesenheit (wie in dieser Arbeit) bzw. Anwesenheit von Lactobacillen untersucht werden.

Des Weiteren könnten Exopolysaccharide von verschiedenen *Lactobacillus*-Stämmen auf Unterschiede bei der Wirkung auf Vaginalkandidosen getestet werden. Auch die Verträglichkeit von Exopolysacchariden bei lokaler Anwendung *in vivo* müsste untersucht werden, wobei aufgrund der Verwendung von Exopolysacchariden in Nahrungsmitteln, z. B. in Backwaren nicht von einer toxischen Wirkung auf Schleimhäute auszugehen ist.

Eine klinische Anwendung von Exopolysacchariden könnte in der lokalen Verabreichung zur Vorbeugung einer Vaginalkandidose bestehen. Indikationen könnten die Prävention einer Vaginalkandidose bei Antibiotikatherapie oder die prophylaktische Behandlung bei rezidivierender Vaginalkandidose sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vulvovaginale Kandidose stellt mit einer Prävalenz von 5-10% ein häufiges Krankheitsbild dar. Oftmals steht sie im Zusammenhang mit einer verminderten Besiedelung der Vaginalschleimhaut durch Lactobacillen. Diese zeigten in zahlreichen Studien sowohl präventive als auch therapeutische Effekte auf die Vaginalkandidose. Die Zellwand der Lactobacillen tritt als äußere Hülle der Bakterien direkt mit dem Epithel und dem Hefepilz in Interaktion. Daneben kommen auch von den Bakterien produzierte Faktoren direkt mit der Schleimhaut und den Pathogenen in Kontakt. Somit kann vermutet werden, dass an der Wirkung der Lactobacillen auf die Vaginalkandidose insbesondere Zellwandbestandteile der Bakterien sowie von diesen gebildete Produkte, z. B. Exopolysaccharid, beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde an einem mit *C. albicans* infizierten rekonstituierten humanen Vaginalepithel als Modell der Vaginalkandidose untersucht, wie sich die Gabe einzelner Bestandteile der Lactobacillen, insbesondere der Zellwand, auf den Verlauf der Infektion auswirkt. Getestet wurden hitzeinaktivierte Lactobacillen, Zellwand- /Zellmembranfragmente mit assoziierten Proteinen, die Zellwandbestandteile Peptidoglykan und Lipoteichonsäure sowie ein Exopolysaccharid. Neben histologischen Untersuchungen wurde die LDH-Freisetzung als Maß der Zellschädigung biochemisch bestimmt. Da bei der Abwehr vaginaler Infektionen durch *C. albicans* die lokale Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, wurden parallel dazu die Auswirkungen auf die Zytokinexpression der Schleimhaut mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass das infizierte Vaginalepithel abhängig von der Infektionsdauer eine zunehmende Gewebeschädigung aufweist und dass parallel dazu die LDH-Konzentration sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine ansteigen.

Bei dem bereits infizierten Vaginalepithel konnte durch die Gabe der verschiedenen *Lactobacillus*-Substanzen keine positive Wirkung auf den Infektionsverlauf festgestellt werden, zum Teil wurde die Gewebeschädigung sogar noch verstärkt. Die LDH-Messungen ergaben dementsprechend hohe Werte. Die Expression proinflammatorischer Zytokine nahm tendenziell ab. Insgesamt konnten somit keine Hinweise für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung der untersuchten *Lactobacillus*-Substanzen bei einer manifesten vaginalen *Candida*-Infektion gefunden werden.

Bei Behandlung des Epithels mit den verschiedenen *Lactobacillus*-Substanzen vor Infektion mit *Candida* zeigten sich verschiedenartige Effekte. Bei manchen Substanzen, wie Lipoteichonsäure, wurde eine zusätzliche epithelschädigende Wirkung beobachtet. Eine

protektive Wirkung hingegen und somit einen möglichen Ansatzpunkt zur prophylaktischen Behandlung der Vaginalkandidose zeigten der *Lactobacillus rhamnosus*-Zellwandbestandteil Peptidoglycan und insbesondere das Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis*, welches von allen Substanzen am besten vor einer Schädigung durch *C. albicans* schützte. Dies zeigte sich sowohl am relativ intakten histologischen Bild der Schleimhaut als auch an der, im Vergleich zu den anderen Proben, niedrigen LDH-Konzentration im Überstand. Bei Messung der Zytokinexpression zeigte sich hier ein relativ gleichmäßiger, moderater Anstieg aller untersuchten proinflammatorischen Zytokine.

Aufgrund der prophylaktischen Wirkung, jedoch fehlenden Beeinflussung des Infektionsverlaufs nach Eindringen von *Candida*, ist davon auszugehen, dass die Wirkung von Peptidoglycan und Exopolysaccharid gegenüber *C. albicans* im Verhindern des ersten Schrittes der Infektion, nämlich der Adhäsion bzw. des Eindringens in das Epithel besteht. Der entscheidende Wirkmechanismus in diesem Modell scheint somit entweder eine Interaktion mit *C. albicans* vor dem Kontakt mit dem Epithel, z. B. durch Blockierung der adhäsiven Polysaccharide des Hefepilzes, oder eine Besetzung der Epitheloberfläche zu sein. Diese könnte entweder durch eine unspezifische Bedeckung durch Makromoleküle und somit sterische Hinderung der Anlagerung von *Candida* oder durch eine Blockade spezifischer Rezeptoren erfolgen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse könnten auf eine klinische Einsetzbarkeit insbesondere von Exopolysaccharid hinweisen. Dieses könnte auch durch eine Verstoffwechslung durch die in der Vaginalflora anwesenden Bifidobakterien deren Wachstum fördern, zu einem niedrigen intravaginalen pH-Wert beitragen und damit der Vermehrung von Pathogenen entgegenwirken. Exopolysaccharide könnten beispielsweise prophylaktisch zur Vorbeugung einer Vaginalkandidose lokal verabreicht werden. Mögliche Indikationen könnten die Prävention einer Vaginalkandidose bei Antibiotikatherapie sein oder die prophylaktische Behandlung bei rezidivierender Vaginalkandidose.

7. ANHANG

Histologische Bilder: (1. Hautlieferung):

