

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München

**Immunmodulatorische Aktivität von Überständen
probiotischer Bakterien und dem darin enthaltenen
D-Tryptophan**

Ingeborg Kepert

Immunmodulatorische Aktivität von Überständen probiotischer Bakterien und dem darin enthaltenen D-Tryptophan

Ingeborg Kepert

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Comprehensive Pneumology Center,
„Developmental Immune Biology of the Lung“
&
Klinische Kooperationsgruppe
Dr. von Haunersches Kinderspital

HelmholtzZentrum münchen
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dezember 2014

1. Gutachter: **Prof. Dr. Anton Hartmann**
2. Gutachter: **Prof. Dr. Elisabeth Weiß**

Eingereicht am: 23.12.2014
Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2015

1. EINLEITUNG.....	8
1.1. Atopische Erkrankungen und Allergien	8
1.1.1. Definition, Verbreitung und Therapie	8
1.1.2. Hygiene-Hypothese	10
1.1.1. Die intestinale Mikrobiota und ihre Rolle bei der Entstehung atopischer Erkrankungen	11
1.1.3. Kommensale Bakterien: Interaktionen mit dem Wirt	14
1.1.4. Die Immunologie atopischer Erkrankungen.....	17
1.2. Probiotika.....	18
1.2.1. Die Definition “Probiotika” im Wandel der Zeit	19
1.2.2. Mögliche Wirkmechanismen von Probiotika	21
1.2.3. Welche probiotischen Stämme werden verwendet?.....	22
1.2.3.1. Die Gattung <i>Bifidobacterium</i>	23
1.2.3.2. Die Gattung <i>Lactobacillus</i>	24
1.2.3.3. Die Gattung <i>Lactococcus</i>	25
1.3. Zielsetzung	26
1.4. Konzept der praktischen Durchführung.....	27
2. MATERIAL und METHODEN.....	29
2.1. Verwendete Mikroorganismen.....	29
2.2. Verwendete bakterielle Signalmoleküle	30
2.3. Kultivierung von humanen Primärzellen und Zelllinien.....	30
2.3.1. Verwendete Zellen.....	31
2.3.2. Kultivierungsmedium	31
2.3.3. Seren	32
2.3.4. Chemikalien und Reagenzien	32
2.3.5. Herstellung von Medien und Puffern	34
2.3.6. Lösungen für das Durchflusszytometer FACS Canto II und den Luminex xMap	34
2.3.7. Kommerzielle Kits	35
2.3.8. Kulturgefäße	35
2.3.9. Verwendete Stimulantien und Antikörper	35
2.3.9.1. Zytokine	35
2.3.9.2. LPS zur Reifung von DZ	36
2.3.9.3. Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
2.3.9.4. Kryokonservierung von Zelllinien	36
2.3.9.5. Auftauen von Zelllinien	37
2.3.9.6. Zellzählung.....	37
2.3.9.7. Blutspender	38
2.3.9.8. Isolation von polymorphnukleären Leukozyten (PMN).....	38
2.3.9.9. Isolation von humanen PBMZ zur Generierung von DZ.....	38
2.3.9.10. Isolation von Monozyten	39
2.3.9.11. Differenzierung der Monozyten in immature DZ (iDZ).....	39
2.3.9.12. Reifung der iDZ mit LPS	40
2.3.10. Screening Systeme für immunmodulatorische Aktivität probiotischer Komponenten.	41
2.3.10.1. KM-H2 und L-428 Zellen.....	41
2.3.10.2. Humane DZ.....	41
2.3.11. Probiotische Komponenten	42
2.3.11.1. Stimulation mit bakteriellen Signalpeptiden von probiotischen Stämmen.....	42
2.3.11.2. Stimulation mit probiotischen Überständen	42
2.3.11.3. Stimulation mit probiotischen Fraktionen	42
2.3.12. Stimulation mit D-Aminosäuren	43
2.3.13. Durchflusszytometrie.....	44
2.3.13.1. Prinzip	44
2.3.13.2. Angewandte Durchflusszytometrie: DZ	46
2.3.13.3. Angewandte Durchflusszytometrie: Vitalitätstests.....	48
2.3.14. CCL17-ELISA	49
2.3.15. Zytokinquantifizierung.....	49
2.3.15.1. Zytokinquantifizierung mittels eines Bio-Plex Pro™ Assays	50
2.3.15.2. Zytokinquantifizierung mittels eines Milliplex Human Cytokine Assays.....	50

2.3.16.	Oligonukleotide.....	50
2.3.17.	RNA-Isolation.....	50
2.3.18.	RNA-Qualitätssicherung.....	51
2.3.19.	mRNA-Analyse.....	51
2.3.20.	Quantifizierung der mRNA-Menge mit RT-qPCR.....	51
2.3.21.	Statistische Auswertung.....	53
3.	ERGEBNISSE.....	54
3.1.	Etablierung geeigneter Screening Systeme.....	54
3.1.1.	Stimulation von humanen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit probiotischen Überständen	54
3.1.1.1.	CCL17 Sekretion von humanen L-428 und KM-H2 Zellen.....	54
3.1.1.1.1.	Einfluss probiotischer Überstände auf die CCL17-Sekretion von KM-H2-Zellen.....	55
3.1.1.1.2.	Vitalität der KM-H2 Zellen unter Stimulation mit probiotischen Überständen.....	62
3.1.2.	Stimulation humaner DZ mit probiotischen Überständen.....	63
3.1.2.1.	Ko-Stimulation der iDZ mit LPS und probiotischen Überständen.....	63
3.1.2.1.1.	Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ.....	63
3.1.2.1.2.	MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ.....	70
3.1.2.1.3.	Vitalität nach Ko-Stimulation mit LPS und probiotischen Überständen.....	73
3.1.2.2.	Stimulation ausgereifter DZ mit probiotischen Überständen.....	74
3.1.2.2.1.	Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ.....	74
3.1.2.2.2.	MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ.....	77
3.1.2.2.3.	Vitalität der ausgereiften DZ nach Stimulation mit probiotischen Überständen.....	79
3.1.3.	Zusammenfassung: Etablierung geeigneter Screening Systeme.....	81
3.2.	Anwendung der Screening Systeme: Winclove Bioindustries BV.....	81
3.2.1.	Screening von <i>Lactobacillus</i> spp.....	81
3.2.2.	Screening von <i>Bifidobacterium</i> spp.....	82
3.2.3.	Screening von <i>Enterococcus</i> sp., <i>Lactococcus</i> spp. und <i>Streptococcus</i> sp.....	83
3.2.4.	Zusammenfassung des Winclove Bioindustries BV Screenings.....	84
3.3.	Identifizierung immunaktiver sezernierter Substanzen in den bakteriellen Überständen	86
3.3.1.	Pilotversuche: Screening von bakteriellen Signalpeptiden.....	86
3.3.1.1.	<i>Bacillus subtilis</i> : CSF, ComX.....	86
3.3.1.2.	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12: p(CHWPR).....	89
3.3.1.3.	Vitalität der KM-H2 nach Stimulation mit den Quorum sensing Molekülen.....	91
3.3.2.	Strategie zur Identifizierung immunaktiver Substanzen in den probiotischen Überständen	94
3.3.3.	Semi-präparative Chromatographie ausgewählter Überstände.....	94
3.3.4.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie UPLC der aktiven Fraktionen.....	96
3.3.4.1.	MeOH-Fractionen: UPLC-PDA Chromatogramme und Rücktest der Subfraktionen.....	96
3.3.4.2.	UPLC-UV-Massenspektrometrie.....	100
3.3.5.	Kernspinresonanz-Spektroskopie NMR.....	102
3.3.6.	D-/L-Tryptophan: Enantiomeren-Separation und Chiralitätstest.....	103
3.3.7.	Screening von D-Aminosäure-Standards.....	104
3.4.	Molekulare Mechanismen.....	105
3.4.1.	Zytokinprofil von DZ induziert von probiotischen Überständen und D-Tryptophan ...	105
3.4.2.	Vorversuche zur Überprüfung von Kandidatenrezeptoren für D-Tryptophan: Ahr und GPR109b.....	108
4.	DISKUSSION.....	111
4.1.	Screening-Systeme.....	111
4.1.1.	CCL17-Sekretion von KM-H2 Zellen.....	111
4.1.2.	Kostimulatorische Oberflächenmarker auf DZ.....	113
4.1.3.	Zusammenfassung DZ- System und KM-H2-System.....	116
4.2.	D-Aminosäuren.....	116
4.3.	Mögliche Mechanismen probiotischer Aktivität.....	117
4.3.1.	Zytokine.....	118
4.3.2.	Kandidatenrezeptoren für D-Tryptophan.....	119

4.4. Ausblick.....	121
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	123
6. ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN	127
7. LITERATURVERZEICHNIS	156
8. ANHANG	170
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	170
8.2. Tabellenverzeichnis	174
8.3. Abbildungsverzeichnis	175
8.4. Kooperationsdaten	181
8.5. Publikation	187
8.6. Vorträge	187
8.7. Poster	187
8.8. Danksagung.....	189
8.9. Erklärung.....	191
8.10. Lebenslauf.....	192

1. EINLEITUNG

1.1. Atopische Erkrankungen und Allergien

1.1.1. Definition, Verbreitung und Therapie

Der Begriff “Allergie” stammt von den griechischen Wörtern *allos*, was soviel bedeutet wie “anders” und *ergon*, was mit “Reaktion” übersetzt werden kann. Er wurde 1906 zum ersten Mal von dem österreichischen Wissenschaftler und Kinderarzt Clemens Peter Freiherr von Pirquet (1874-1929) eingeführt, um eine hypersensible Reaktion auf eine Pockenimpfung zu beschreiben. Er definierte den Begriff Allergie ursprünglich als “eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren”. Das ist eine sehr allgemeine Definition, die alle Immunreaktionen einschließt. Heute definiert man Allergie in einem viel engeren Sinn. Allergische Reaktionen treten auf, wenn ein Individuum, das nach dem Kontakt mit einem eigentlich harmlosen Antigen IgE-Antikörper produziert hat, erneut mit demselben Allergen in Berührung kommt [1]. Das Allergen aktiviert IgE-bindende Immunzellen im betroffenen Gewebe, die eine für die Allergie charakteristische Reaktionskette auslösen. Die Allergie gehört zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Darunter versteht man nachteilige Immunreaktionen, die Gewebeschäden hervorrufen und zu ernsthaften Erkrankungen führen können [2]. Eine familiäre oder individuelle Prädisposition für die Entwicklung einer Sensibilisierung und der Produktion von IgE-Antikörper nach Kontakt mit einem Allergen nennt man Atopie [3]. Eine Atopie trägt möglicherweise zur Manifestierung der Erkrankung und deren Symptome wie Nahrungsmittelallergie, Ekzem und Asthma bei, welche man unter dem Begriff atopische Erkrankungen generell zusammenfasst.

Atopische Erkrankungen sind bei Kindern weit verbreitet und tragen beträchtlich zur Kindersterblichkeit bei. Man schätzt, dass 30% aller Kinder bis zu ihrem 18. Lebensjahr an atopischen Erkrankungen leiden [4], [5]. Dabei gibt es typische Zeitfenster für das Auftreten von unterschiedlichen atopischen Erkrankungen. Die Häufigkeit von (atopischem) Ekzem erreicht während der ersten zwei Lebensjahre ihren Höhepunkt. Im Schulalter wird Asthma zur häufigsten atopischen Erkrankung, während die allergische Rhinitis (Heuschnupfen) die häufigste allergische Manifestation im Jugendalter ist [6]. Diese Sequenz von früh auftretendem Ekzem, gefolgt von Asthma und sich dann anschließender Rhinitis bezeichnet man als den sogenannten “atopischen Marsch” [7], [8].

Die genaue Pathogenese von atopischen Erkrankungen ist noch unklar. Fest steht jedoch, dass atopische Erkrankungen eine klare familiäre Prädisposition zeigen und multifaktorielle Erkrankungen darstellen, bei denen Änderungen in zahlreichen Genen und viele Umweltfaktoren zu der Pathogenese beitragen [9]. Es konnten bereits einige Kandidatengene identifiziert werden, die in Verbindung mit allergischen Störungen stehen [10]. Die Mehrzahl dieser Gene ist in die Entwicklung des Immunsystems involviert [10].

Die Therapie von allergischen Erkrankungen besteht zur Zeit lediglich aus der Behandlung der auftretenden Symptome. Eine pharmakologische Intervention mit Antihistaminika und Glukocorticoiden bietet zwar eine beträchtliche Erleichterung [11], eine dauerhafte Heilung der wird aber nicht erreicht. Zusätzlich wird eine Vermeidung von Risikofaktoren, welche die Krankheit möglicherweise verursachen oder erschweren, empfohlen [12]. Ein gravierender, heutzutage bekannter Risikofaktor ist prä- und postnatales Passivrauchen [13]. Darüber hinaus kann Stillen das Risiko und die Schwere einer späteren Erkrankung senken [14].

Die Häufigkeit chronischer Erkrankungen des Immunsystems wie Atopien und Allergien bzw. deren assoziierter klinischer Symptome wie Ekzem und Asthma, hat in den letzten Jahren stark zugenommen und in den kommenden Jahrzehnten wird sogar noch eine weitere Zunahme der Belastung durch solche nicht-infektiösen Krankheiten erwartet (World health statistics 2008. ISBN 978 92 4 156359 8; ISBN 978 92 4 0682740; elektronische Version). Dieses Phänomen ist hauptsächlich in Ländern mit einem westlichen Lebensstil zu beobachten [15], [16]. Es scheint, dass es eine inverse Korrelation gibt zwischen dem vermehrten Auftreten von allergischer Sensibilisierung sowie asthmatischen Phänotypen und der Häufigkeit von Infektionskrankheiten [17], und eine positive Korrelation zu einer Verbesserung der Lebensbedingungen, zu der Industrialisierung und Urbanisierung [17]. Der Rückgang von Infektionskrankheiten lässt sich teilweise auf die Einführung von Impfprogrammen zurückführen, aber der genaue Grund für die zunehmende Häufigkeit von atopischen Erkrankungen ist noch unklar. Die Zeitspanne ist zu kurz, um dieses Phänomen mit genetischen Veränderungen zu erklären und deshalb scheint es wahrscheinlicher, dass Umweltfaktoren, die innerhalb von genetisch prädispositionierten Individuen operieren, für die zunehmende Häufigkeit von atopischen Erkrankungen verantwortlich sind.