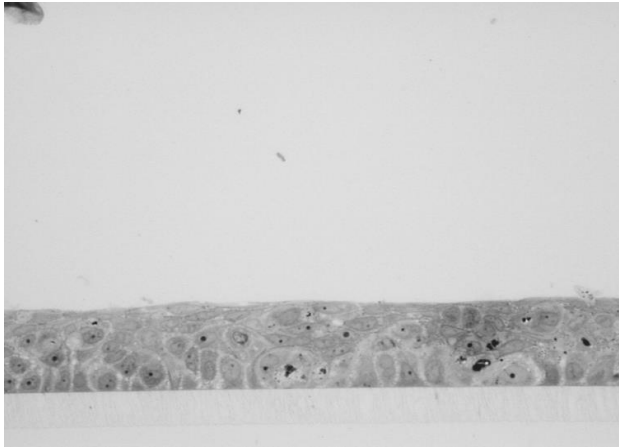


Abbildung 51: Histologisches Bild:
24h PBS



Abbildung 52: Histologisches Bild:
PBS 12h + SC 5314 12h

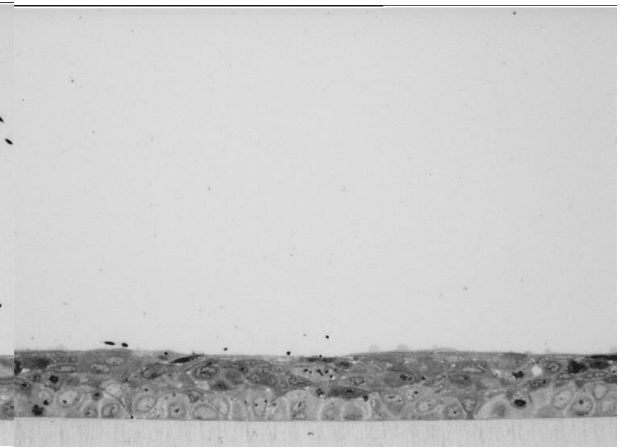


Abbildung 53: Histologisches Bild:
EPS 12h + SC5314 12h

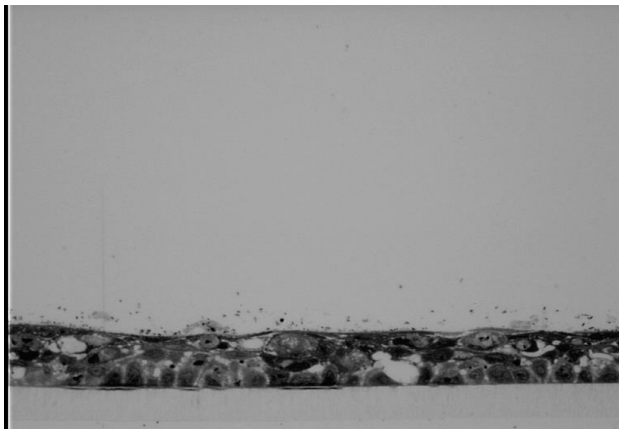


Abbildung 54: Histologisches Bild:
Zellwandfragm. v. LGG 12h + SC5314 12h

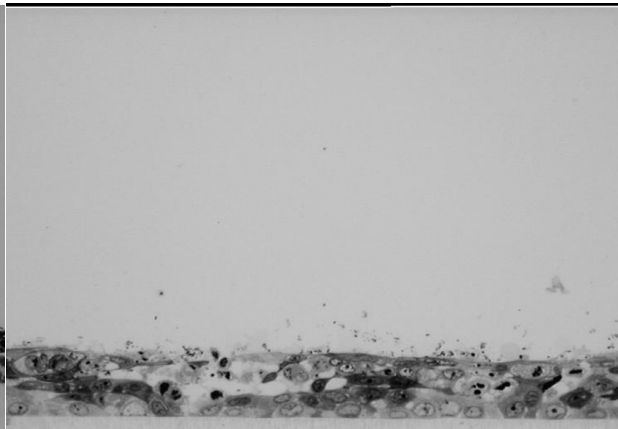


Abbildung 55: Histologisches Bild:
LTA und PGN 12h + SC5314 12h

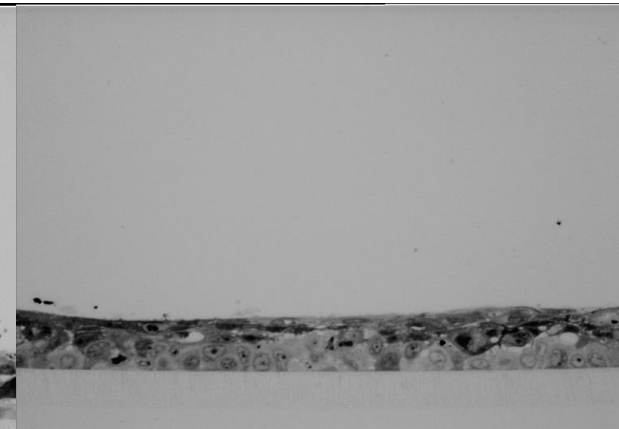


Abbildung 56: Histologisches Bild:
PGN 12h + SC5314 12h



Abbildung 57: Histologisches Bild:
LTA 12h + SC5314 12h

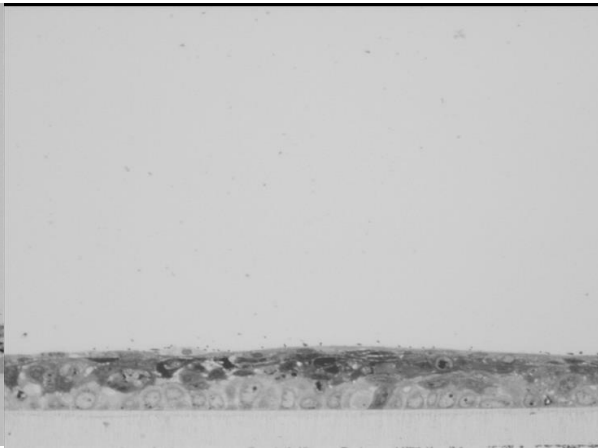


Abbildung 58: Histologisches Bild:
Säureb. Lact. 12h + SC5314 12h



Abbildung 59: Histologisches Bild:
Hitzeinaktivierte LGG 12h + SC5314 12h



Abbildung 60: Histologisches Bild:
SC5314 12h + PBS 12h



Abbildung 61: Histologisches Bild:
SC5314 12h + Zellwandfragm. v. LGG 12h

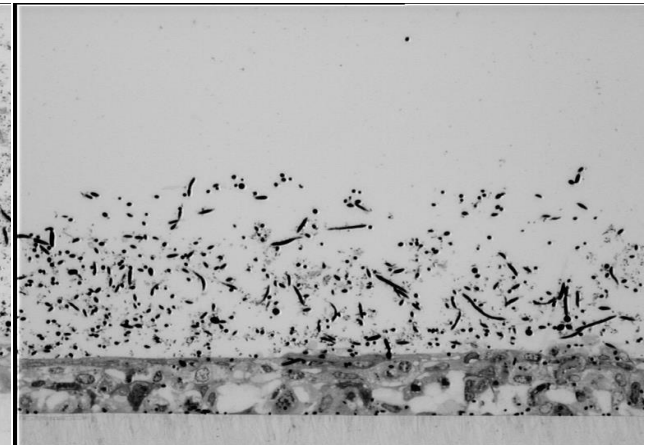


Abbildung 62: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA und PGN 12h



Abbildung 63: Histologisches Bild:
SC5314 12h + PGN 12h



Abbildung 64: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA 12h

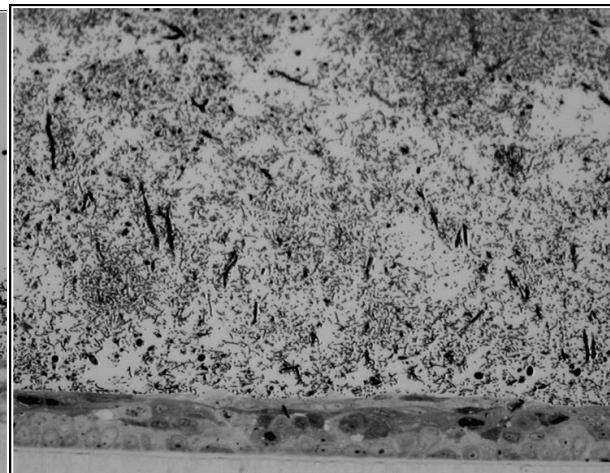


Abbildung 65: Histologisches Bild:
SC5314 12h + säureb. Lact. 12h



Abbildung 66: Histologisches Bild:
SC5314 12h + hitzeinaktivierte Lact. 12h

Histologische Bilder (2. Hautlieferung):

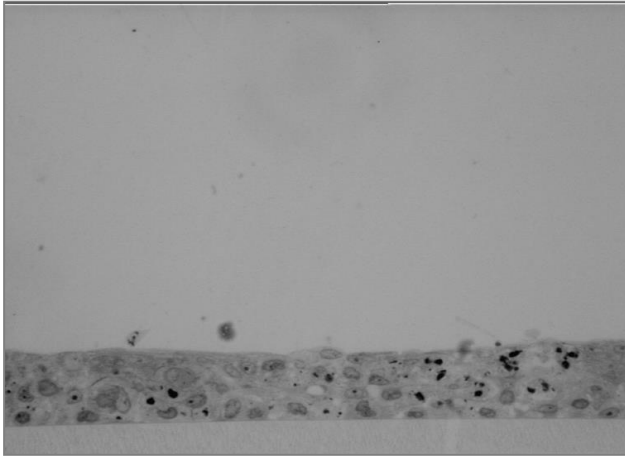


Abbildung 67: Histologisches Bild:
24h PBS

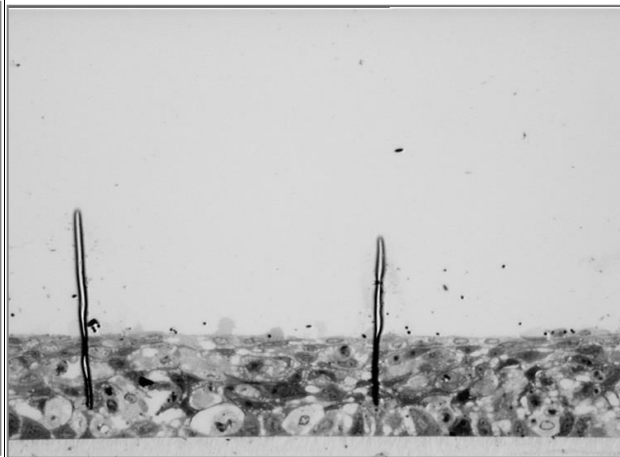


Abbildung 68: Histologisches Bild:
PBS 12h + SC 5314 12h

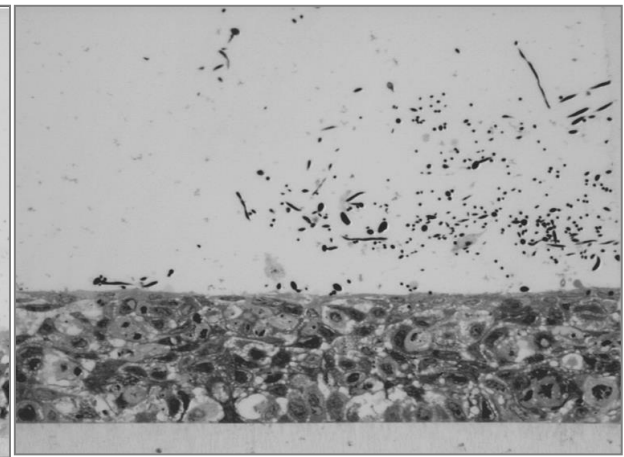


Abbildung 69: Histologisches Bild:
EPS 12h + SC5314 12h

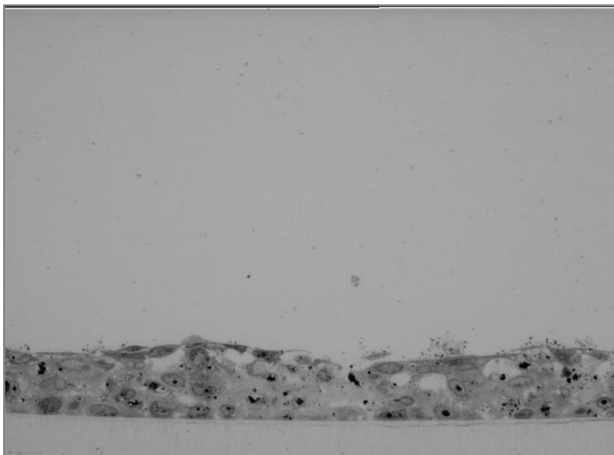


Abbildung 70: Histologisches Bild:
Zellwandfragm. v. LGG 12h + SC5314 12h

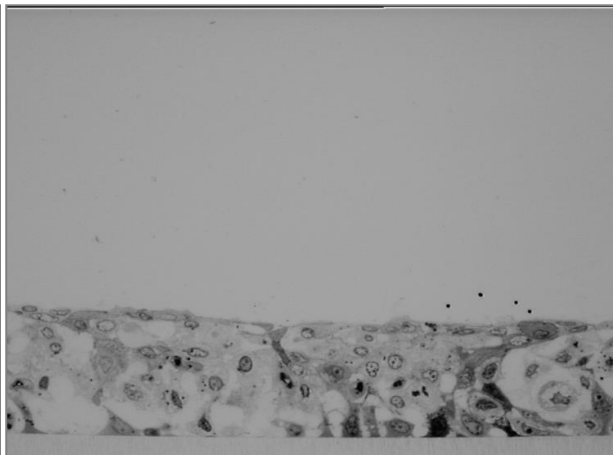


Abbildung 71: Histologisches Bild:
LTA und PGN 12h + SC5314 12h

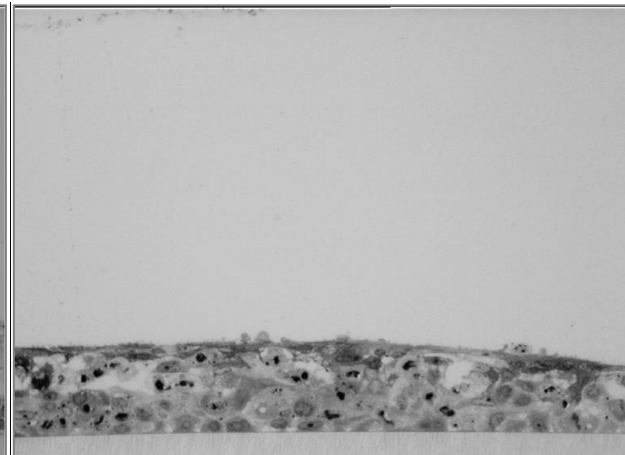


Abbildung 72: Histologisches Bild:
PGN 12h + SC5314 12h

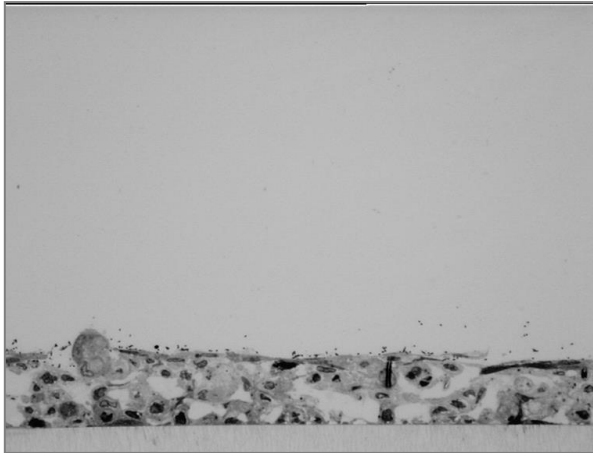


Abbildung 73: Histologisches Bild:
LTA 12h + SC5314 12h

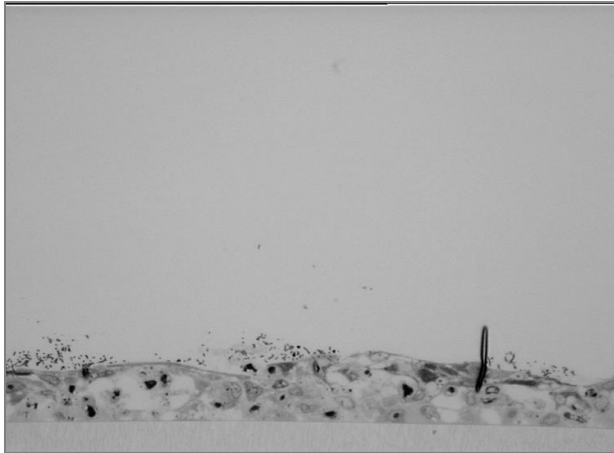


Abbildung 74: Histologisches Bild:
Säureb. Lact. 12h + SC5314 12h



Abbildung 75: Histologisches Bild:
Hitzeinaktivierte LGG 12h + SC5314 12h



Abbildung 76: Histologisches Bild:
SC5314 12h + PBS 12h



Abbildung 77: Histologisches Bild:
SC5314 12h + Zellwandfragm. v. LGG 12h



Abbildung 78: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA und PGN 12h

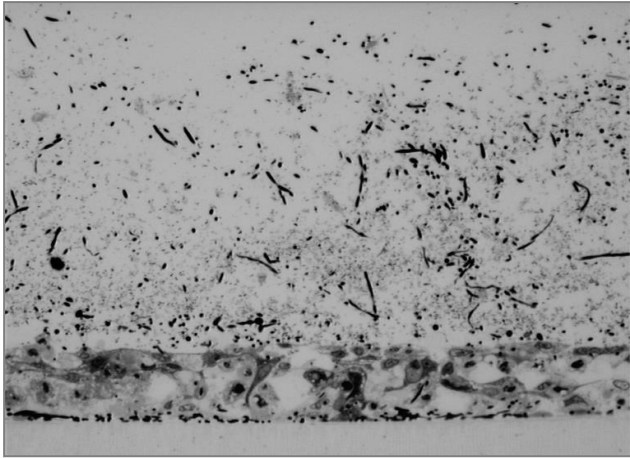


Abbildung 79: Histologisches Bild:
SC5314 12h + PGN 12h

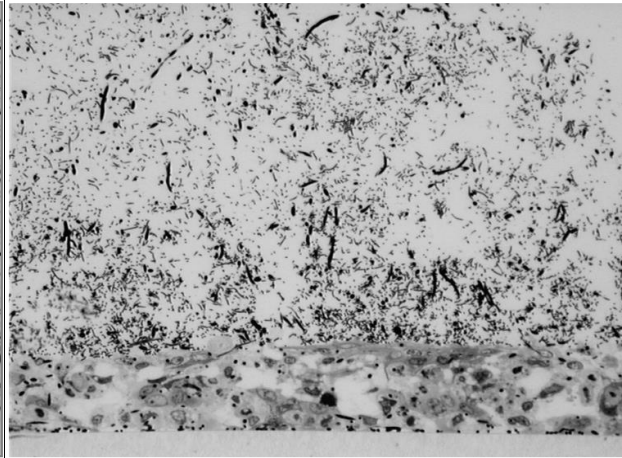


Abbildung 80: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA 12h

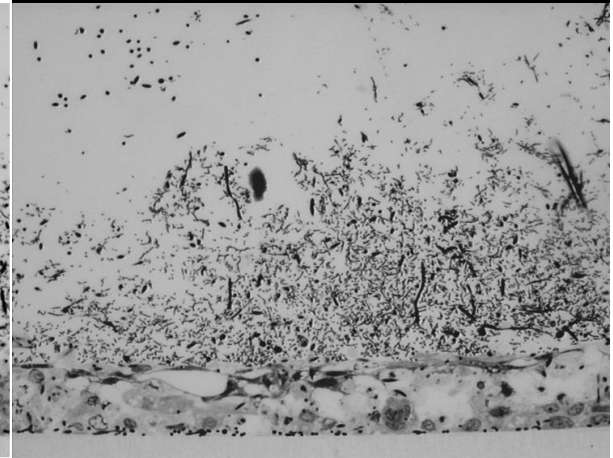


Abbildung 81: Histologisches Bild:
SC5314 12h + säureb. Lact. 12h



Abbildung 82: Histologisches Bild:
SC5314 12h + hitzeinaktivierte Lact. 12h

Histologische Bilder (3. Hautlieferung):



Abbildung 83: Histologisches Bild:
LTA (Staph. aureus) 12h + SC5314 12h



Abbildung 84: Histologisches Bild:
LTA (Staph. aureus) 12h + SC5314 12h



Abbildung 85: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA (Staph. aureus) 12h



Abbildung 86: Histologisches Bild:
SC5314 12h + LTA (Staph. aureus) 12h

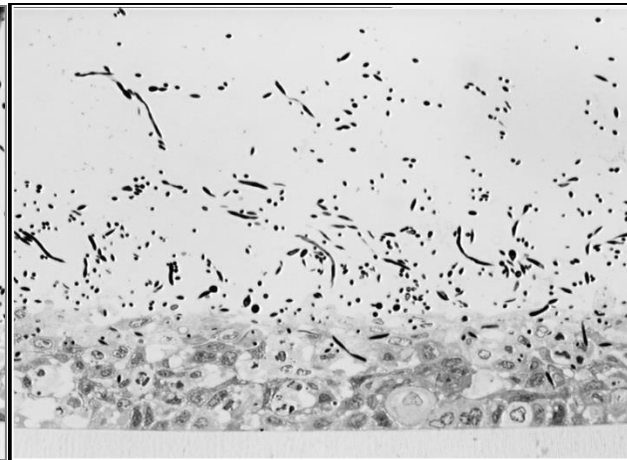


Abbildung 87: Histologisches Bild:
SC5314 12h + EPS 12h

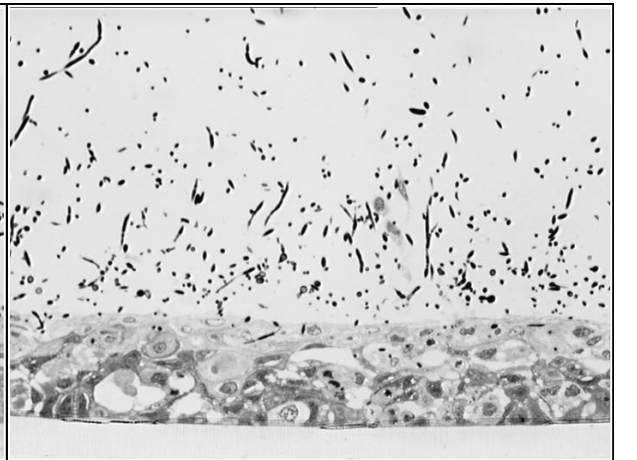


Abbildung 88: Histologisches Bild:
SC5314 12h + EPS 12h

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau der grampositiven Zellwand..... | 14 |
| Abbildung 2: Denaturierung der DNA (modifiziert nach 105). | 30 |