1.1.2. Hygiene-Hypothese

Die sogenannte Hygiene-Hypothese besagt, dass das Zunehmen von atopischen Erkrankungen auf einen verringerten Kontakt mit Mikroben oder mikrobiellen Produkten während der frühen Kindheit zurückzuführen ist. Das Konzept der Hygiene-Hypothese wurde zum ersten Mal von David Strachan vorgeschlagen, der eine inverse Assoziation zwischen Heuschnupfen und der Kinderanzahl im Haushalt festgestellt hatte [18]. Er fand eine ähnliche Assoziation für das Auftreten von Ekzemen während des ersten Lebensjahres [18]. Von da an wurden zahlreiche epidemiologische Studien veröffentlicht, die die Hygiene-Hypothese unterstützen. Sowohl von spezifischen infektiösen Erregern als auch von einer allgemeinen mikrobiellen Belastung wurde behauptet, dass sie vor der Entwicklung einer allergischen Erkrankung schützen: Masern [19], Hepatitis A [20], eine *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion und BCG-Impfung [21], [22], Helminthen-Befall [23], andere Parasiten [24] und eine *Helicobacter pylori*-Infektion [25] wurden alle mit dem Schutz vor atopischen Erkrankungen assoziiert. Umweltfaktoren, welche eine Veränderung der mikrobiellen Last und des Kontaktes zu mikrobiellen Erregern widerspiegeln, wurden auch mit dem Überhandnehmen von atopischen Erkrankungen verbunden. So zeigten sowohl eine größere Familie [26], [27] als auch eine große Anzahl an Besuchern [27], [28] eine inverse Beziehung mit dem Auftreten von atopischen Erkrankungen. Als der zugrundeliegende Mechanismus wurde ein erhöhter Kontakt zu Infektionskrankheiten aufgrund von zahlreichen Kind-Kind-Kontakten angesehen. Die Häufigkeit von atopischen Erkrankungen war nämlich im besonderen bei Kindern verringert, die mindestens eine Infektion der oberen Luftwege vor der Vollendung des ersten Lebensjahres durchgemacht haben [29]. Das betont nicht nur die Wichtigkeit des Kontaktes zu mikrobiellen Produkten, sondern auch die des Zeitpunktes. Darüber hinaus schützt das Leben auf einem Bauernhof mit zahlreichen potentiellen Infektionsquellen vor der Entwicklung einer atopischen Erkrankung [30]. Kinder, die mit in die Ställe genommen wurden oder die regelmäßig nicht-pasteurisierte Milch getrunken haben, hatten ein substantiell verringertes Risiko einer atopischen Erkrankung [31]. Wieder ist der Zeitpunkt entscheidend: dieser protektive Effekt trat hauptsächlich nur dann auf, wenn das Kind das erste Lebensjahr auf einem Bauernhof verbracht hat. Lebte das Kind erst ab einem späteren Zeitpunkt in ländlicher Umgebung, so konnte dieser Effekt nicht gefunden werden [32]. Desweiteren hatte der Kontakt der Mutter mit Tierställen während der Schwangerschaft auch einen protektiven Effekt auf ihre Nachkommen [32].

Zusammenfassend deuten diese Studien daraufhin, dass der frühzeitige Kontakt mit möglichst vielen ungefilterten Umweltreizen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des

Immunsystems und bei der Manifestation von atopischen Erkrankungen spielt [33], [34]. Das Zeitfenster, in dem die Manifestation von atopischen Erkrankungen noch beeinflusst werden kann, lässt sich mit den heutigen Kenntnissen noch nicht genau definieren, es liegt aber wahrscheinlich in der sehr frühen Kindheit.

1.1.1. Die intestinale Mikrobiota und ihre Rolle bei der Entstehung atopischer Erkrankungen

Die menschliche Darmmikrobiota setzt sich im Erwachsenenalter aus geschätzten 10^{14} Mikroben zusammen, eine Anzahl, welche die Gesamtmenge an Körperzellen um den Faktor 10 übertrifft [35], [36], [37]. Dabei unterscheidet man ungefähr 1000 unterschiedliche Spezies und rund 7000 Stämme, von denen die Mehrheit vermutlich noch nie kultiviert wurde und viele noch neu zu entdecken sind [36]. Man unterscheidet zwischen einer autochthonen und einer allochthonen Mikrobiota. Die autochthonen Mikroben gehören zu der angesiedelten Bakterienpopulation, die in der Lage war, sich dauerhaft in der intestinalen Nische zu etablieren, während die allochthonen Mikroorganismen nur transiente Bewohner sind, die den Darm passieren [38].

In utero ist das fötale Intestinum noch steril und wird während der Geburt durch den Kontakt zu der Mikrobiota im mütterlichen Geburtskanal mit den ersten Mikroben besiedelt. Nach der Geburt ist das Intestinum rasch mit einer Vielzahl von Mikroorganismen kolonisiert [39]. Diese frühen Phasen der Besiedlung resultieren aus zufälligen mikrobiellen Begegnungen mit opportunistischen frühen Kolonisten wie *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterobacteria* [40]. Die Entwicklung der kindlichen intestinalen Mikrobiota ist in den ersten Tagen durch eine hohe interindividuelle Variabilität charakterisiert. Nach der ersten Woche hat sich dann eine schon etwas stabilere Mikrobiota etabliert [41], deren Zusammensetzung hauptsächlich von der Art und dem Zeitpunkt der Geburt, der Umwelt und der Ernährung abhängig ist [40], [42]. In gestillten Kindern wird die Mikrobiota schnell dominiert von Bifidobakterien, während in Kindern, die mit der Flaschen gefüttert werden, diese Anzahl bis zu 10-fach niedriger sein kann [43]. Desweiteren sind Umweltfaktoren eine wichtige Bestimmungsgröße der intestinalen Kolonisierung. Bei Kindern, die per Kaiserschnitt auf die Welt gekommen sind und so keinen Kontakt zur vaginalen Mikrobiota der Mutter hatten, ist die Etablierung einer stabilen intestinalen Mikrobiota übereinstimmend verzögert [44], [45]. Auch der Zeitpunkt der Geburt bzw. die Reife des Neugeborenen spielt eine entscheidende Rolle. Bei Frühgeburten ist das intestinale Kolonisierungsmuster abnormal und eine normale, gesunde

Mikrobiota bestehend aus *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. wird bei ihnen nur selten gefunden [41], [42]. Mit der Vollendung des ersten Lebensjahres hat die kindliche intestinale Mikrobiota einen erwachsenengleichen Status erreicht und unterscheidet sich nun deutlich zu der früheren Mikrobiota. Meist geht dieser tiefgreifenden Veränderung in dem intestinalen Ökosystem das Abstillen und die Einführung von fester Nahrung voraus [38], [40], [43], [46]. Während dieser Phase fassen obligat anaerobe Gattungen wie *Bacteroides* und *Clostridium* Fuß und mit der Zeit entwickelt sich das Ökosystem Darm zu einer stabilen mikrobiellen Gemeinschaft, in der Vertreter der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* am zahlreichsten sind [47], [48] (Abbildung 1-1).

Die initiale Kolonisierung des Darms ist von großer Wichtigkeit, da diese Bakterien die Genexpression in Epithelzellen modulieren können, um sich so ein günstiges Habitat zu schaffen [49], [50]. Diese Pioniere werden wahrscheinlich dauerhaft im Intestinum verbleiben und das Kolonierungsmuster von späteren Bakterien mitbestimmen [51]. Die ersten Kolonisten sind deshalb von maßgeblicher Bedeutung für die finale Zusammensetzung der permanenten Mikrobiota im Erwachsenenleben.

Der Gastrointestinaltrakt (GIT), der mit der intestinalen Mikrobiota besiedelt ist, ist die größte Fläche des menschlichen Körpers, die in direktem Kontakt mit der äußeren mikrobiellen Umwelt steht. Deshalb erhält der GIT seit einiger Zeit auch großes Interesse bezüglich einer möglichen Rolle bei der Entwicklung von atopischen Erkrankungen. Das Mikrobiom und das intestinale Immunsystem können im Falle einer atopischen Erkrankung pathologisch bedingt verändert sein [52]. Weitere Forschungsergebnisse erbringen substantielle Hinweise, dass eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora ursächlich mit einer Allergieentstehung verknüpft sein könnte [53], [54], [55], [56].

In diesen und weiteren Studien ist die An- oder Abwesenheit von bestimmten Bakterien mit atopischen Erkrankungen assoziiert; dies deutet sehr stark darauf hin, dass die Darmmikrobiota in die Krankheitsursache involviert ist. Analysen der Darmbakterien in industrialisierten Ländern zeigen, dass sich die Diversität der Darmbakterien in den letzten 40 Jahren reduziert hat und dass die Entwicklung von Allergien in der Kindheit auf diese eingeschränkte Darmflora zurückgehen könnte [57]. Es scheint, dass allergische Kinder mehr *Clostridium*-Spezies und weniger *Bifidobacterium*-Spezies in ihrer fäkalen Mikrobiota beherbergen [27], [58]. Die Entstehung von Ekzemen wurde mit reduzierter Diversität in Verbindung gebracht. Es fanden sich weniger Bifidobakterien und die spezifische Anwesenheit von *E. coli* und *Bifidobacterium pseudocatenulatum* [59], [60], [61]. Bjorksten und Penders konnten demonstrieren, dass Unterschiede in der intestinalen Mikrobiota von

atopischen und gesunden Kindern der Entwicklung der atopischen Erkrankungen voraus geht, was ebenfalls auf eine potentielle kausale Verknüpfung hin deuten könnte [56], [61]. Mit diesem Wissen wurde die sogenannte Mikrobiota-Hypothese formuliert, die besagt, dass die steigende Häufigkeit von atopischen Erkrankungen auf eine veränderte Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota zurückgeht. Diese mikrobielle Veränderung ist epidemiologisch durch vermehrten Wohlstand und verbesserte Hygiene bedingt.

Das Wissen über die mikrobielle und funktionale Zusammensetzung des menschlichen Darmmikrobioms wächst zwar stetig an, dennoch ist nur wenig bekannt über Variationen innerhalb der gesamten Weltbevölkerung. Das liegt daran, dass die bis heute erhobenen Daten nur auf sehr wenigen Kohorten basieren und somit auf globaler Ebene nicht repräsentativ sind. In ihrer weltweit angelegten Studie zur phylogenetischen Zusammensetzung des menschlichen Darms, konnten Arumugam *et al.* die Existenz von drei „Enterotypen“ demonstrieren, welche nicht Nation- oder Kontinent-spezifisch sind [62]. Trotz dieser Klassifizierung in drei unterschiedliche „Enterotypen“ unterscheidet sich auch bei gesunden Individuen das Darmmikrobiom immer noch beträchtlich, was einen diagnostischen Einsatz von mikrobiellen Markern erschwert.

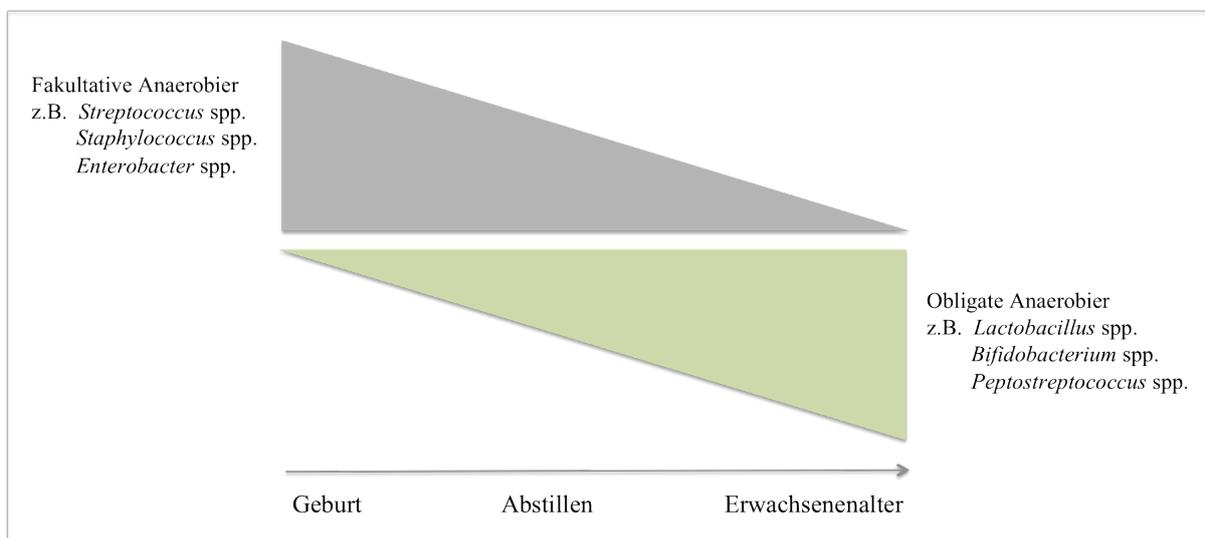


Abbildung 1-1: Die Ökologie des sich entwickelnden Intestinums.

Die initiale Kolonisierung des sterilen Intestinums von Neugeborenen wird durch den Kontakt mit der mütterlichen vaginalen und fäkalen Mikrobiota erreicht. Die ersten Kolonisten haben ein hohes reduzierendes Potential und schließen fakultative Anaerobier wie z.B. *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Enterobacter* ein. Diese Bakterien metabolisieren Sauerstoff und unterstützen so das Wachstum von anaerobischen Bakterien wie Lactobazillen und Bifidobakterien. Kurz nach dem Abstillen kolonisieren strikte Anaerobier den Wirt und dominieren die Mikrobiota. Verändert nach Hooper 2004 [63].

1.1.3. Kommensale Bakterien: Interaktionen mit dem Wirt

Die Mehrzahl der Darmbakterien befindet sich im Kolon und stellt einen anaeroben Bioreaktor dar, der sowohl das Aufschließen von schwerverdaulichen Polysacchariden als auch die Synthese von Mikronährstoffen wie Vitaminen und kurzkettigen Fettsäuren unterstützt [64], [65]. Die durch bakterielle Fermentation entstandenen Produkte wie kurzkettige organische Säuren (SCFA) stellen ungefähr 10% des täglichen Energiebedarfs [66], [67]. Diese symbiontische metabolische Wechselbeziehung zwischen Bakterien und Wirt wird als Kommensalismus bezeichnet und stellt dem Wirt einzigartige metabolische Kapazitäten und Verbindungen zur Verfügung. Das mikrobielle Ökosystem im Intestinum macht es dem Menschen möglich, andernfalls unzugängliche Nahrungsgründe zu erschließen [68]. Die Gesamtheit aller Gene, welche die Mikrobiota des Darms besitzen, wird als Mikrobiom bezeichnet [50]. Dieses Mikrobiom enthält ungefähr 100 Mal mehr Gene als das komplette menschliche Genom und stattet den Menschen so mit zahlreichen zusätzlichen metabolischen Eigenschaften aus [69]. Darüber hinaus schützt die Anwesenheit der nützlichen kommensalen Bakterien kompetitiv vor der Kolonisierung oder dem Überwachsen durch potentiell pathogene Bakterien, was man als Kolonisierungs-Resistenz bezeichnet [70]. Zudem spielen die kommensalen Bakterien eine wichtige Rolle bei der postnatalen Reifung des Darms und der Entwicklung des mukosalen Immunsystems [50], [33]. Ein mehrstufiger möglicher Ansatz, wie die Mikrobiota die Biologie des Wirtes beeinflussen kann, ist in Abbildung 1-2 gezeigt.