| Abbildung 3: Hybridisierung der DNA (modifiziert nach 105). | 30 |
| Abbildung 4: DNA-Synthese (modifiziert nach 105)..... | 30 |
| Abbildung 5: Beginn der Amplifikation (modifiziert nach 106)..... | 32 |
| Abbildung 6: Anlagerung der Primer (modifiziert nach 106). | 32 |
| Abbildung 7: Elongation: Anbinden von zunehmend mehr Fluoreszenzfarbstoffmoleküle an die neu-synthetisierte DNA (modifiziert nach 106). | 32 |
| Abbildung 8: Graphische Darstellung der Kinetik der PCR..... | 34 |
| Abbildung 9: Schmelzkurven der dsDNA | 35 |
| Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate nach PCR mit <i>SYBR[®] Green I</i> | 37 |
| Abbildung 11: Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate nach PCR mit <i>SYBR[®] Green I</i> mit störender doppelsträngiger DNA. | 38 |
| Abbildung 12: Histologisches Bild: 24 Stunden mit PBS als Kontrollsubstanz inkubiertes, nicht infiziertes, rekonstituierten Vaginalepithels; x 400..... | 46 |
| Abbildung 13: Histologisches Bild: 12 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 infiziertes RHVE; x 400. | 47 |
| Abbildung 14: Histologisches Bild: 24 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 infiziertes RHVE; x 400. | 48 |
| Abbildung 15: Histologisches Bild: 12 Stunden mit hitzeinaktivierten <i>LGG</i> vorinkub. und anschließend mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 infiziertes RHVE; x 400 | 49 |
| Abbildung 16: Histologisches Bild: 12 Stunden mit Zellwandfragmenten von <i>LGG</i> vorinkubiertes, anschließend mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 infiziertes RHVE; x 400. | 50 |
| Abbildung 17: Histologisches Bild: 12 Stunden mit PGN von <i>LGG</i> vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400..... | 51 |
| Abbildung 18: Histologisches Bild: 12 Stunden mit LTA von <i>LGG</i> vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400. ... | 52 |
| Abbildung 19: Histologisches Bild: 12 Stunden mit LTA von <i>Staphylococcus aureus</i> vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400. | 53 |
| Abbildung 20: Histologisches Bild: 12 Stunden mit säurebeh. <i>LGG</i> vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400..... | 54 |

- Abbildung 21:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit PGN und LTA von *LGG* vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400. 55
- Abbildung 22:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit Exopolysaccharid von *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 (TMWI.392) vorinkubiertes, anschließend für 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 inkubiertes RHVE; x 400..... 56
- Abbildung 23:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit hitzeinaktivierten *LGG* behandeltes RHVE; x 400. 58
- Abbildung 24:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit Zellwandfragmenten von *LGG* behandeltes RHVE; x 400..... 59
- Abbildung 25:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit PGN von *LGG* behandelten RHVE; x 400..... 60
- Abbildung 26:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit LTA von *LGG* behandeltes RHVE; x 400. 61
- Abbildung 27:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit LTA von *Staphylococcus aureus* behandeltes RHVE; x 400. 62
- Abbildung 28:** Histologisches Bild eines 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit säurebehandelten *LGG* inkubiertes RHVE; x 400. 63
- Abbildung 29:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend für 12 Stunden mit PGN und LTA von *LGG* behandeltes RHVE; x 400. 64
- Abbildung 30:** Histologisches Bild: 12 Stunden mit *C. albicans* infiziertes, anschließend mit Exopolysaccharid von *L. sanfranciscensis* behandeltes RHVE; x 400. 65
- Abbildung 31:** Relative mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-8 und GM-CSF in nicht infizierter rekonstruierter Vaginalschleimhaut und nach 12- bzw 24-stündiger Inkubation mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314..... 67
- Abbildung 32:** Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit hitzeinaktivierten *LGG* vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten, anschließend mit *C. albicans* infizierten Schleimhautprobe. 69
- Abbildung 33:** Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit Zellwandfragmenten von *LGG* vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten und ebenfalls anschließend infizierten Schleimhautprobe. 70
- Abbildung 34:** Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit Peptidoglycanen von *LGG* vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten und ebenfalls anschließend infizierten Schleimhautprobe. 71

| | |
|---|----|
| Abbildung 35: Relative mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit Lipoteichonsäure von <i>LGG</i> vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten, anschließend infizierten Schleimhautprobe. | 72 |
| Abbildung 36: Relative mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit Lipoteichonsäure von <i>S. aureus</i> vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten, anschließend infizierten Schleimhautprobe. | 72 |
| Abbildung 37: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit LTA-freien <i>LGG</i> vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten, anschließend infizierten Schleimhautprobe. | 73 |
| Abbildung 38: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit LTA und PGN von <i>LGG</i> vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten und ebenfalls anschließend infizierten Schleimhautprobe. | 74 |
| Abbildung 39: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit dem Exopolysaccharid von <i>L. sanfranciscensis</i> vorinkubierten im Vergleich zu der mit PBS vorinkubierten und ebenfalls anschließend infizierten Schleimhautprobe. ... | 75 |
| Abbildung 40: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten, anschließend mit Exopolysaccharid von <i>L. sanfranciscensis</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 76 |
| Abbildung 41: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit hitzeinaktivierten <i>LGG</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 77 |
| Abbildung 42: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit LTA von <i>S. aureus</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 78 |
| Abbildung 43: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit LTA von <i>LGG</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 78 |
| Abbildung 44: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit Zellwandfragmenten von <i>LGG</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 79 |
| Abbildung 45: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit LTA und PGN von <i>LGG</i> behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 80 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 46: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit LTA-freien LGG behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 80 |
| Abbildung 47: Relative mRNA-Expression von GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der mit <i>C. albicans</i> infizierten und anschließend mit PGN von LGG behandelten im Vergleich zu der mit PBS behandelten infizierten Epithelprobe. | 81 |
| Abbildung 48: LDH-Werte einer 24 Stunden mit PBS, 12 Stunden und 24 Stunden mit <i>C. albicans</i> inkubierten Schleimhautprobe. | 83 |
| Abbildung 49: LDH-Konzentration der Schleimhautproben nach Vorinkubation mit den versch. Testsubstanzen bzw. mit PBS und anschließender Infektion mit <i>C. albicans</i> | 84 |
| Abbildung 50: LDH-Konzentration der mit <i>C. albicans</i> infizierten, anschließend mit den versch. Testsubstanzen bzw. PBS behandelten Schleimhautproben. | 85 |
| Abbildung 51: Histologisches Bild: RHVE, 24 Stunden Inkubation mit PBS..... | 99 |
| Abbildung 52: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit PBS, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 99 |
| Abbildung 53: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit EPS, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 99 |
| Abbildung 54: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit Zellwandfragmenten von LGG und anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314..... | 99 |
| Abbildung 55: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA+PGN, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 99 |
| Abbildung 56: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit PGN, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 99 |
| Abbildung 57: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 100 |
| Abbildung 58: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit säurebeh. LGG, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 100 |
| Abbildung 59: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit hitzeinaktivierte LGG, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 100 |
| Abbildung 60: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit PBS | 100 |
| Abbildung 61: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit Zellwandfragm. von LGG | 100 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 62: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA+PGN | 100 |
| Abbildung 63: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit PGN | 101 |
| Abbildung 64: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA | 101 |
| Abbildung 65: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit säurebeh. LGG..... | 101 |
| Abbildung 66: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit hitzeinaktivierte LGG | 101 |
| Abbildung 67: Histologisches Bild: RHVE, 24 Stunden Inkubation mit PBS..... | 102 |
| Abbildung 68: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit PBS, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 102 |
| Abbildung 69: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit EPS, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 102 |
| Abbildung 70: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit Zellwandfragmenten von LGG, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314..... | 102 |
| Abbildung 71: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA+PGN, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 102 |
| Abbildung 72: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit PGN, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 102 |
| Abbildung 73: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 103 |
| Abbildung 74: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit säurebeh. LGG, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 103 |
| Abbildung 75: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit hitzeinakt. LGG, anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 103 |
| Abbildung 76: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit PBS | 103 |
| Abbildung 77: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit Zellwandfragmenten von LGG..... | 103 |
| Abbildung 78: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA+PGN | 103 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 79: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit PGN | 104 |
| Abbildung 80: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA | 104 |
| Abbildung 81: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit säurebeh. LGG..... | 104 |
| Abbildung 82: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit hitzeinakt. LGG | 104 |
| Abbildung 83: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA von <i>Staph. aureus</i> , anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 105 |
| Abbildung 84: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit LTA von <i>Staph. aureus</i> , anschließend 12 Stunden Inkubation mit SC5314 | 105 |
| Abbildung 85: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA von <i>Staph. aureus</i> | 105 |
| Abbildung 86: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit LTA von <i>Staph. aureus</i> | 105 |
| Abbildung 87: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit EPS | 105 |
| Abbildung 88: Histologisches Bild: RHVE, 12 Stunden Inkubation mit SC5314, anschließend 12 Stunden Inkubation mit EPS | 105 |

9. TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten <i>Primer</i> | 38 |
| Tabelle 2: Amplifikationszeiten und <i>Annealing</i> -Temperaturen der einzelnen <i>Primer</i> | 39 |