Bakterien können über Quorum sensing mittels hormonähnlicher Moleküle, genannt Autoinducer, miteinander kommunizieren [71]. Unter Quorum sensing versteht man ein dichteabhängiges, interzelluläres Kommunikationsverhalten, welches den Bakterien ermöglicht, ihre Genexpression koordinativ zu regulieren. So sind sie in der Lage, ihr Verhalten zu synchronisieren und als vielzelliger Organismus zu agieren. Sperandio *et al.* haben spekuliert, dass Quorum sensing auch der Mechanismus ist, mit dem das Wirtsepithel und die Bakterien miteinander kommunizieren [72] (Level 2). In der Tat löst die Kolonisation des intestinalen Epithels keimfreier Versuchstiere mit kommensalen Bakterien die Expression zahlreicher Wirtsgene aus, die in die intestinale Reifung wie Angiogenese und Stärkung der mukosalen Barrierefunktion involviert sind [73], [49], [74]. Die spezifische Kolonisierung von *Bacterioides thetaiotaomicron* und von anderen Bestandteilen der Mikrobiota induziert im Wirtsepithel die Produktion von fucosylierten Glycanen, welche das Bakterium auch selbst als Energiequelle nutzt [75], [76]. Darüber hinaus arbeiten die kommensalen Bakterien mit dem Wirt zusammen, um bakterizide Proteine durch spezialisierte Epithelzellen, die Paneth-

Körnerzellen, zu produzieren [73]. Zusammengenommen kann man sagen, dass es eine bidirektionale Interaktion zwischen den Bakterien und dem Wirt gibt, die einerseits den kommensalen Bakterien hilft, sich niederzulassen und andererseits dem Wirt hilft, schädliche Mikroben fern zu halten [63].

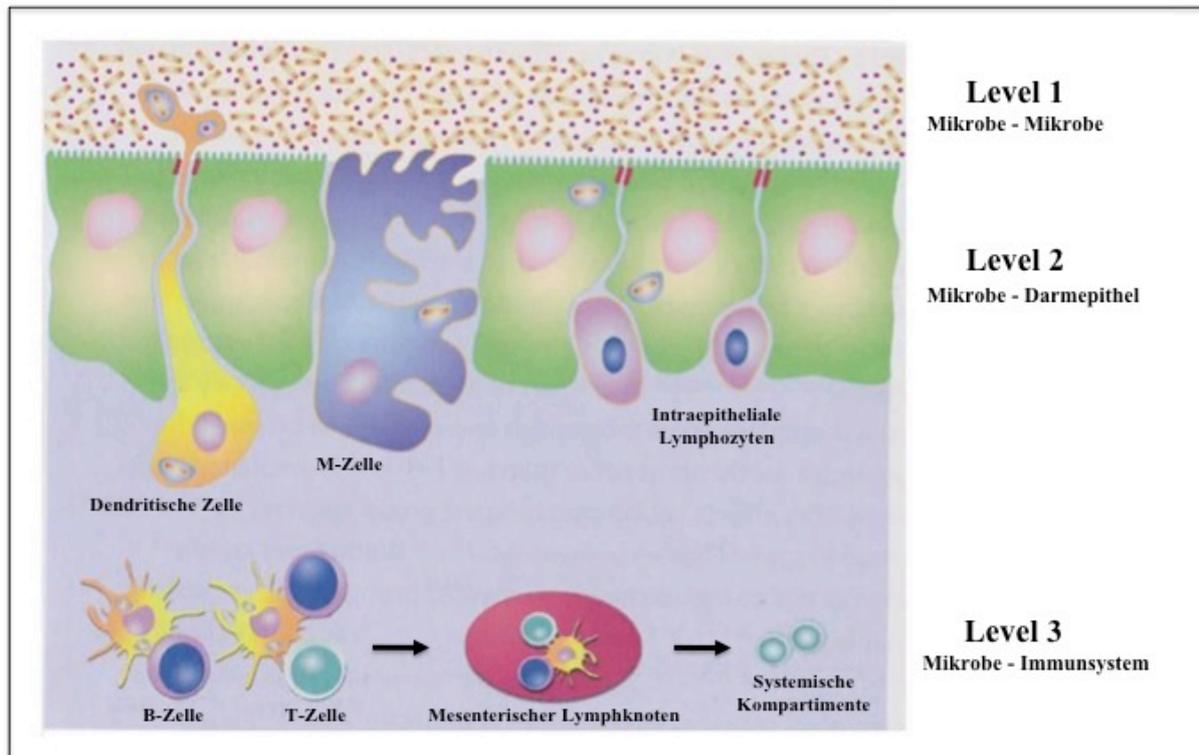


Abbildung 1-2: Mehrstufiger Überblick über mögliche bakterielle Interaktionen mit dem Wirt.

Innerhalb des intestinalen Lumens gibt es ein mikrobielles Ökosystem, das den Wirt bei der Verdauung von Nahrungsmitteln unterstützt. An der epithelialen Schleimhautoberfläche finden rege Interaktionen zwischen den Mikroorganismen und dem Wirt statt, welche die Expression zahlreicher Wirtsgene induzieren, die in die intestinale Reifung und Verstärkung der mukosalen Barrierefunktion involviert sind. Dendritische Zellen überwachen den Darminhalt, indem sie ihre Dendriten in das intestinale Lumen vorstrecken und Bakterien aufnehmen. Die Bakterien werden dann naiven B- oder T-Zellen präsentiert, die auf ihre Aktivierung hin über die mesenterischen Lymphknoten in die systemische Zirkulation gelangen können. Verändert nach Mowat 2003 [77] und Gewirtz et Madara 2001 [78].

Neben der lokalen Genregulation im intestinalen Epithel können die kommensalen Bakterien sogar Gene regulieren, die ganz andere Charakteristika des Wirtes wie Langlebigkeit [79] und Fettablagerung [80] betreffen. Eine abnormale Mikrobiota wurde dementsprechend mit Adipositas assoziiert [81]. Außerdem löst die Anwesenheit kommensaler Mikrobiota anti-inflammatorische Reaktionen aus, die das intestinale Epithel vor massiver unkontrollierter Inflammation als Reaktion auf eindringende Pathogene schützt [82]. Weiter sind diese Kommensalen essentiell für den Schutz vor exzessiven Darmschädigungen mit assoziierter

Mortalität [83]. Neben den Interaktionen mit lokalen Immunzellen ist die intestinale Mikrobiota auch eine starke regulatorische Kraft für Immunantworten jenseits des Darms [84] (Level 3, Abbildung 1-2). Dendritische Zellen (DZ) spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie für die Überwachung des Darminhaltes einzigartige Mechanismen entwickelt haben. Diese Zellen strecken ihre langen dendritischen Ausläufer direkt in das Darmlumen, indem sie die Tight Junctions zwischen den Epithelzellen aufbrechen ohne dabei aber die mukosale Barriere zu zerstören. So werden die kommensalen Bakterien ständig überwacht und können auf diese Art und Weise die Aktivierung von spezifischen Immunzellen induzieren. Dieser Mechanismus ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung von immunologischer Toleranz [84]. Sudo *et al.* konnten zeigen, dass durch den Wiederaufbau der intestinalen Mikrobiota von keimfreien Nagern mit *B. infantis* deren Entwicklung von oraler Toleranz wieder hergestellt wurde [85]. Bemerkenswerter Weise konnte die orale Toleranz nur dann wieder hergestellt werden, wenn der Wiederaufbau schon bei neonatalen Mäusen vorgenommen wurde. Das wiederum unterstreicht den Aspekt, dass nur in einem sehr frühen Zeitfenster eine erfolgreiche Intervention möglich ist. Die Aktivierung von regulatorischen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) spielt bei der Entwicklung von immunologischer Toleranz eine entscheidende Rolle [86], [87], [88], [77]. Wird die Reifung dieser Zellen durch ungenügenden Kontakt zu spezifischen Mikroben behindert, so können sich Th1- oder Th2- vermittelte immunologische Funktionsstörungen entwickeln [89]. Eine normale Entwicklung der T_{reg} ist also essentiell für die Induktion von oraler Toleranz gegenüber harmlosen Nahrungsbestandteilen [77], [90] und für das Ausbalancieren von exzessiven Th1- und Th2- Antworten, welche sich sonst in entzündlichen, allergischen oder Autoimmunerkrankungen niederschlagen können [91], [92]. Desweiteren ist der frühe Kontakt zu der kommensalen Mikrobiota auch wichtig für die postnatale Reifung des übrigen mukosalen Immunsystems. Das gesunde mukosale Immunsystem ist in den sogenannten Peyerschen Plaques, zahlreichen mesenterischen Lymphknoten und isolierten lymphoiden Follikeln organisiert und besteht desweiteren aus, in dem intestinalen Epithel verstreuten Lymphozyten. Keimfreie Versuchstiere, bei denen dieser mikrobielle Kontakt fehlt, haben sehr viel kleinere Peyersche Plaques und beträchtlich weniger intraepitheliale T-Lymphozyten [85].

Darüber hinaus wird von den kommensalen Bakterien angenommen, dass sie das Antikörperrepertoire von peripheren B-Lymphozyten modellieren können, was dabei helfen kann, den Wirt vor ungewollten Pathogenen zu schützen [93].

1.1.4. Die Immunologie atopischer Erkrankungen

Eine gestörte immunologische Toleranz spielt also möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen. In allergischen Individuen erzeugen Immunantworten auf eigentlich harmlose Antigene nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen allergische Reaktionen. Allergische Immunantworten werden von Typ 2 CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th2-Zellen) vermittelt. Für eine allergische Inflammation charakteristische Zytokine sind Interleukin IL-4 und IL-13. Sie fördern die IgE-Produktion, die Aktivierung von B-Zellen, hemmen spezifisch Th1-Zellen und lösen die Sekretion von IL-5 aus, welches die Aktivierung von Eosinophilen induziert [2]. Abbildung 1-3 illustriert die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in die hier angesprochenen T-Zell-Subpopulationen. In Neugeborenen, die später eine Atopie entwickeln, scheint die postnatale Reifung dieser zellulären Immunfunktionen bereits während des ersten Lebensjahres behindert zu sein [94]. Kinder mit einem hohen Risiko für eine atopische Erkrankung scheinen bis zu ihrem ersten Lebensjahr ein Th2-Zytokinprofil zu entwickeln, welches durch hohe Level von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert ist - noch bevor klinische Symptome auftreten [95], [96]. Andere Studien haben abgeschwächte neonatale IFN- γ Antworten und eine verminderte Kapazität für die Produktion von IFN- γ als Charakteristikum für einen atopischen Phänotyp identifiziert [97], [98]. Früher wurde ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen als immunologische Erklärung für die Hygiene-Hypothese angesehen. Fanden während der neonatalen Periode und der Kindheit ungenügend infektionsbedingte Th1-Antworten statt, so führte das zu unausgewogenen Th-2 Reaktionen, welche einen atopischen Phänotyp erzeugten. Das Th2/Th1-Paradigma konnte jedoch nicht aufrecht erhalten werden seit gezeigt wurde, dass Th2-Antworten auch in der Abwesenheit einer allergischen Erkrankung existieren können [24] und dass sich Krankheiten, die entweder Th1- oder Th2- vermittelt sind, nicht gegenseitig ausschließen [99]. Zudem nehmen Th1- vermittelte Autoimmunerkrankungen ähnlich stark zu wie atopische Erkrankungen [17]. Deshalb werden die seit einiger Zeit wieder in den Fokus rückenden T_{reg} und die Induktion von Toleranz als wichtige Faktoren in der Kontrolle der Entwicklung atopischer Erkrankungen gesehen [100].

All diese Studien deuten daraufhin, dass bei atopischen Erkrankungen allergiespezifische T_{reg}-Antworten beeinträchtigt sind. Einige Daten liefern Hinweise darauf, dass kein numerischer Mangel an T_{reg} ursächlich ist, sondern dass ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivierung von T_{reg} und der nachfolgenden Aktivierung von Effektorzellen nach Kontakt mit einem Allergen die regulatorische Suppression verhindert [101], [102], [103], [104]. Es scheint also, dass die Entwicklung von atopischen Erkrankungen auf eine beeinträchtigte neonatale T_{reg}

Funktion zurückgeht [105]. In Kindern, die ihre Kuhmilchallergie im Laufe des Wachstums überwunden haben, war die Toleranz direkt mit der Anwesenheit von funktionalen T_{reg} verknüpft [106]. Trotz dieser Assoziationen des Immunsystems mit atopischen Erkrankungen gibt es gegenwärtig keinen verlässlichen Biomarker für die Entstehung von atopischen Erkrankungen.

1.2. Probiotika

Bis vor kurzem war der wissenschaftliche Fokus in der Erforschung der humanen endogenen Mikrobiota noch auf die pathogenen Bestandteile gerichtet. In jüngerer Zeit wurde aber die Aufmerksamkeit auch auf indigene nicht-pathogene Mikroorganismen gelenkt, was zu einem neuen wachsenden Forschungsfeld geführt hat, in dem symbiotische Wirt-Mikroben-Wechselbeziehungen untersucht werden. Aufbauend auf der Hygiene-Hypothese bzw. auf der etwas spezifischeren Mikrobiota-Hypothese, könnten gezielte Manipulationen der intestinalen Mikrobiota ein neuer möglicher Ansatz zur Therapie und Prävention von atopischen Erkrankungen sein.