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Goerke K, Valet A.** *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5. Auflage. München, Jena : Urban & Fischer, 2002.
2. **Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA.** Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun*. 1999, 67, S. 5170-5175.
3. **Antonio MAD, Hawes SE, Hillier SL.** The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*. 1999, Bd. 180, S. 1950-1956.
4. **Sonoda Y, Mukaida N, Wang J, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, Harada A, Inoue M, Matsushima K.** Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol*. 1998, Bd. 160, S. 6159-6165.
5. **Jung, EG.** *Dermatologie*. 257. Auflage. Stuttgart : Hippokrates Verlag, 1998.
6. **Odds, FC.** *Candida and Candidosis*. 2. Auflage. London : Baillière Tindall, 1988.
7. **Mendling W, Seebacher C.** Guideline vulvovaginal candidosis. *Mycoses*. 2003, Bd. 46, S. 365-369.
8. **Psychrembel.** *Klinisches Wörterbuch*. Berlin, New York : de Gruyter, 1997. S. 37-109.
9. **Nolting S, Fegeler K.** *Medizinische Mykologie*. 4. Auflage. Heidelberg, Berlin, New York : Springer, 1993. S. 61-101.
10. **Senet, JM.** Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 1997, 14, S. 6-13.
11. **Bluestein D, Rutledge C, Lumsden L.** Predicting the occurrence of antibiotic-induced candidal vaginitis. *Fam Pract Res J*. 1991, 11, S. 319-326.
12. **Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B.** Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis*. 2000, 181, S. 1441-1446.
13. **Blaschke-Hellmesse, R.** Standorte für *Candida* aus medizinisch-hygienischer Sicht. *mycoses*. 1999, 42(Suppl.1), S. 22-29.
14. **Deutsche Gesellschaft für Gynaäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Arbeitsgemeinschaft Infektionen und Infektionsimmunologie in Gynäkologie und Geburtshilfe (AGII).** Antimykotische Therapie der vaginalen Hefepilz-Kolonisation von Schwangeren zur Verhütung von Kandidamykosen beim Neugeborenen. *AWMF 015/042(S1)*.

[Online]

http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Leitlinien/g_03_02_02_antimykotische_therapie_vaginalen_schwangeren.pdf.

15. **Ghannoum MA, Radwan SS.** *Candida adherence to epithelial cells*. Boca Raton, Florida, USA : CRC-Verlag, 1990.
16. **Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR.** Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol.* 1998, 178, S. 203-211.
17. **Sobel, JD.** Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol.* 36, S. 153-165.
18. **Granger, SE.** The Aetiology and Pathogenesis of Vaginal Candidosis: An Update. *Br J Clin Pract.* 1992, 46, S. 258-259.
19. **Samra OM, Mancini DM, Wood E.** Vulvovaginitis. *eMedicine Journa.* 2002, 3(1), S. 1-11.
20. **Friese K, Mendling W.** Therapie der vaginalen Kandidose- oral vs lokal. *Gynäkologie.* 1996, 29 (3), S. 221-228.
21. **Medzhitov R, Janeway CA Jr.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997, Bd. 9, S. 4-9.
22. **Medzhitov R, Janeway C Jr.** Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000, Bd. 343, S. 338-344.
23. **Keller, R.** *Lehrbuch Immunologie und Immunpathologie.* 4. Auflage. Stuttgart : Thieme-Verlag, 1994.
24. **Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ.** Immunobiology: the immune system in health and disease. *Churchill Livingstone.* 2005.
25. **Medzhitov, R.** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001, 1(2), S. 135-145.
26. **Ibelgrafts, H.** COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, Version 24.7. [Online] <http://www.copewithcytokines.de/>.
27. **Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC.** Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol.* 2002, 118, S. 652 – 657.
28. **Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL Jr.** Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. *Med Mycol.* 2000, 38, S. 419 – 431.

29. **Murphy JW, Bistoni F, Deepe GS, Blackstock RA, Buchanan K, Ashman RB, Romani L, Mencacci A, Cenci E, Fè d'Ostiani C, Del Sero G, Calich VL, Kashino SS.** Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol.* 36(Suppl 1), S. 109-118.
30. **Romani, L.** Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leuk Biol.* 2000, 68, S. 175–179.
31. **Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB.** Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun.* 2000, 68, S. 5771–5777.
32. **De Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A.** Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2000, 68, S. 3297–3304.
33. **Fidel PL, Lynch ME, Sobel JD.** *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 1993, 61, S. 1990–1995.
34. —. *Candida*-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 1993, 61, S. 4202–4207.
35. **Saavedra M, Taylor B, Lukacs N, Fidel PL.** Local production of chemokines during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 1999, 67, S. 5820–5826.
36. **Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL.** Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. *Med Mycol.* 2000, 38, S. 419–431.
37. **Wormley FL, Chaiban J, Fidel PL.** Cell adhesion molecule and lymphocyte activation marker expression during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2001, 69, S. 5072–5079.
38. **Eversole LR, Reichart PA, Ficarra G, Schmidt-Westhausen A, Romagnoli P, Pimpinelli N.** Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997, 84(4), S. 372-380.
39. **Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran YP, Rashid A, Sohnle PG, Stevens DA, Tsuboi R.** Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med Mycol.* 1998, 36, S. 166-173.
40. **Schaller M, Mailhammer R, Korting HC.** Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis. *J Med Microbiol.* 2002, 51(8), S. 672-676.
41. **Stadnyk, A.** Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* 1994, 8, S. 1041–1047.

42. **Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S.** Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol.* 1990, 94,6 Suppl, S. 101–107.
43. **Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T.** Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int J Food Microbiol.* 1998, 44, S. 93-106.
44. **Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V.** Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Inf Dis.* 2003, 36, S. 775-780.
45. **Kolars JC, Lewitt MD, Aouji M and Savaiano DA.** Yoghurt – an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med.* 1984, 310, S. 1-3.
46. **Savaiano DA, AbouElAnouar A, Smith DE, Levitt MD () Lactose malabsorption from.** Lactose malabsorption from yoghurt, pasteurized yoghurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr.* 1984, 40, S. 1219-1223.
47. **Dewit O, Pochart P, Desjeux JF.** Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yoghurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. *Nutrition.* 1988, 4, S. 131-136.
48. **Heyman M, Ménard S.** Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* 2002, 59, S. 1151-1165.
49. **Gorbach SL, Chang TW, Goldin B.** Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet.* 1987, 2, S. 1519.
50. **Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R.** Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med.* 1990, 22, S. 57-59.
51. **Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW.** Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a *Lactobacillus* preparation. *Am J Hosp Pharm.* 1979, 36, S. 754-757.
52. **Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E, Salminen S.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy.* 2000, 30, S. 1604-1610.
53. **Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A.** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, 111, S. 389-395.

54. **Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001, 357, S. 1076-1079.
55. **Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E.** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003, 361, S. 1869-1871.
56. **Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pájaro C, Barberis L.** Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen Appl Microbiol*. 2008, 54(3), S. 141-148.
57. **Lepargneur J, Rousseau V.** Protective role of the Doderlein flora. *J Gynecol Obste. Biol Reprod*. 2002, 31, S. 485-494.
58. **Reid G, Burton J.** Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect*. 2002, 4, S. 319-324.
59. **Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G.** Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol*. 2002, 40, S. 2746-2749.
60. **Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT.** Ingestion of yoghurt containing Lactobacillus acidophilus as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann Intern Med*. 1992, 116, S. 353-357.
61. **Drutz, DJ.** Lactobacillus prophylaxis for Candida vaginitis. *Ann Intern Med*. 1992, 116, S. 419-420.
62. **Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB.** The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005, 13(2), S. 69-75.
63. **Williams AB, Yu C, Tashima K, Burgess J, Danvers K.** Evaluation of two self-care treatments for prevention of vaginal candidiasis in women with HIV. *J Assoc Nurses AIDS Care*. 2001, 12, S. 51-57.
64. **Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce AW.** Oral use of Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. fermentum RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003, 35(2), S. 131-134.
65. **Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B.** Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001, 30(1), S. 49-52.

66. **Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce AW.** Probiotic Lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001, 32(1), S. 37–41.
67. **Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C.** Adhesion of human probiotic Lactobacillus rhamnosus to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2008.
68. **Hilton E, Rindos P, Isenberg H.** Lactobacillus GG vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol.* 1995, 33, S. 1433.
69. **Martinez, RCR, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Candido RC, Ferreira JC, De Martinis ECP, Reid G.** Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14. *Lett Appl Microbiol.* 2009, 48, S. 269-274.
70. **Boris S, Barbes C.** Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbial Infection.* 2000, 4, S. 543-546.
71. **Young G, Krassner RI, Yudofsky PL.** Interactions of oral strains of Candida albicans and Lactobacilli. *J Bacteriol.* 1956, 75, S. 525-529.
72. **Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL.** Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Can J Microbiol.* 1988, 34, S. 344-351.
73. **Valore EV, Park CH, Igrati SL, Ganz T.** Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 187, S. 561-568.
74. **Vandenbergh, PA.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev.* 1993, 12, S. 221-238.
75. **Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DAM, Waltersdorff AM.** Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis.* 1991, 164, S. 94-100.
76. **Fitzsimmons N, Berry DR.** Inhibition of Candida albicans by Lactobacillus acidophilus: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios.* 1994, 80, S. 125-133.
77. **McGroarty, JA.** Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol.* 1993, 6, S. 251-264.
78. **Velraeds M, Van de Belt-Gritter B, Van der Mei H, Reid G, Busscher H.** Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeast and silicone rubber by Lactobacillus acidophilus biosurfactant. *J Med Microbiol.* 1998, 47(12), S. 1081-1085.

79. **Reid G, Heinemann C, Velraeds M, van der Mei HC, Busscher HJ.** Biosurfactants produced by *Lactobacillus*. *Methods Enzymol.* 1999, 310, S. 426-433.
80. **Gil NF, Martinez RCR, Gomes BC, Nomizo A, De Martinis ECP.** Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz J Microbiol.* 2010, 41(1), S. 6-14.
81. **Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, Hillier SL, Stamm WE.** Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J Infect Dis.* 1995, 171(5), S. 1237-1243.
82. **Sobel JD, Schneider J, Kaye D, Levison ME.** Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. *Infect Immun.* 1981, 32(1), S. 194-197.
83. **Mårdh P-A, Westrom L.** Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. *Infect Immun.* 1976, 13, S. 661-666.
84. **Boris S, Suarez JE, Vazquez F, Barbes C.** Adherence of human lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun.* 1998, 66, S. 1985-1989.
85. *Einfluss unterschiedlicher Laktobazillus-Arten auf die experimentelle Vaginalkandidose durch C. albicans.* **Schulz, W-G.** Ludwig-Maximilian-Universität, München : s.n., 2008, Bd. Dissertation.
86. **Conway PL, Kjelleberg S.** Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J Gen Microbiol.* 1989, 135, S. 1175-1186.
87. **Henriksson A, Szewzyk R, Conway PL.** Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl Environ Microbiol.* 1991, 57, S. 499-502.
88. **Wadström, T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B.** Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Microbiol.* 1987, 62, S. 513-520.
89. **Chan RC Y, Reid G, Irvin RT, Bruce AW, Costerton JW.** Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect Immun.* 1985, 47, S. 84-89.
90. **Brooker BE, Fuller R.** Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. *J Ultrastruct Res.* 1975, 52, S. 21-31.
91. **Fuller, R.** Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J Gen Microbiol.* 1975, 87, S. 245-250.
92. **Gorbach, SL.** The discovery of *Lactobacillus GG*. *Nutrition Today.* 1996, 31, Suppl 6, S. 2-4.
93. **Gorbach SL, Goldin BR.** *Lactobacillus strains and methods of selection.* 4839281 US Pat, 1989.

94. **Dubach, A.** Wissenschaftliche Übersicht über Lactobacillus GG. [Online] 2002. http://www.emmi.ch/fileadmin/user_upload/emmi_ch/molkereiprodukte/pdf/functional_products/Emmi_LGG_Uebersicht.pdf.
95. **Reid, G.** The scientific bases for probiotic strains of Lactobacillus. *Appl Environ Microbiol.* 1999, 65(9), S. 3763-3766.
96. **Bierbaum G, Sahl H-G.** Induction of autolysis of Staphylococcus simulans 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. [Buchverf.] Sahl H-G Jung G. *Nisin and novel antibiotics*. Leiden : ESCOM, 1991, S. 386-396.
97. **Fischer W, Rosel P, Koch HU.** Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* 1981, 146, S. 467– 475.
98. **Archibald AR, Baddiley J, Heptinstall S.** The alanine ester content and magnesium binding capacity of walls of Staphylococcus aureus H grown at different pH values. *Biochim Biophys Acta.* 1973, 291, S. 629–634.
99. **Heptinstall S, Archibald A R, Baddiley J.** Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature.* 1970, 225, S. 519–521.
100. **Hughes AH, Hancock IC, Baddiley J.** The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem J.* 1973, 132, S. 83–93.
101. **Lambert PA, Hancock IC, Baddiley J.** Influence of alanyl ester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acid. *Biochem J.* 1975, 151, S. 671–676.
102. **Ou L-T, Marquis RE.** Electromechanical interactions in cell walls of gram-positive cocci. *J Bacteriol.* 1970, 101, S. 92–101.
103. **Reuter, P.** *Springer Lexikon Medizin*. Berlin : Springer Verlag, 2004.
104. **Pum D, Neubauer A, Gyoervary E, Sára M, Sleytr UB.** S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit. *Nanotechnology.* 11, 2000, 2.
105. **Roberts, IS.** The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1996, 50, S. 285–315.
106. **Kleerebezem M, van Kranenburg, R, Tuinier R, Boels I C, Zoon P, Looijesteijn E, Hugenholtz J, de Vos WM.** Exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie van Leeuwenhoek.* 1999, 76, S. 357-365.
107. **Sutherland, IW.** Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, S. 41–46.

108. **de Vuyst L, de Vin F und Vaningelgem F, Degeest B.** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001, 11(9), S. 687-707.
109. **Lin TY, Chang Chien M-F.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*. 2007, 100(4), S. 1419-1423.
110. **Roberts CM, Fett WF, Osman SF, Wijey C, O'Connor JV, Hoover DG.** Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *J Appl Bact*. 1995, 78, S. 463-468.
111. **Cerning, J.** Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1990, 87, S. 113–130.
112. **Nakajima H, Suzuki Y, Kaizu H, Hirota T.** Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J Food Sci*. 1992, 57, S. 1327–1329.
113. **Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori T.** Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol Pharm Bull*. 1994, 17, S. 1012–1017.
114. **Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P.** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 2002, 12(2-3), S. 163-171.
115. **Oda M, Hasegawa H, Komatsu S, Kambe M, Tsuchiya F.** Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agric Biol Chem*. 1983, 47, S. 1623–1625.
116. **Kitazawa H, Toba T, Itoh T, Kumano N, Adachi S, Yamaguchi T.** Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, 'viili'. *Anim Sci Technol*. 1991, 62, S. 277–283.
117. **Champagne CP, Gardner NJ, Lacroix C.** Fermentation technologies for the production of exopolysaccharide-synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007, 10(2).
118. **Chabot S, Yu H-L, de Léséleuc L, Cloutier D, Van Calsteren M-R, Lessard M, Roy D, Lacroix M, Oth D.** Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes. *Lait*. 2001, 81, S. 683–687.
119. **dal Bello F, Walter J, Hertel C, Hammes WP.** In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001, 24, S. 232-237.