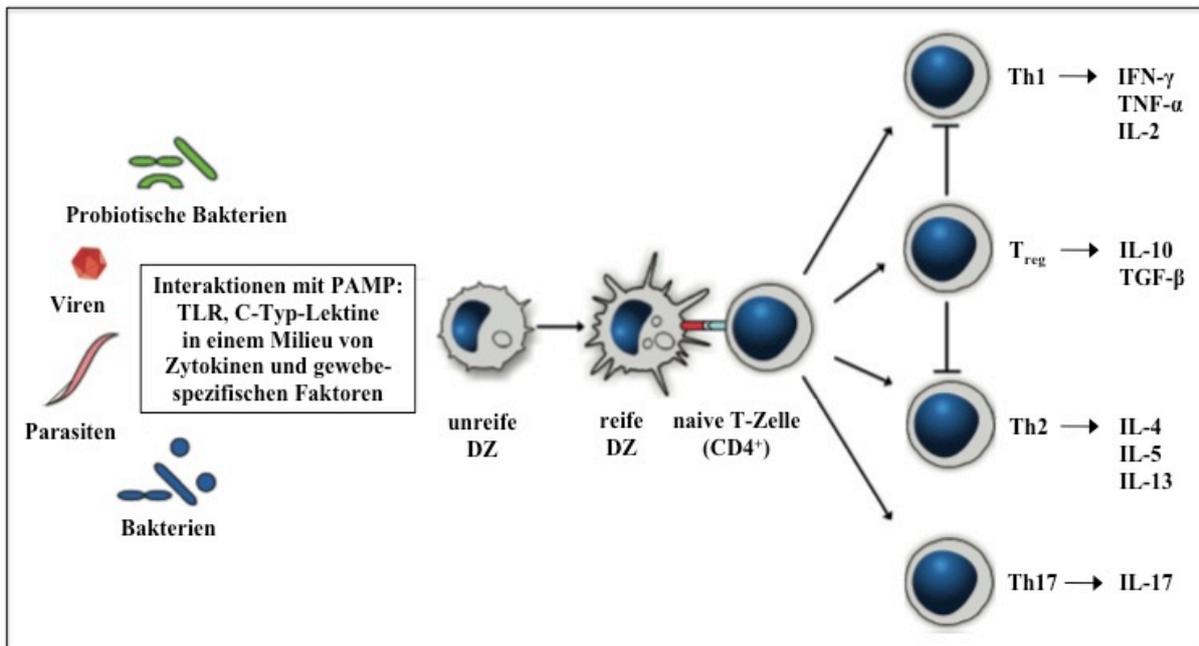


Abbildung 1-3: Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen.

Sowohl Pathogene wie Viren, Parasiten und Bakterien also auch intestinale kommensale Bakterien interagieren mit Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen (DZ) über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) wie Toll-like Rezeptoren (TLR) und C-Typ-Lektine. DZ spielen eine entscheidende Rolle in der Polarisierung von Th1-, Th2-, Th17- und T_{reg}-Zellen. DZ interagieren direkt und indirekt über drei unterschiedliche Signale mit den naiven T-Zellen: erstens bindet der T-Zellrezeptor spezifisch an den Komplex aus Antigen/MHC-Molekül auf der DZ, zweitens finden Interaktionen zwischen den kostimulatorischen Oberflächenmolekülen CD80/CD86 der DZ und dem Rezeptor CD28 der T-Zelle statt und drittens wird dadurch die Produktion von immunmodulatorischen löslichen Faktoren (Zytokine und Chemokine) induziert [107]. Diese komplexe Interaktionen der Kostimulation zwischen DZ und T-Zellen in einem Milieu aus Zytokinen und gewebespezifischen Faktoren sind entscheidend für die Natur der polarisierenden Signale und für das davon abhängige Ergebnis der T-Zelldifferenzierung. Verändert nach O'Hagan *et al.* 2003 [108] und Niers 2009 [109].

1.2.1. Die Definition "Probiotika" im Wandel der Zeit

Erste Berichte über gesundheitliche Effekte von Bakterien, die über die Nahrung aufgenommen wurden, reichten bis zu der Zeit zurück, als in der persischen Version des alten Testaments geschrieben wurde, dass Abraham seine Langlebigkeit dem Konsum von Sauermilch verdankte (Genesis 18,8). Der berühmte römische Geschichtsschreiber Plinius der Ältere (23–79 nach Christus) empfahl in seiner Enzyklopädie der Naturgeschichte 76 vor Christus fermentierte Milchprodukte zur Behandlung von Gastroenteritis und zum Knochenaufbau [110]. Die Heilkundigen im Altertum wussten wahrscheinlich noch nicht sehr viel über Mikroorganismen, die in unserem Körper leben, doch sie bemerkten, dass bestimmte Lebensmittel positive Auswirkungen haben. Lange Zeit später erschien die erste dokumentierte wissenschaftliche Studie zu diesem Thema und wurde 1905 von dem späteren Nobelpreisträger Elie Metchnikoff (1845–1916) durchgeführt [111]. Er vermutete, dass die Menschen in Bulgarien ihr Langlebigkeit dem Verzehr größerer Mengen von Joghurt mit

einem Bakterium verdanken, das er daraufhin *Lactobacillus bulgaricus* nannte. Er behauptete, dass *L. bulgaricus* die Anzahl von toxinogenen Bakterien im Darm verringerte und so das Leben des Wirtes verlängerte. Aus all diese Beobachtungen entwickelte sich über die Zeit das Konzept eines "Probiotikums". Lilly und Stillwell führten diesen Begriff zum ersten Mal 1965 als Gegensatz zu dem Wort Antibiotikum ein und definierten ihn als "Substanz, die von einem Mikroorganismus sezerniert wird und das Wachstum eines anderen stimuliert" [112]. Seitdem wurden viele Definitionen vorgeschlagen, um einen möglichen Wirkmechanismus und die gesundheitsfördernden Effekte probiotischer Bakterien besser zu beschreiben. Die erste Definition, die Probiotika in direkten Bezug mit einer verbesserten Darmgesundheit bringt, erschien 1974 und stammte von Parker [113]. Er verstand Probiotika als „Substanzen, die dabei helfen, die intestinale Flora auszubalancieren und so einen positiven Effekt ausüben“. 15 Jahre später wurde diese Definition von Fuller mit der Absicht überholt, die Wichtigkeit von lebenden Zellen für die Funktionalität von Probiotika zu betonen und das Wort Substanzen zu entfernen. Er beschrieb Probiotika als "eine lebende mikrobielle Nahrungsmittelergänzung, die den Wirt durch die Verbesserung seines intestinalen mikrobiellen Gleichgewichtes vorteilhaft beeinflusst" [114]. 1991 erweiterten Huis in't Veld und Havenaar diese Definition um weitere Wirkungsbereiche zusätzlich zu dem gastrointestinalen Trakt [115]. Darüber hinaus war dies die erste Definition, die vorschlug, dass Probiotika aus mehreren probiotischen Stämmen bestehen können: „Eine Monokultur oder eine gemischte Kultur von lebenden Mikroorganismen, die, wenn sie Tieren oder Menschen verabreicht wird, den Wirt günstig beeinflusst, indem sie die Eigenschaften der indigenen Mikrobiota verbessert“. Um diese Definition dahin gehend zu erweitern, dass auch andere Mechanismen wie z.B. Immunmodulation einbezogen werden, definierte eine europäische Expertengruppe 1998 den Begriff Probiotika neu als „lebende mikrobielle Nahrungsmittelbestandteile, die vorteilhaft für die Gesundheit sind und deren Wirksamkeit und Sicherheit wissenschaftlich dokumentiert sind [116]. Diese Definition wurde jedoch ein Jahr später und erneut von Salminen *et al.* ergänzt, um neu herausgefundene probiotische Effekte einzubeziehen, die zeigen, dass auch nicht-lebende Probiotika oder spezifische Komponenten wie z.B. Zellwandfragmente Effekte hervorrufen können: „Probiotika sind Zellpräparate oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die einen vorteilhaften Effekt auf die Gesundheit und das Wohlbefinden des Wirtes haben“ [117]. Um erneut zu betonen, dass Probiotika neben dem Intestinum auch andere Körperkompartimente beeinflussen können, schlugen Schrezenmeir *et al.* die folgende Definition vor: „Ein Probiotikum ist ein Präparat oder ein Produkt, welches lebende definierte Mikroorganismen in ausreichender Zahl enthält

und die Mikrobiota in einem Kompartiment des Wirtes verändert und dadurch gesundheitliche Effekte in diesem Wirt ausübt“ [110]. Alle diese jüngeren Definitionen haben gemeinsam, dass das Spektrum von probiotischer Aktivität nahezu universal ist, aber der Wirkmechanismus unter allen probiotischen Stämmen als ähnlich angesehen wird. Aus diesem Grund hat die finnische Wissenschaftlerin Erika Isolauri eine neue Definition vorgeschlagen, um besser auf spezifische probiotische Eigenschaften einzugehen und meint: „Probiotika sind spezifische lebende oder inaktivierte mikrobielle Kulturen die dokumentierte Angriffspunkte bei der Reduktion des Risikos einer menschlichen Erkrankung oder in dem Ernährungsmanagement haben“ [118]. Die heutzutage am besten bekannte und am meisten gebräuchliche Definition ist jedoch die der Weltgesundheitsorganisation (WHO), welche Probiotika als „lebende Mikroorganismen, die, in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen verleihen“, definiert [119].

Es bleibt festzuhalten, dass es bis heute noch nicht gelungen ist, eine eindeutig treffende und allgemein anerkannte Definition zu formulieren. Das mag zum Großteil daran liegen, dass probiotische Effekte so vielseitig sind und die zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen noch weitestgehend unklar.

1.2.2. Mögliche Wirkmechanismen von Probiotika

Wie bereits allgemein für kommensale Bakterien beschrieben, können probiotische Bakterien ihre Effekte auf drei möglichen Ebenen ausüben: Modifikation der intestinalen Mikrobiota, Verstärkung der mukosalen Barrierefunktion und Immunmodulation [120]. Probiotische Bakterien als Teil der intestinalen Mikrobiota im Darmlumen helfen bei der Verdauung von Nahrungsmittelbestandteilen, erleichtern möglicherweise die Kolonisierung kommensaler Bakterien und verhindern gleichzeitig die Kolonisierung durch pathogene Bakterien (Level 1, Abbildung 1-2). Probiotische Bakterien kräftigen möglicherweise die mukosale Barriere durch Heraufregulation von Genen, die die Schleimproduktion in intestinalen Becherzellen induzieren und sie verhindern kompetitiv pathogene bakterielle Adhärenz an das Epithel (Level 2, Abbildung 1-2). Kontinuierliche Interaktionen von probiotischen Bakterien über das intestinale Epithel, über M-Zellen (spezialisierte Epithelzellen) und DZ mit dem Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe könnte das Immunsystem günstig modulieren (Level 3, Abbildung 1-2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es noch weitestgehend unklar ist, ob und in welchem Maße probiotische Bakterien direkt Immunsignalwege beeinflussen, ob sie ihre

Effekte über die Modulation der endogenen intestinalen Mikrobiota vermitteln, oder ob Interaktionen mit dem intestinalen Epithel molekulare Grundlage der immunmodulatorischen Eigenschaften sind [121]. Erschwerend hinzu kommt, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass man nicht nur von einem Wirkmechanismus sprechen kann, sondern dass unterschiedliche Stämme auf vielfältige Art und Weise mit dem Wirt interagieren und unterschiedliche Effekte ausüben. So zeigen einige Stämme ein pro-inflammatorisches Profil, während andere mehr anti-inflammatorisch wirken [122]. Es sind aber nicht die probiotischen Bakterien alleine, die essentiell sind für die immunmodulatorischen Effekte. Ebenso wichtig, wenn nicht sogar noch entscheidender, sind wirtabhängige Faktoren, wie der genetische Hintergrund, die genaue individuelle Zusammensetzung der Darmmikrobiota, die Ernährung und andere persönliche Lebensgewohnheiten [121]. So konnten Baarlen *et al.* durch eine Evaluation der menschlichen mukosalen Transkription nach Behandlung mit unterschiedlichen *Lactobacillus*-Stämmen zeigen, dass die interindividuelle Variation um einiges größer war, als die Unterschiede, die durch die probiotischen Bakterien hervorgerufen wurden [123] [124].

1.2.3. Welche probiotischen Stämme werden verwendet?

In der Literatur wurden Bakterien zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben. Basierend auf ihren verwendeten Interaktionsmechanismen kann eine Unterscheidung in zwei unterschiedliche Gruppen mit möglichen probiotischen Eigenschaften getroffen werden. Die erste Gruppe umfasst die in probiotischen Therapien am meisten eingesetzte bakterielle Gattung, die Milchsäurebakterien (*Lactic acid bacteria*, LAB). Diese LAB sind eine heterogene Gruppe von Gram-positiven Bakterien mit einem strikt fermentativen Metabolismus, der hauptsächlich Milchsäure produziert, welche einen konservierenden, d.h. antimikrobiellen Effekt hat. Ihre Heterogenität wurde weiterhin durch Genomsequenzierungen betont, die erbrachten, dass der genetische Unterschied zwischen zwei LAB größer sein kann, als zwischen einem Fisch und einem Menschen [125]. Das natürliche Habitat von LAB schließt Menschen, Tiere und Pflanzen ein. Die meisten dieser Bakterien weisen eine lange Geschichte von gesundheitsunbedenklichem Einsatz in Forschung und Nahrungsmittelindustrie auf und deshalb wird von ihnen generell angenommen, dass sie sicher sind (*Generally Recognized As Safe*, GRAS). Die am häufigsten eingesetzten LAB-Mitglieder gehören zu den Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Lactococcus*. Aus verschiedenen Gründen werden andere Gattungen wie *Enterococcus*,

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* und *Propionibacterium* weniger häufig angewendet. Die Gattungen *Bifidobacterium* und *Propionibacterium* sind phylogenetisch von den übrigen LAB sehr weit entfernt, zeigen aber LAB-ähnliche Eigenschaften wie z.B. Säureproduktion, und sind deshalb in die Gruppe eingeschlossen.

Die zweite Gruppe von potentiell probiotischen Mikroorganismen gehört zu den Gattungen, die nicht generell als sicher angesehen werden. Das Prinzip „Bekämpfe bakterielle Pathogene mit ihren nicht-pathogenen Verwandten“ brachte viele Forscher dazu, nicht-pathogene Isolate wie z.B. aus der Art *Escherichia coli* anzuwenden. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses Bakterium in der Lage ist, das Auftreten von Allergien und Diarrhö zu vermindern, die Remission von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) aufrechtzuerhalten und die Kolonisation von nosokomialen Pathogenen in Frühgeburten zu verhindern [91], [126], [127], [128], [129], [130], [131], [132], [133]. *Clostridium butyricum* wurde vor nicht allzu langer Zeit aufgrund seiner Fähigkeit, Buttersäure zu produzieren, als potentiell probiotischer Stamm vorgeschlagen. Diese kurzkettige Fettsäure ist eine wichtige Energiequelle für das Kolonepithel, welche 60% - 70% des Energiebedarfs bereitstellt [125] und es wird angenommen, dass sie anti-inflammatorische Aktivität besitzt [134], [135]. So zeigt die Behandlung von experimenteller IBD und antibiotika-assoziiertes Diarrhö mit *C. butyricum* vielversprechende Erfolge [135], [136], [137]. *Saccharomyces boulardii* ist eine nicht-pathogene Hefe, die bei der Behandlung von antibiotika-assoziiertes Diarrhö moderat effektiv ist [138]. Eine antibiotische Therapie kann mit dem Überwachsen von *Clostridium difficile* assoziiert sein, was zu Diarrhö und in schweren Fällen zu pseudomembranöser Colitis führt. Die Effektivität von *S. boulardii* beruht auf der Fähigkeit, eine spezifische Protease zu produzieren, welche die intestinalen Effekte des Toxins A von *C. difficile* mildert [139], [140].