120. **Korakli M, Gänzle MG, Vogel RF.** Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, 92, S. 958-965.
121. **McFarland, J.** The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 1907, Bde. 49: 1176-1178.
122. **Korakli, M.** *Sucrose metabolism and exopolysaccharide production by Lactobacillus sanfranciscensis*. München, Technische Universität : Dissertation, 2002.
123. **Luft, JH.** Epoxy resins. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961, Bde. 9: 409-414.
124. **Roche, Diagnostics Gmbh.** [Online] 2009. www.roche.de/diagnostics/infektionsdiagnostik/pcr_funktionsweise.htm.2009.
125. **Roche.** *LightCycler Operator's Manual*. Mannheim : Roche Molecular Biochemicals, 2000.
126. **Wroblewski F, John LS.** Lactic dehydrogenase activity in blood. *Exp Biol Med.* 1955, 90, S. 210-213.
127. **Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30, No. 9, 2002.
128. **Chan RCY, Bruce AW, Reid G.** Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microflora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of Gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *J Urol.* 1984, 131, S. 596–601.
129. **Spencer RJ, Chesson A.** The effect of *Lactobacillus* ssp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol.* 1994, 77, S. 215-220.
130. **Reid G, Cook R, Bruce A.** Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. *J Urol.* 1987, 138, S. 330–335.
131. **Reid, G.** In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J.* 2000, 10, S. 415–419.
132. **Osset J, Bartolome' RM, Garcia E, Andreu A.** Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis.* 2001, 183, S. 485–491.
133. **Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U, Matteuzzi D.** Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol.* 2002, 93, S. 884–893.

134. **Lee, Y.** Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiol Lett.* 2005, 250, S. 157–162.
135. **Reid G, Tieszer C, Lam D.** Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Ind Microbiol.* 1995, 15, S. 248-253.
136. **Jotwani R, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka K, Kato N, Ueno K.** Cytokine stimulation during *Salmonella typhimurium* sepsis in *Itys* mice. *J Med Microbiol.* 1995, 42, S. 348-352.
137. **Cotter G, Kavanagh K.** Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci.* 2000, 57, S. 241-249.
138. **Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W.** Mechanism of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun.* 1993, 61, S. 4560-4568.
139. **Cheon IS, Woo SS, Kang SS, Im J, Yun CH, Chung DK, Park DK, Han SH.** Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. *Mol Immunol.* 2008, 45(6), S. 1665-1673.
140. **Kumar A, Zhang J, Yu F-S X.** Innate immune response of corneal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection: Role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004, 45(10), S. 3513-3522.
141. **Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, Dobozy A, Kemeny L.** Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human β -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes and Infection.* 2005, 7, S. 1117-1127.
142. **Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y.** Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003, 10, S. 259–266.
143. **Simpson WA, Dale JB, Beachey EH.** Cytotoxicity of the glycolipid region of streptococcal lipoteichoic acid for cultures of human heart cells. *J Lab Clin Med.* 1982, 99(1), S. 118-126.
144. **Jiang-Shieh YF, Yeh KY, Wei IH, Chang CY, Chien HF, Tsai RY, Chang ML, Lee AW, Pai MH, Wu CH.** Responses of microglia in vitro to the gram-positive bacterial component, lipoteichoic acid. *J Neurosci Res.* 2005, 82(4), S. 515-524.

145. **Nell MJ, Grote JJ.** Effects of bacterial toxins on air-exposed cultured human respiratory sinus epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003, 112(5), S. 461-468.
146. **Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W.** Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1991, 59(12), S. 4614-4620.
147. **Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T.** Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations. *Infect Immun.* 2002, 70, S. 938-944.
148. **Morath S, Geyer A, Hartung T.** Structure–function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med.* 2001, 193, S. 393–397.
149. **Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, Van Otteren GM, Strieter RM.** Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun.* 1994, 62(1), S. 119-125.
150. **Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C.** Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med.* 1998, 188, S. 305-315.
151. **Middelveld RJ, Alving K.** Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock.* 2000, 13, S. 297-306.
152. **Thiemermann, C.** Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: a structural and functional analysis. *Microbes Infect.* 2002, 4(9), S. 927-935.
153. **De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR.** The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92(22), S. 10359-10363.
154. **Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, Van Dijk H.** Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993, 7, S. 281-287.
155. **Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J.** *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2002, 68(9), S. 4322-4327.
156. **Schaller M, Hube B.** *Candida albicans*-Infektionsmodelle. *BIOforum.* 2004, 11, S. 2–3.
157. **Lee, YK.** *Handbook of probiotics.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 1999.

158. **Gibson, GR, Roberfroid MB.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, S. 1401-1412.
159. **Prevention, Centers for Disease Control and.** *Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases.* (1998). MMWR 47 (no. RR-1).
160. **Shimp, LA.** Vaginal and Vulvovaginal disorders. [Buchverf.] Allen LV et al. [Hrsg.] American Pharmaceutical Association. *Handbook of Nonprescription Drugs.* 12. Auflage. Washington D.C. : s.n., 2000, S. 117-132.
161. **Schrezenmeier J, de Vrese M.** Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Br J Nutr.* 2002, 88,Suppl 1, S. 59–66.
162. **Hosono A, Lee J, Ametani A, Natsume M, Hirayama M, Adachi T, Kaminogawa S.** Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997, 61, S. 312–316.
163. **Korakli M, Pavlovic M, Ganzle M, Vogel RF.** Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003, 69(4), S. 2073-2079.
164. **Science, Roche Applied.** *Technical Note No. LC13/2001.* Mannheim : s.n., 2001.
165. **Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS.** Advances in the Management of Sepsis and the Understanding of Key Immunologic Defects. *Anesthesiology.* 2011, Bde. 115:1349–62.
166. **Thomas, L.** Germs. *N Engl J Med.* 1972, Bde. 287:553–5.

11. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Plewig und Herrn Prof. Dr. med. T. Ruzicka für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu promovieren.

Frau Priv.-Doz. Dr. Borelli sei herzlich gedankt für die engagierte Übernahme und Fortführung der Betreuung sowie die Korrektur meiner Arbeit.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med H. C. Korting für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung und die konstruktive Durchsicht der Manuskripte.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Johanna Laude und Frau Andrea Kieslinger aus der Elektronenmikroskopie für die Einarbeitung in die Labortechniken, die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte, bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Maher Korakli und den Labormitarbeitern in Weihenstephan für die Ermöglichung der Zusammenarbeit sowie die Einweisung in die mikrobiologischen und biochemischen Arbeitstechniken danken

12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |
| Å | Angström; 1 Å = 0,1 nm = 10 ⁻¹⁰ m |
| cDNA | Complementary desoxyribonucleid acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) |
| cm | Zentimeter |
| CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| dNTP`s | Desoxynukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EPS | Exopolysaccharide |
| g | mittlere Erdschwerebeschleunigung (Maß der Beschleunigung) |
| g | Gramm |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Zytokin) |
| H | Wasserstoff |
| HCl | Hydrochlorid (Salzsäure) |
| H₂SO₄ | Schwefelsäure |
| IL-1α | Interleukin-1α (Zytokin) |
| IL-1β | Interleukin-1β (Zytokin) |
| IL-6 | Interleukin-6 (Zytokin) |
| IL-8 | Interleukin-8 (Zytokin) |
| kDa | Kilodalton |
| LDH | Laktatdehydrogenase (Enzym) |
| LGG | <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| mg | Milligramm |
| MgCl₂ | Magnesiumchlorid |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |

| | |
|--------------------------------|--|
| mRNA | Messenger ribonucleid acid (<i>messenger</i> Ribonukleinsäure) |
| MRS-Agar | Medium nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Farbstoff) |
| MWCO | <i>molecular weight cut off</i> |
| N | Normalität |
| NaCl | Natriumchlorid (Kochsalz) |
| NADH | reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid |
| NaOH | Natronlauge |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| OH | Hydroxygruppe |
| OsO₄ | Osmiumtetroxid |
| PAMPs | Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>) |
| PBS | Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| pH | Potenz und Maß für die Wasserstoffionenkonzentration |
| PRR | Mustererkennungsrezeptoren (engl. <i>Pattern recognition receptors</i>) |
| RHVE | Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel |
| RNA | Ribonucleid acid (Ribonukleinsäure) |
| RNAse | Ribonuclease |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , |
| S-Layer | <i>surface-layer</i> |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| Th | T-Helfer (engl. <i>T-helper</i>) |
| TNF-α | Tumor-Nekrose-Faktor α |
| TRIS | Trihydroxymethylaminomethan |
| YPD | Yeast, Peptone, Dextrose |