1.2.3.1. Die Gattung *Bifidobacterium*

Bifidobakterien wurden zum ersten Mal von Tissier zu Beginn des 20. Jahrhunderts isoliert und beschrieben. Bifidobakterien werden allgemein als Gram-positive, nicht-sporenbildende, unbewegliche und Katalase-negative Anaerobier charakterisiert. Ihre primäre Nische ist das intestinale Ökosystem. Sie sind hauptsächlich in der menschlichen Kolonmikrobiota und in der von anderen warmblütigen Tieren anzutreffen [141]. In gestillten Kindern repräsentieren Bifidobakterien bis zu 95% der kultivierbaren fäkalen Bakterien. Diese Zahl nimmt auf ca.

25% im Erwachsenenleben ab [125]. Mittels molekularer Methoden wurde herausgefunden, dass Bifidobakterien die Hauptbestandteile in der fäkalen Mikrobiota (~3% der Gesamtbakterienzahl) und auch im Blinddarmlumen (~5% der Gesamtbakterienzahl) sind [142]. Sie sind saccharolytische Mikroorganismen, die L-Milchsäure produzieren, welche von Menschen leichter metabolisiert werden kann als D-Milchsäure und Acetat mit wenig oder gar keiner Bildung von CO₂. Zur Zeit werden ~40 Spezies zu der Gattung *Bifidobacterium* gezählt (www.dsmz.de), von denen nur sechs regelmäßig als Probiotika angewendet werden: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis* und *B. longum*. Diese Probiotika haben in einem breiten Feld von Anwendungen gezeigt, dass sie gesundheitsfördernd sind. Zusammen gefasst sind Bifidobakterien in der Lage, infektiöse Diarrhö zu mildern, Schutz gegen kolonisierende Pathogene zu bieten, das Immunsystem zu stimulieren und möglicherweise vor karzinogener Aktivität der intestinalen Mikrobiota zu schützen [142]. Darüber hinaus haben Bifidobakterien einen exzellenten Sicherheitsreport. Dokumentierte Fälle von Infektionen sind extrem selten obwohl die Konsumierung dieser Mikroben stark ansteigt [143].

1.2.3.2. Die Gattung *Lactobacillus*

1900 war Moro der erste Wissenschaftler, der fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Bakterien aus dem Stuhl gestillter Kinder isolieren konnte, welche er *Bacillus acidophilus* nannte. Diese Gram-positiven, nicht-sporenbildenden und unbegeißelten Stäbchen sind entweder aerotolerante oder anaerobe Mikroorganismen. Im Gegensatz zu Bifidobakterien bewohnen Lactobazillen nicht nur das intestinale Ökosystem, sondern sind auch assoziiert mit Pflanzen (Silage und Getreide), Fleisch und Milchprodukten. Lactobazillen verteilen sich in zahlreichen ökologischen Nischen im gastrointestinalen und genitalen Trakt. Sie adhären stark an Plattenepithelzellen in dem Magen-Darmtrakt von Säugern [144], [145], [145], [146], [147], [148], [149], [150]. In Menschen sind Lactobazillen die vorherrschenden mikrobiellen Bewohner des Dünndarms. Sie erreichen ihre maximale Anzahl von 10⁸ - 10⁹ Zellen/g intestinaler Inhalt im terminalen Ileum, welche auch im nachfolgenden Kolon stabil bleibt [151]. In Hinblick auf die Fermentation können zwei Gruppen unterschieden werden: die homofermentative Gruppe produziert nur D/L-Lactat und die heterofermentative produziert neben D/L-Milchsäure auch CO₂, Ethanol und Essigsäure. Bis jetzt sind ~130 verschiedene Arten identifiziert (www.dsmz.de) und viele weitere neue gesundheitsfördernde Stämme sind

gerade im Begriff entdeckt zu werden [152]. Dafür werden jedoch verhältnismäßig wenige Arten in einem breitem Spektrum von intestinalen und extra-intestinalen Erkrankungen angewendet (für einen kompletten Überblick siehe Montrose 2005 [153]). Fälle von Infektionen mit Lactobazillen sind selten, der sichere Einsatz von *Lactobacillus rhamnosus* in immunsupprimierten Personen ist möglicherweise fragwürdig [154], [155], [156], [157], [158]. Darüber hinaus sollte der Einsatz von D-Lactat-produzierenden Lactobazillen wie *L. bulgaricus* in Frühgeborenen aufgrund deren Unfähigkeit, D-Lactat komplett abzubauen, kritisch betrachtet werden.

1.2.3.3. Die Gattung *Lactococcus*

1985 klassifizierten Schleifer *et al.* die nicht-pathogenen Mitglieder der Gattung *Streptococcus* und fassten sie in einer relativ kleinen neuen Gattung, genannt *Lactococcus*, mit fünf Arten zusammen [159]. Lactococcen sind Gram-positive, nicht-sporenbildende, unbewegliche Bakterien die sich in Paaren und kurzen Ketten anordnen. Diese Bakterien leben auf Pflanzen, auf tierischer Haut und tierischen Haaren und werden umfangreich in der Käseproduktion eingesetzt, da sie Milch zum Gerinnen bringen und aromatisieren. Obwohl eine Studie *Lactococcus lactis* als einen der ersten Kolonisten in dem Darm von Neugeborenen nachgewiesen hat, weiß man nur wenig über die Rolle von Lactococcen in der Mikrobiota Erwachsener [160]. Ihre fermentativen Signalwege enden allein in der Produktion von L-Lactat und sie sind in der Lage, Vitamin K zu synthetisieren. Der potentiellen Rolle von Lactococcen als Probiotika wurde bis jetzt wenig bis gar keine Aufmerksamkeit geschenkt. Während der letzten 25 Jahre war ihre Fähigkeit, einige Bakteriozine, von welchen Nisin das am besten bekannte ist, Gegenstand intensiver Forschung [161]. Nisin ist ein bakterizides Protein mit einem Gram-positiven Spektrum und zeigt sich aktiv gegen Nahrungsmittelkeime wie *Listeria monocytogenes*. Sehr interessant ist, dass die synchronisierte Produktion dieses Lantibiotikums innerhalb der Bakterienpopulation mittels Quorum sensing gesteuert wird [162]. Aufgrund des kleinen Genoms und des einfachen Metabolismus ist *Lactococcus lactis* der Modellorganismus für genetische Modifikationen zur Gewinnung von pharmazeutischen Produkten geworden [163]. Mit seiner Hilfe wird z.B. die Produktion von therapeutischen Proteinen in erkrankter Mukosa induziert [164], [165], [166], [167].

1.3. Zielsetzung

Die erste Studie, die die Rolle von Probiotika im Kontext von primärer Prävention von atopischen und allergischen Erkrankungen untersuchte, wurde 2001 von Kalliomaki *et al.* publiziert. *Lactobacillus rhamnosus* GG wurde Müttern pränatal während der letzten Wochen der Schwangerschaft und den Nachkommen dann weiterhin postnatal während der ersten sechs Lebensmonate verabreicht. Das Auftreten von Ekzemen war bis zum zweiten Lebensjahr um 50% reduziert [168]. Dieser Effekt war bis zum vierten Lebensjahr immer noch vorhanden, eine Verbesserung der klinischen Symptome von Asthma aufgrund allergischer Rhinitis konnte im Gegensatz dazu nicht beobachtet werden [169]. Es folgten weitere Studien, die jedoch keine einheitlichen Ergebnisse zeigten [170], [171], [172], [173], [174]. Neben den inhärenten Schwierigkeiten bei diesen klinischen Studien, wie z.B. Unterschiede der Studien-Populationen, des Studiendesigns, der klinischen Reaktionskriterien und der Anwendung von verschiedenen probiotischen Stämmen, könnte wie bereits erwähnt eine zugrundeliegende Ursache die Unvorhersagbarkeit der individuellen Interaktion zwischen den lebenden probiotischen Bakterien und sowohl der Darmmikrobiota als auch dem Immunsystem des Wirtes sein. Darüber hinaus können das Mikrobiom und das intestinale Immunsystem im Falle einer Krankheit pathologisch bedingt verändert sein [52]. Insoweit könnte die Anwendung von Substanzen, die von den probiotischen Bakterien sezerniert werden, eine attraktive Alternative sein. Anders als lebende probiotische Bakterien deren Bioaktivität nach Applikation weitestgehend unbekannt ist, haben Verbindungen definierbare physikalische und chemische Eigenschaften mit einem beweisbaren Wirkmechanismus. Jedoch sind bis jetzt nur wenige lösliche, sezernierte Verbindungen von probiotischen Bakterien mit präklinischen Hinweisen auf mögliche therapeutische Effekte identifiziert [175]. Deshalb waren es Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. *in vitro* Screening Systeme für die Detektion immunmodulatorischer Aktivität in den Überständen probiotischer Bakterien zu etablieren.
2. Diese Systeme in einem Screeningverfahren von kommerziell vertriebenen Stämmen der Firma Winclove anzuwenden.
3. Mit Hilfe der *in vitro* Screening Systeme sezernierte bakterielle Substanzen, welche die immunmodulatorische Aktivität vermitteln, biochemisch zu identifizieren.

Durch die Identifikation von solchen sezernierten bakteriellen Komponenten mit funktionaler Bioaktivität könnte der Grundstein für eine künftige Entwicklung geeigneter Substanzen für die Behandlung und oder Prävention von chronischen Immunstörungen, wie allergischen Erkrankungen, gelegt werden.

1.4. Konzept der praktischen Durchführung

Um neben dem immunologischen Aspekt dieses Projektes auch den mikrobiologischen und chemischen Teilansätzen gerecht zu werden, wurde für die praktische Realisierung der Zielsetzung eine enge Kooperation mit den folgenden Arbeitsgruppen des Helmholtz Zentrums München eingegangen: der Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktion unter der Leitung von Prof. Dr. Anton Hartmann und der Abteilung Analytische Biogeochemie unter der Leitung von PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin. Alle mikrobiologischen Arbeiten wie die Kultivierung der probiotischen Stämme und die Gewinnung der bakteriellen Überstände wurden nach Absprache von Frau Dr. Kerstin Hochwind durchgeführt (Abbildung 1-4). Die chemische Fraktionierung der bakteriellen Überstände sowie die Versuche zur Strukturidentifizierung immunmodulatorischer probiotischer Substanzen in den bakteriellen Überständen wurden nach gemeinsamer Planung von Herrn Dr. Juliano Fonseca übernommen (Abbildung 1-4). Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit liegt auf dem immunologischen zellbiologischen Aspekt des Kooperationsprojektes. Alle zum Verständnis nötigen Ergebnisse der chemischen Analysen werden in Kapitel 8.4 gezeigt. Details und die Beschreibung der Methoden sind den Dissertationsschriften von Frau Dr. Hochwind (LMU-München, Fakultät für Biologie) und Herrn Dr. Fonseca (TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) zu entnehmen.

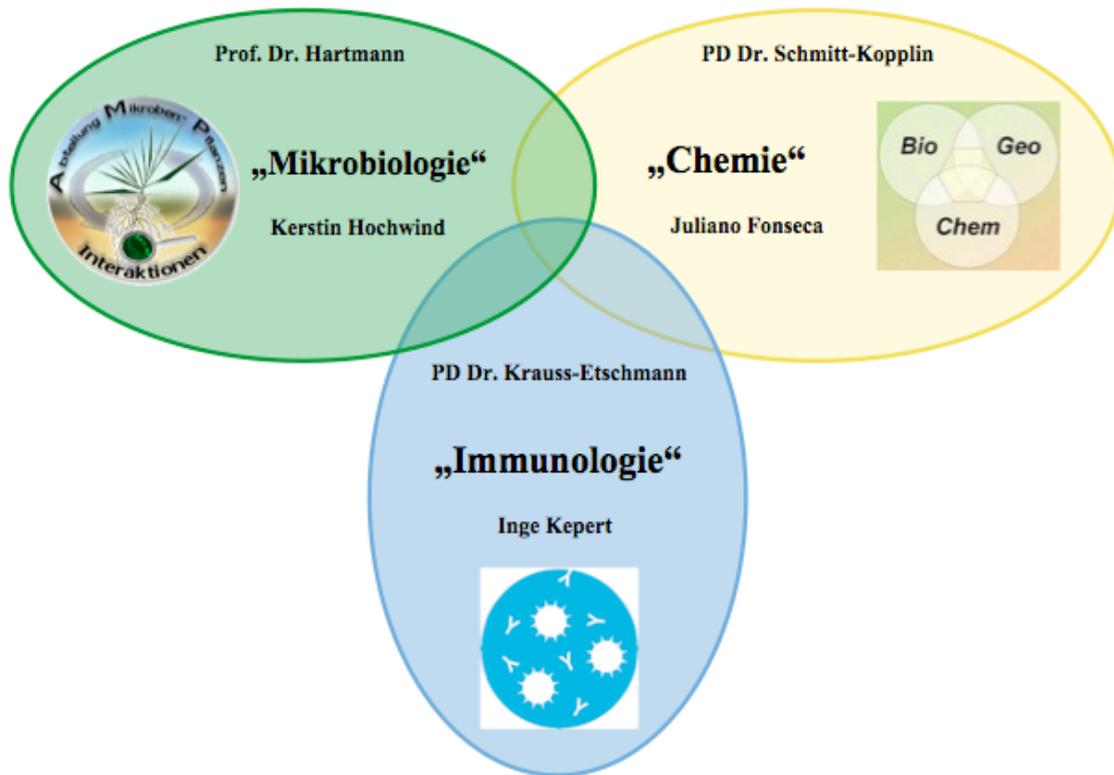


Abbildung 1-4: Konzept der praktischen Durchführung.

Für die praktische Umsetzung des Projektes wurden Kooperationen mit den folgenden Gruppen des Helmholtz Zentrum München eingegangen: der Abteilung Mikrob.-Pflanzen Interaktion unter der Leitung von Prof. Dr. Anton Hartmann und der Abteilung Analytische Biogeochemie unter der Leitung von PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin. In jeder Arbeitsgruppe wurde ein/e Doktorand/in mit der praktischen Durchführung betraut: die mikrobiologischen Arbeiten wurden von Frau Kerstin Hochwind, die chemischen von Herrn Juliano Fonseca durchgeführt.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Verwendete Mikroorganismen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die probiotischen Bakterienstämme von Winlove Bioindustries BV, Amsterdam, Niederlande bezogen (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Firma
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	ABiTEP GmbH, Berlin, Deutschland
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12	Chr. Hansen, Horsholm, Dänemark
<i>Bifidobacterium breve</i> W25	Winlove Bioindustries BV, Amsterdam, Niederlande
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20091	Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	DSMZ
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420	Danisco, Niebüll, Deutschland
<i>Bifidobacterium lactis</i> W51	Winlove Bioindustries BV
<i>Bifidobacterium lactis</i> W52	Winlove Bioindustries BV
<i>Bifidobacterium longum</i> BB-46	Chr. Hansen, Horsholm, Dänemark
<i>Bifidobacterium longum</i> W108	Winlove Bioindustries BV
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> DSM 20088	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland
<i>Enterococcus faecium</i> W54	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2	Chr. Hansen, Horsholm, Dänemark
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen, Horsholm, Dänemark
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W22	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W37	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W50	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W74	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	DSMZ
<i>Lactobacillus casei</i> W56	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus casei</i> W79	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus gasseri</i> W44	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20077	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus helveticus</i> W60	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus paracasei</i> DSM 20312	DSMZ

<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LC-01	Chr. Hansen, Horsholm, Dänemark
<i>Lactobacillus plantarum</i> W21	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus plantarum</i> W59	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus plantarum</i> W62	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	DSMZ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021	DSMZ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> W102	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Ltd, Helsinki, Finnland
<i>Lactobacillus salivarius</i> W24	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactococcus lactis</i> W19	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactococcus lactis</i> W32	Winlove Bioindustries BV
<i>Lactococcus lactis</i> W58	Winlove Bioindustries BV
<i>Streptococcus thermophilus</i> W69	Winlove Bioindustries BV

2.2. Verwendete bakterielle Signalmoleküle

Die in Vorversuchen verwendeten Signalpeptide der probiotischen Stämme *Bacillus subtilis* und *Bifidobacterium lactis* BB-12 wurden von der Firma GenScript, Piscataway, New Jersey synthetisiert und kommerziell erworben (Tabelle 2-2). Von dem erhaltenenen Lyophilisat wurden 5 mg in 1 ml H₂O gelöst und folgende Stammlösungen hergestellt: CSF 15,2 mM, ComX 9 mM und p(CHWPR) 12,9 mM.

Tabelle 2-2: Verwendete bakterielle Peptid-Signalmoleküle

Peptid	Molekulargewicht [Da]	Aminosäuresequenz	Organismus	Referenz
CSF	593	ERGMT	<i>Bacillus subtilis</i>	Solomon <i>et al.</i> 1995
ComX	1000	ADPITRQWGD	<i>Bacillus subtilis</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1994
p(CHWPR)	698	CHWPR	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	Mitsuma <i>et al.</i> 2008

2.3. Kultivierung von humanen Primärzellen und Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primärzellen und Zelllinien wurden im Brutschrank (HeraCell240 und Heraeus BDD 6220, Thermo Fisher Scientific, Hanau, Deutschland) bei 37°C in einer wassergesättigten 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle verwendeten

Lösungen und Medien wurden vor Benutzung in einem thermostatischen Wasserbad (Wasserbad 1008, GFL, Burgwedel, Deutschland) auf 37°C erwärmt.

2.3.1. Verwendete Zellen

LA-4: Murine alveolar Typ II Zellen. Die Kultivierung dieser Zellen und die Versuchsdurchführungen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Tobias Stöger, „Dynamic of inflammatory lung diseases“, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg übernommen.

L-428: Humane Hodgkin-Lymphom-Zelllinie, die vom Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland erworben wurde (ACC 197). Diese Suspensionszellen sezernieren das Chemokin CCL17 (Thymus and Activation Regulated Chemokine TARC) konstitutiv in großen Mengen [176], [177].

KM-H2: Humane Hodgkin-Lymphom-Zelllinie, die vom Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland erworben wurde (ACC 8). Diese Suspensionszellen sezernieren ebenfalls das Chemokin CCL17 konstitutiv in großen Mengen [177].

Granulozyten: humane Granulozyten, isoliert aus dem venösen Vollblut gesunder Spender.

DZ: humane dendritische Zellen, generiert aus humanen Monozyten, die aus dem venösen Vollblut gesunder Spender isoliert wurden.

2.3.2. Kultivierungsmedium

RPMI 1640-Medium (1x) mit stabilem
Glutamin & 2,0 g/l NaHCO₃

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.3.3. Seren

Die in der Arbeit verwendeten Seren wurden vor Verwendung steril filtriert (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore GmbH) und im Wasserbad bei 56°C für ca. 30 min hitzeinaktiviert.

Humanes Serum Typ AB
CELLect[®], MP Biomedicals[™],
Eschwege, Deutschland

Fötale Kälberserum (FCS)
GIBCO[®] Invitrogen

2.3.4. Chemikalien und Reagenzien

Agarose
Invitrogen, Carlsbad, USA

Barrycidal
Interchem, Pfaffen-Schwabenheim,
Deutschland

Biocoll-Trennlösung, enthält Ficoll[®] 400,
Dichte 1,077 g/ml
Biochrom AG

Bovines Serum Albumin (BSA)
New England BioLabs, Beverly, USA

Dimethylsulfoxid DMSO
Sigma Aldrich, Taufkirchen,
Deutschland

D-PBS Dulbecco's Phosphatgepufferte
Kochsalzlösung (ohne Calcium & Magnesium)
Ethanol 80%
Ethidiumbromid
GIBCO[®] Invitrogen
Hausapotheke, eigene Herstellung
Biomatik, Wilmington, USA

Gene Ruler[™] 50 bp DNA Ladder
Fermentas, Waltham, USA

GlutaMAX[™]-I Supplement, 200nM
mit L-Alanyl-L-Glutamin in 0,85 NaCl
GIBCO[®] Invitrogen

GPR109B Agonist	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl) -ethansulfonsäure)	Biochrom AG
Nuclease-freies Wasser	Ambion/ Applied Biosystems, Carlsbad USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Terralin	medpro D, Witten, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma Aldrich

2.3.5. Herstellung von Medien und Puffern

Medium für L428 und KM-H2 Zellen

RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% hi FCS, 1% P/S

DZ-Medium

RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 5% humanem Serum Typ AB und 1% GlutaMAX

DZ-Medium komplett

DZ-Medium + 20 ng/ml rhu IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF

Einfriermedien

Jeweiliges Kulturmedium + 20% hi FCS + 10% DMSO

FACS-Puffer

D-PBS + 2% FCS

2.3.6. Lösungen für das Durchflusszytometer FACS Canto II und den Luminex xMap

BD FACST TM Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACST TM Clean Solution	BD Biosciences
BD FACST TM Shutdown Solution	BD Biosciences
Bio-Plex Sheath fluid	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA

2.3.7. Kommerzielle Kits

RNeasy Mini QIAcube Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH
Quantikine Human CCL17/TARC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Bio-Plex Pro™ Human Cytokine, Group I, 4-plex, Express Assay Format	R&D Systems, Minneapolis, USA
Milliplex® Human Cytokine Immunoassay	Millipore

2.3.8. Kulturgefäße

12-well Platte, Nunclon™ Oberfläche	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
6-well Platte, Nunclon™ Oberfläche	Nunc
Zellkulturflasche, Nunclon Oberfläche, 175 cm ²	Nunc
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Corning Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturflasche, 175 cm ²	Corning Inc.

2.3.9. Verwendete Stimulantien und Antikörper

2.3.9.1. Zytokine

Tabelle 2-3: Zur Generierung der DZ verwendete Zytokine

Zytokin	Konzentration	Lösungsmittel	Firma
IL-4	20 ng/ml	D-PBS + 2% Humanes Serum Typ AB	CellGenix, Freiburg, Deutschland
GM-CSF	100 ng/ml	DZ-Medium	CellGenix

2.3.9.2. LPS zur Reifung von DZ

Tabelle 2-4: Zur Reifung der DZ eingesetztes LPS

Stimulanz	Konzentration	Lösungsmittel	Firma
LPS (<i>E. coli</i> 0111:B4)	0,1 µg/ml	DZ-Medium	Sigma-Aldrich

2.3.9.3. Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2-5: Verwendete primäre Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse von DZ

Spezifität	Konjugat	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung*	Bezugsquelle
CD1a	PE	HI149	Maus	IgG ₁ , κ	1:35	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD3	PerCP	SK7	Maus	IgG ₁ , κ	1:35	BD Biosciences
CD14	APC PE	M5E2	Maus	IgG _{2a} , κ	1:35	BD Biosciences
CD40	APC	5C3	Maus	IgG ₁ , κ	1:70	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	PE	L307.4	Maus	IgG ₁ , κ	1:35	BD Biosciences
CD83	FITC	HB15e	Maus	IgG ₁ , κ	1:35	BD Biosciences
CD86 (B70/B7-2)	FITC	2331 (FUN-1)	Maus	IgG ₁ , κ	1:35	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP	L243	Maus	IgG _{2a} , κ	1:35	BD Biosciences

* 2 µl oder 4 µl Antikörper pro 1×10^5 Zellen

2.3.9.4. Kryokonservierung von Zelllinien

Um eine Langzeitlagerung der Zelllinien möglich zu machen, wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Stickstofftank von Leica, Jung CM 3000 Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland). Als Einfriermedium wurde das jeweilige Kulturmedium der Zellen eingesetzt, welches zusätzlich mit 20% hi FCS und 10% DMSO angereichert war. Das DMSO wurde den Zellen als Gefrierschutz beigemischt, damit sich bei dem Einfriervorgang keine schädlichen Eiskristalle bilden konnten. Da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirken

kann, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach der Ernte wurden die Zellen gezählt, in einem geeigneten Volumen Einfriermedium aufgenommen und in der von der Referenz empfohlenen Konzentration eingefroren. Zunächst wurden die Zellen über Nacht bei -80°C in einer Nalgene „Mr Frosty“ Kryobox (Nalgene, Rochester, New York, USA) aufbewahrt, um dann für die Langzeitlagerung in den flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

2.3.9.5. Auftauen von Zelllinien

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (Heraeus Megafuge 2.0R; 7 min, RCF 400, Beschleunigung 9, Bremse 9, 20°C). Der Überstand wurde verworfen und die gewaschenen Zellen im Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen (75 cm^2) ausgesät.

2.3.9.6. Zellzählung

Zur Zählung aller verwendeten Primärzellen und Zelllinien wurde aus einer gut gemischten Zellsuspension eine definierte Menge entnommen und mit dem Farbstoff Trypanblau in einem passenden Verhältnis verdünnt. Die Zellmembran vitaler Zellen ist undurchlässig für diesen Farbstoff und deshalb können damit nur abgestorbenen Zellen angefärbt werden, da deren Membranpermeabilität stark erhöht ist. Die gefärbten Zellen wurden lichtmikroskopisch (Leica DM IL und Leica DMLS, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland) in einem Neubauer Hämozytometer improved gezählt. Die Gesamtanzahl der Zellen ergab sich aus der Multiplikation des Mittelwertes der vier ausgezählten Großquadranten mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 der Neubauer Zählkammer.

Bei der Auszählung der Monozyten wurde besonders auf eine morphologische Unterscheidung von kontaminierenden Lymphozyten geachtet und die so ermittelte Zellzahl mit dem Literaturwert des proportionalen Anteils von Monozyten an den gesamten PBMZ abgeglichen.

2.3.9.7. Blutspender

Alle Blutspender rekrutierten sich aus einem gemischtgeschlechtlichen Pool freiwilliger gesunder Erwachsener im Alter von 20-50 Jahren. Sie waren Nichtraucher, hatten weder akute Infektionen noch allergische Erkrankungen zum Zeitpunkt der Blutabnahme. Darüber hinaus war für mindestens 20 Tage vor Blutentnahme keine Medikamenteneinnahme erfolgt.

2.3.9.8. Isolation von polymorphnukleären Leukozyten (PMN)

Polymorphnukleäre Leukozyten (Granulozyten) wurden mithilfe des Plymorphprep™ (AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen) aus 20 ml venösem Vollblut gesunder Spender isoliert. Diese Isolationstechnik beruht auf einer Dichtegradientenzentrifugation, die die zellulären Blutbestandteile in unterschiedliche Phasen auftrennt [178], [179]. Dabei wurde nach Anweisungen des Herstellers vorgegangen.

2.3.9.9. Isolation von humanen PBMZ zur Generierung von DZ

Für die Isolation von PBMZ wurde den Spendern mittels heparinisierten 50-ml-Spritzen und Infusionsset mindestens 100 ml venöses Blut steril abgenommen. Das Blut wurde in Zellkulturflaschen überführt und 1:1 mit warmem RPMI 1640-Medium verdünnt. Zur Entfernung von störenden Thrombozyten wurde das Blutgemisch zu je 40 ml auf graduierte 50 ml Röhrchen verteilt und bei niedriger Drehzahl zentrifugiert (Rotana 460R und Heraeus Megafuge 2.0R, Hanau, Deutschland; 25 min, RCF 100, Beschleunigung 3; Bremse 1, 22°C). Der Thrombozytenüberstand wurde verworfen, das sedimentierte Blutgemisch 1:1 mit warmem RPMI 1640-Medium verdünnt und jeweils 30 ml Blutgemisch auf 20 ml Ficoll überschichtet. Nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation (20 min, rpm 2000, Beschleunigung 2, Bremse 0, 22°C) ergibt sich folgende Auftrennung der Blutzellen in unterschiedliche Phasen: die unterste Sedimentphase enthält die Erythrozyten und Granulozyten. Darüber befindet sich das Ficoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml, gefolgt von der Interphase mit den Monozyten und Lymphozyten. In der obersten Schicht befindet sich das Blutplasma mit den restlichen Thrombozyten. Die Zellen der Interphase wurden gesammelt, zelltoxische Ficollrückstände mit einem D-PBS Waschschrift entfernt (12 min,

rpm 1900, Beschleunigung 9, Bremse 9, 22°C). Die anschließende Zentrifugation diente erneut dem endgültigem Entfernen verbliebener Thrombozyten (15 min, RCF 120, Beschleunigung 5, Bremse 3, 20°C). Das Zellpellet bestehend aus Monozyten und Lymphozyten wurde dann in 2 ml DZ-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.3.9.10. Isolation von Monozyten

Die Isolation der Monozyten aus der gewonnenen Interphase erfolgte mittels des Standardverfahrens der Plastikadhärenz und basiert auf der Fähigkeit von Monozyten, sich reversibel an Plastikoberflächen anzuheften [180]. Die isolierten Interphasezellen wurden dafür je nach ermittelter Zellzahl mit einer Monozyten-Mindestkonzentration von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml in einer 12-well Platte ausgesät. In die einzelnen Kavitäten wurde bereits 1 ml warmes RPM1640-Medium vorgelegt, so dass sich ein Endvolumen von 2 ml ergab. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die nicht haftenden Lymphozyten in mehreren Waschschrritten mit warmem RPMI 1640-Medium entfernt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 ml DZ-Medium komplett I, das mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF versetzt war. Abschließend wurden die Monozyten zur Regeneration über Nacht in den Brutschrank gestellt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.9.11. Differenzierung der Monozyten in immature DZ (iDZ)

An den Tagen 0, 1, 3 und 6 wurden die isolierten Monozyten mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF behandelt. Unter dem Einfluss dieses Zytokincocktails erfolgte die Differenzierung der Monozyten in iDZ (Abbildung 2-1). Dafür wurden am ersten Tag nach der Isolation 500 µl DZ-Medium komplett in jede Kavität dazugegeben (Endvolumen 1,5 ml). Dieser Füttervorgang wurde am 3. und 6. Tag wiederholt, wobei zuvor 500 µl verbrauchtes Kulturmedium abgenommen wurden (Endvolumen 1,5 ml). Am 6. Tag nach Versuchsbeginn war die Differenzierung der Monozyten in iDZ erfolgreich abgeschlossen und es konnte die Ausreifung der iDZ mit LPS durchgeführt werden.

2.3.9.12. Reifung der iDZ mit LPS

Für eine Ausreifung wurden iDZ mit niedrig dosiertem LPS (0,1 µg/ml) behandelt. LPS ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und induziert die Maturation unreifer DZ (Abbildung 2-1). Für die Reifung der iDZ mit LPS wurde am Tag 6 oder 7 (je nach zeitlichem Versuchsaufbau) 500 µl DZ-Medium komplett für jede Kavität vorbereitet und mit LPS in gewünschter Konzentration versehen. Zusätzlich wurden die jeweiligen probiotischen Stimulanzen (Kapitel 2.3.11) dem einzelnen Ansatz beigemischt. Vor Zugabe dieser Ansätze wurden pro Kavität 500 µl Kulturmedium abgenommen. Als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad dienten iDZ, die keiner Behandlung unterzogen wurden und als Positivkontrolle wurden LPS-gereifte DZ verwendet, die keinen Kontakt mit dem jeweiligen probiotischen Stimulus hatten.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden die iDZ zunächst mit LPS für 24 h ausgereift und nach Abschluss dieses Maturationsprozesses für weitere 24 h mit den probiotischen Komponenten stimuliert. Die nachfolgende Versuchsdurchführung erfolgte analog dem oben beschriebenen Ablauf.

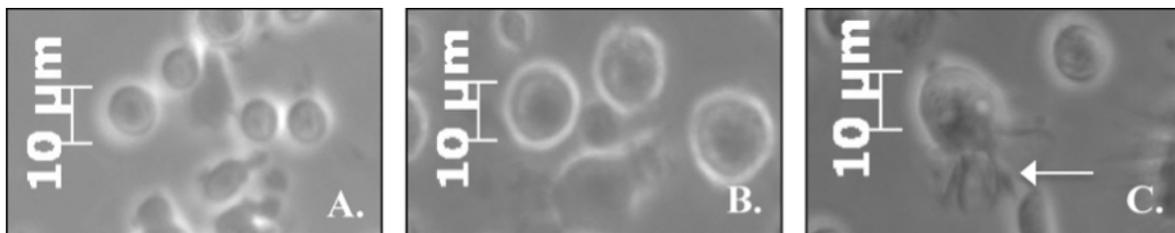


Abbildung 2-1: Phasenkontrastaufnahmen von humanen Zellen

A. Adhärente Monozyten (Tag 0)

B. iDZ (Tag 6 oder 7; der Bildausschnitt ist nicht identisch mit dem aus A., er dient nur der Darstellung der veränderten Morphologie)

C. LPS-gereifte DZ mit den typischen dendritischen Zytoplasmafortsätzen (Pfeil; der Ausschnitt der Abbildung dient nur der Darstellung der maturaen Morphologie der DZ und lässt ebenfalls keine Rückschlüsse auf eine Quantifizierung der Reifungsrate zu) (Tag 7 oder 8)

2.3.10. Screening Systeme für immunmodulatorische Aktivität probiotischer Komponenten

2.3.10.1. KM-H2 und L-428 Zellen

Als Kultivierungsmedium für die zwei humanen Hodgkin Lymphom Zelllinien KM-H2 und L-428 diente RPMI 1640, supplementiert mit 10% hi FCS und 1% Antibiotikallösung aus Penicillin und Streptomycin. In Screening Experimenten sollte der Effekt von probiotischen Komponenten auf die CCL17 Sekretion von KM-H2 und L-428 Zellen untersucht werden. Dafür wurden beide Zelllinien in 35 ml Kulturmedium in 75 cm² Flaschen bis zur gewünschten Zellzahl kultiviert und dann in 4-well Platten in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen in 3 ml Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zelllinien mit probiotischen Komponenten (Kapitel 2.3.11) für 24 h stimuliert. Danach wurden die Zellüberstände gewonnen (10 min, RCF 400, Beschleunigung 9, Bremse 9, 22°C) und die CCL17-Konzentration mittels ELISA quantitativ bestimmt (Kapitel 2.3.14).

2.3.10.2. Humane DZ

In Screening Versuchen sollte der Einfluss unterschiedlicher probiotischer Komponenten auf die funktionelle Eigenschaften reifer humaner DZ untersucht werden.

Nach Ablauf der 24-stündigen Stimulationsdauer wurden die nun ausgereiften DZ geerntet. Dazu wurden die adhärennten DZ mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen, Deutschland) vorsichtig von der Plastikoberfläche gelöst, die Zellsuspension aus jedem well in ein 15 ml graduiertes Tube (PP Röhrchen, steril, Greiner Bio-One International AG) überführt und zentrifugiert (Rotana 460R und Heraeus Megafuge 2.0R; 12 min, rpm 1900, Beschleunigung 9, Bremse 9, Temperatur 22 °C). In jede Kavität der Zellkulturplatte wurde 1 ml warmes D-PBS gegeben und die Platte wurde während der Zentrifugation auf einen Schüttler gestellt (ROT AMAX 120, Heidolph, Kehlheim, Deutschland bei 100 rpm). Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Zellkulturüberstände für spätere Zytokinmessungen bei -80°C eingefroren. Das D-PBS mit den verbliebenen DZ, die durch sich durch das langsame Schütteln von der Platte gelöst haben, wurde in das entsprechende 15 ml Tube überführt und erneut mit gleichem Protokoll zentrifugiert. Die

erfolgreiche Ernte wurde lichtmikroskopisch (Leica DM IL und Leica DMLS, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland) überprüft.

2.3.11. Probiotische Komponenten

Wenn nicht anders beschrieben, betrug die Stimulationsdauer bei allen getesteten probiotischen Komponenten 24 h.

2.3.11.1. Stimulation mit bakteriellen Signalpeptiden von probiotischen Stämmen

Für Stimulationsversuche mit den synthetisch hergestellten bakteriellen Peptide CSF, ComX und p(CHWPR) wurde diese den Ansätzen in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM zugefügt.

2.3.11.2. Stimulation mit probiotischen Überständen

Den Stimulationsansätzen wurden 200 µl der Bakterienüberstände beigemischt, welche mit 50 µl HEPES abgepuffert waren. Um sicher zu stellen, dass das Kultivierungsmedium der Bakterien keinen Effekt auf reife DZ hat, wurden jeweils LPS-gereifte DZ mitgeführt, die nur mit dem jeweiligen Medium (MRS oder CDM1) stimuliert wurden.

2.3.11.3. Stimulation mit probiotischen Fraktionen

Überstände ausgewählter Bakterienstämme wurden chemisch analysiert. Die Überstände wurden zusammen mit Mediumkontrollen in einem zweistufigen chemischen Separationsverfahren (Präparative Chromatographie und anschließende UPLC, für Details siehe Dissertationsschrift von Herrn M.Sc. Chem. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) fraktioniert. Die erhaltenen lyophilisierten Fraktionen wurden in 150 µl RPMI 1640-Medium aufgenommen und davon wurden jeweils 50 µl den Stimulationsansätzen beigemischt. Aktive chemische Subfraktionen wurden einer detaillierten Strukturanalyse mittels UPLC-TOF MS und NMR unterzogen, sowie einer Analyse der

exakten Masse mittels FT-ICR-MS (siehe Dissertationsschrift von Herrn M.Sc. Chem. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). Alle resultierenden Proben wurden in Screening Systemen auf Bioaktivität rückgetestet.

2.3.12. Stimulation mit D-Aminosäuren

Für Stimationsversuche mit unterschiedlichen D-Aminosäuren wurden den Stimationsansätzen die D-Aminosäuren in der Endkonzentration 10 μ M zugegeben. Bei der Aminosäure Tryptophan wurden beide Isomere in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6: Für Stimationsversuche verwendete Aminosäuren mit eingesetzter Konzentration und Bezugsquelle.

Aminosäure	Konzentrationen	Bezugsquelle
D-Alanin	10 μ M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-Histidin	10 μ M	Carl Roth
D-Isoleucin	10 μ M	Carl Roth
D-Leucin	10 μ M	Carl Roth
D-Methionin	10 μ M	Carl Roth
D-Phenylalanin	10 μ M	Carl Roth
D-Prolin	10 μ M	Carl Roth
D-Serin	10 μ M	Carl Roth
D-Threonin	10 μ M	Carl Roth
D-Tryptophan	0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M	Carl Roth
L-Tryptophan	0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M	Carl Roth
D-Tyrosin	10 μ M	Carl Roth
D-Valin	10 μ M	Carl Roth

2.3.13. Durchflusszytometrie

2.3.13.1. Prinzip

Die phänotypische Charakterisierung der stimulierten DZ erfolgte mittels eines 6-Farben Durchflusszytometers (FACS Canto II, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Die Methode der Durchflusszytometrie basiert auf der Antigen-Antikörperreaktion zwischen zellulärem Oberflächenmolekül und dem dagegen gerichteten, spezifischen Antikörper. Bei der Passage durch die Fließzelle werden die Zellen in dem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom vereinzelt und kreuzen nacheinander den Laserstrahl. Die duale Laseroptik besteht beim FACS Canto II aus dem blauen Coherent® Sapphire™-Festkörperlaser (Argon 488 nm) und dem roten JDS Uniphase™ HeNe Laser (633 nm). Die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome werden spezifisch durch das Laserlicht angeregt und geben Emissionssignale typischer Wellenlänge ab, die von einem Photomultiplier Detektor (PMT 488/10BP) gemessen werden. Beim Durchqueren des Laserstrahles werden nicht nur die Farbstoffe spezifisch angeregt, sondern die Zellen des Probenstromes streuen das Laserlicht auch in einer für den jeweiligen Zelltyp charakteristischen Art und Weise. Man unterscheidet dabei das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), welches ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel ist und somit Auskunft über die relative Partikelgröße der Zelle gibt. Das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) gibt die Brechung des Lichtes im rechten Winkel wieder und liefert so Informationen über die Granularität bzw. innere strukturelle Komplexität der Zelle. Das starke FSC-Signal wird von einer Photodiode detektiert, während das schwächere SSC-Signal, ebenso wie die Emissionssignale der Fluorochrome, von dem Photomultiplier-Detektor gemessen werden. Diese Lichtsignale werden daraufhin in elektrische Impulse umgewandelt, die wiederum eine Transformation in digitale Signale erfahren, welche mit der BD FACSDiva™ 5.0 Software graphisch dargestellt werden und ausgewertet werden können.

Solche graphischen Darstellungen nennt man „Punktwolken“ (Dot Plots). Hierbei ist der SSC auf der x-Achse und der FSC auf der y-Achse aufgetragen und jeder Punkt entspricht einer aufgenommenen Zelle. Zellen eines Zelltyps mit ähnlichem Aktivierungsgrad gleichen sich in ihrer Morphologie und erscheinen im Dot Plot als Punktwolken auf engem Raum. Diese Punktwolken können manuell durch Fenster (Gates) eingegrenzt werden und so als Zellpopulationen definiert werden (Abbildung 2-2).

Um sicher zu stellen, dass die verwendeten Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen, wurden in jedem Experiment immer Isotypkontrollen mitgeführt.

Für die Ermittlung des Prozentsatzes der Zellen, die den untersuchten Marker tragen, führt man eine Quadrantenanalyse durch. Dafür lässt man sich die Zellpopulation von Interesse graphisch darstellen, trägt den gewünschten Marker auf der X-Achse gegen den FSC oder einen anderen Marker auf der y-Achse auf und legt ein elektronisches Kreuz über das Dot Plot. Auf diese Art und definiert man vier Quadranten, in denen die dort zu liegenden Zellen doppelt positiv, doppelt negativ, einfach positiv und einfach negativ für den/die untersuchten Marker sind (Abbildung 2-3).

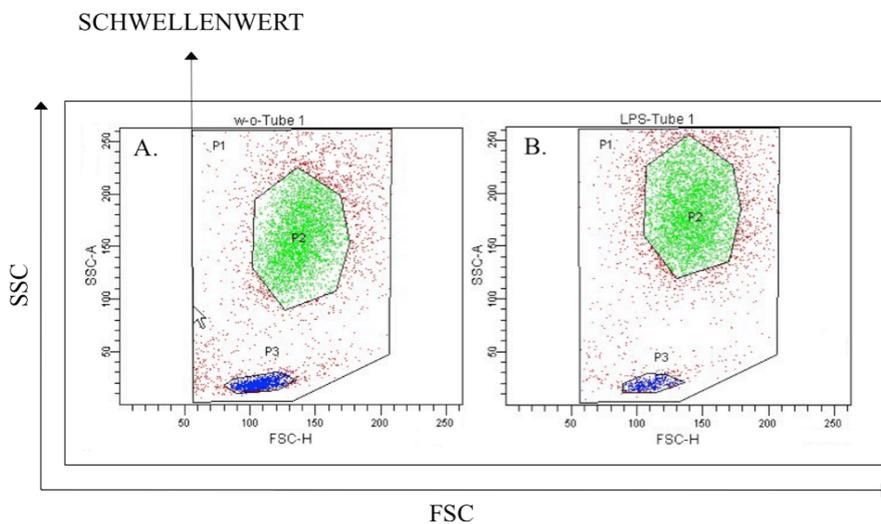


Abbildung 2-2: Repräsentative Punktwolkendarstellung von Zellpopulationen (x-Achse: FSC, y-Achse: SSC)

P1 Gate: gesamte Zellen, **P2 Gate:** DZ Population, **P3 Gate:** Lymphozyten Population

A unreife DZ

B LPS-gereifte DZ

Um Zellschrott (Debris) und kontaminierende Partikel von der durchflusszytometrischen Messung auszuschließen, ist es sinnvoll, einen Schwellenwert (Threshold) zu setzen. Dieser Schwellenwert beschreibt eine Spannungseinstellung des FSC oberhalb derer die gemessenen Signale intakten Zellen zugeschrieben werden und die Datenaufzeichnung einsetzt.

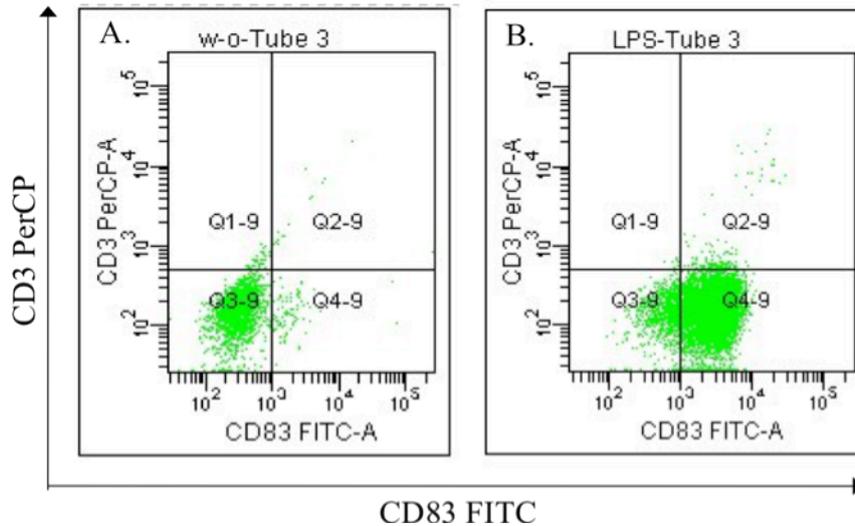


Abbildung 2-3: Repräsentative Punktwolkendarstellung des P2 Gates mit der DZ-Population (x-Achse: CD83, y-Achse: CD3).

Q1-9: einfach positiv für CD3; Q2-9: doppelt positiv für CD3 und CD83; Q3-9: doppelt negativ für CD3 und CD83; Q4-9: einfach positiv für CD83;

A. unreife DZ

B. LPS-gereifte DZ

2.3.13.2. Angewandte Durchflusszytometrie: DZ

Die Mehrfarben-Durchflusszytometrie erlaubt eine hochauflösende Analyse des Reifheits- bzw. Aktivierungsgrades und des kostimulatorischen Potentials der untersuchten DZ.

Das bei der Ernte gewonnene Zellpellet wurde in 360 µl FACS-Puffer suspendiert und vorsichtig gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA). Von der Zellsuspension wurden je 120 µl auf 3 FACS Röhren (FACS Rundboden Röhren, 5 ml mit Deckel, Falcon BD) verteilt und jeder Ansatz wurde für 25 min mit einer Kombination aus spezifischen primären fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt (Tabelle 2-7). Die Färbekubation fand zum Schutz der fluoreszenzkonjugierten Antikörper im Dunkeln statt. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wurden Isotypkontrollen der entsprechenden Antikörper mitgeführt. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in der Mehrfachfärbung auch in Nachbarspektren strahlten (Tabelle 2-8), wurde in einer Kompensation diese spektrale Überlappung jeweils korrigiert. Die so optimierten Geräteeinstellungen konnten dann für alle weiteren Messungen übernommen werden.

In Tabelle 2-9 ist das zu erwartende Expressionsprofil der Kontrollen aus unreifen und reifen DZ dargestellt.

Tabelle 2-7: Auflistung der 3 Antikörper-Ansätze für die 4-Farben Färbung ausgewählter Oberflächenmoleküle der stimulierten DZ

	FITC	PE	APC	PerCP
1. Ansatz je 2 µl	IgG ₁ (Isotyp)	IgG ₁ (Isotyp)	IgG ₁ (Isotyp)	IgG ₁ (Isotyp)
2. Ansatz je 4 µl	CD86	CD80	CD14	HLA-DR
3. Ansatz je 4 µl	CD83	CD1a	CD40	CD3

Tabelle 2-8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe mit Anregungslaser, Absorptions- und Emissionsmaximum

Fluoreszenzfarbstoff	Laser [nm]	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]
FITC Fluoreszein-Isothiocyanat	Argon 488	495	519
PE Phycoerythrin	Argon 488	565	575
APC Allophycocyanin	Helium-Neon 633	650	660
PerCP Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex	Argon 488	490	675

Tabelle 2-9: Auflistung der ausgewählten Oberflächenmarker mit Expression bei reifen und unreifen DZ zusammen mit der jeweiligen Funktion.

Marker	Relevanz	Expression	
		unreife DZ	reife DZ
CD1a	DZ-Marker	↑ hoch	↑ hoch
CD3	T-Lymphozyten-Marker	negativ	negativ
CD14	Monozyten-Marker	↓ niedrig	↓ niedrig
CD40	Kostimulation	→ moderat	↑ hoch
CD80	Kostimulation	→ moderat	↑ hoch
CD83	Aktivierungsmarker	↓ niedrig	↑ hoch
CD86	Kostimulation	→ moderat	↑ hoch
HLA-DR	Antigenpräsentation	→ moderat	↑ hoch

2.3.13.3. Angewandte Durchflusszytometrie: Vitalitätstests

Wie in den einzelnen Kapitel beschrieben, wurde die Vitalität der stimulierten Zellen lichtmikroskopische mit Trypanblau überprüft. Zusätzlich wurden die stimulierten Zellen mit dem Avitalfarbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) gefärbt. Ähnlich wie Trypanblau kann dieser Avitalfarbstoff nur die Zellmembran abgestorbener Zellen durchdringen und interkaliert in die DNA, woraufhin er eine spektrale Verschiebung erfährt. Die Fluoreszenz des 7-AAD wurde durchflusszytometrisch analysiert (FACS Canto II) (Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10: Anregungslaser, Absorptions- und Emissionsmaximum von 7-AAD

Fluoreszenzfarbstoff	Laser [nm]	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
7-AAD	Argon 488	488	647

2.3.14. CCL17-ELISA

In den Zellkulturüberständen von stimulierten KM-H2 Zellen wurden die CCL17-Protein-Mengen mittels ELISA bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der quantitativen „Sandwich Enzym Immuno Assay“ Technik. Eine 96-well Mikroplatte wurde mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für CCL17 ist, vorbeschichtet. Standards und Proben wurden in die Kavitäten der Mikroplatte pipettiert und das vorhandene CCL17 wurde von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Alles ungebundene Material wurde durch Waschschriffe entfernt und anschließend ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper, der spezifisch für CCL17 ist, dazugegeben. Ungebundenes Antikörper-Enzym Reagenz wurde weggeschwemmt und über eine Substratzugabe mit anschließender Farbreaktion die CCL17-Menge gemessen (ELISA reader MRXII, Thermo Labsystems, Egelsbach, Deutschland).

Im Detail wurde den Anweisungen im Quantikine® human CCL17/TARC Kit Folge geleistet.

2.3.15. Zytokinquantifizierung

In den Überständen stimulierter DZ wurden die Konzentrationen von sezerniertem IL-4, IL-10, IL-12 und IFN- γ gemessen.

Das Prinzip hinter diesem Bead-basierten Assays ist ähnlich dem des gerade beschriebenen „Sandwich Immuno Assays“ (Kapitel 2.3.14). Ein gegen das Zielmolekül gerichteter Antikörper wurde kovalent an farbkodierte Beads gekoppelt. Die Beads können so mit dem Zielmolekül im Zellkulturüberstand reagieren. Ungebundenes Protein wurde durch Waschschriffe entfernt und dann erfolgte die Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörpers, der für ein anderes Epitop als der erste Antikörper spezifisch ist. Das Zielmolekül war somit umgeben von einem Sandwich aus Antikörpern. Dann wurde ein Streptavidin-Phycoerythrin Reporter Komplex zugegeben, der an die biotinylierten Detektionsantikörper auf der Oberfläche der Beads binden kann. Die Fluoreszenzsignale der individuell gefärbten Beads und des Reporter Komplexes konnten mittels eines flow-based Microreader Systems gemessen werden (Luminex xMap Technologie, Bio-Rad Bio-Plex System). Die spezifischen Farben der Beads ermöglichten die Identifizierung des Zielmoleküls und die Menge der gebundenen biotinylierten Antikörper erlaubte Rückschlüsse auf die Konzentration.

Die aufgenommenen Daten wurden mit der Software Bio-Plex Manager Version 4.1.1 ausgewertet.

2.3.15.1. Zytokinquantifizierung mittels eines Bio-Plex Pro™ Assays

Eine erste Messung der Zytokinkonzentrationen wurde nach den Anweisungen Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Kits durchgeführt, jedoch war der Kit nicht sensibel genug und viele Konzentrationen lagen unterhalb der Detektionsgrenze.

2.3.15.2. Zytokinquantifizierung mittels eines Milliplex Human Cytokine Assays

Für eine weitere Zytokinmessung wurde der sensiblere Milliplex® Human Cytokine Immunoassay verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Anweisungen des Herstellers.

2.3.16. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion international AG, Martinsried, Deutschland hergestellt (Tabelle 2-11). Die Schmelztemperaturen wurden mit folgender Formel von Metabion berechnet: $100.5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) - (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16.6 * \log_{10}([Na+])$.

Tabelle 2-11: Verwendete Oligonukleotide mit Sequenz und Schmelztemperatur

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Schmelztemperatur [°C]
<i>GPR109b</i> _fwd	TCTATTTCAACACCCTGA	59
<i>GPR109b</i> _rev	CCGATTCATGAGTGCAGC	59

2.3.17. RNA-Isolation

Für die Isolierung der RNA wurden die Zellkulturproben durch Zugabe von RLT Puffer (Bestandteil des RNeasy Mini Kit) lysiert. Die Lysate wurden entweder zur Kurzzeitlagerung bei -20°C eingefroren oder sofort verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Anweisungen des RNeasy Mini Kit (Qiagen).

2.3.18. RNA-Qualitätssicherung

Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde mittels Absorptionsmessungen in einem Spektrophotometer überprüft (Nanodrop ND- 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Akzeptable Werte wurden definiert als 260/280 nm Verhältnisse von über 1,8 und 260/230 nm Verhältnisse zwischen 1,8 und 2,2. Die isolierte RNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

2.3.19. mRNA-Analyse

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und die Qualität getestet wie in den Kapiteln 2.3.17 und 2.3.18 beschrieben. Erfüllte die gewonnene RNA die Qualitätskriterien, so wurde nach Anleitung des Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) die genomische DNA eliminiert.

2.3.20. Quantifizierung der mRNA-Menge mit RT-qPCR

Mit dem Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) wurde die Umschreibung der RNA in cDNA durchgeführt. Dabei wurde nach Anweisungen des Herstellers vorgegangen und Quantiscript RT Puffer (enthält dNTP), RT Primer Mix, Quantiscript Reverse Transcriptase mit 1µg RNA pro Reaktion vereinigt. Dann folgten zwei Inkubationsschritte, 15 min bei 42°C und zur Inaktivierung der Reversen Transcriptase 3 min bei 95°C.

Für die real-time qPCR wurden der Power SYBR® Green Master Mix verwendet. Dieser enthält SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTP, eine passive Referenz (ROX) and Puffer Komponenten. Die optimierten Reaktions- und Zyklusbedingungen sind in Tabelle 2-12 und Tabelle 2-13 dargestellt.

Tabelle 2-12: Optimierte Reaktionsbedingungen für die real-time qPCR Versuch

Reagenz	Volumen [μl]	<i>GPR109b</i>
Power SYBR Green Mix	10	
cDNA	1	
Primer forward	2	500 nM
Pimer reverse	2	500 nM
Nuklease-freies Wasser	5	
gesamt	20	

Tabelle 2-13: Thermische Reaktionsbedingungen für die real-time qPCR Versuche

	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholungen
1	Initiale Denaturierung und Enzymaktivierung	95	10:00	1
2	Denaturierung	95	0:15	40
	Annealing und Extension	60	0:30	
3	Finale Extension	60	1:00	1
4	Denaturierung	95	1:00	1
5		55	0:30	1
6	Dissoziationskurve	55-95	0:10	80

Mittels Gelelektrophorese wurde anschließend die korrekte Größe der PCR-Produkte getestet, wobei 2,5% Agarose in 1x TAE Puffer mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid verwendet wurde. Die Laufzeit betrug ~90 min bei 100 V. Ein 50-bp-Marker in einer Konzentration von 0,5 μ g/well wurde zur Größenunterscheidung aufgetragen.

2.3.21. Statistische Auswertung

Die Signifikanzanalysen erfolgten nach Abzug der jeweiligen Kontrollen und Normierung mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, Californien, USA). Als statistische Testverfahren wurden einmal die Student-t-Verteilung angewandt, und überall wo geeignet, wurde der Datensatz mit dem Kruskal-Wallis Test nicht parametrischen ANOVA ausgewertet. Der Dunn's Multiple Comparison Test folgte dabei als post-hoc Test. Die Standardabweichung des Mittelwertes (Mittelwert + STABW) gibt die Streuung der Messwerte wieder. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (Tabelle 2-14 und Tabelle 2-15).

Tabelle 2-14: Signifikanzgrenzen der Studen-t-Verteilung

p-Wert	Signifikanzannahme	Graphische Darstellung
$p > 0.05$	nicht signifikant	
$p \leq 0.05$	signifikant	*
$p \leq 0.005$	sehr signifikant	**
$p \leq 0.0005$	höchst signifikant	***

Tabelle 2-15: Signifikanzgrenzen des Dunn's Multiple Comparison Test

p-Wert	Signifikanzannahme	Graphische Darstellung
$p > 0.05$	nicht signifikant	
$p < 0.05$	signifikant	*
$p < 0.01$	sehr signifikant	**
$p < 0.001$	höchst signifikant	***

3. ERGEBNISSE

3.1. Etablierung geeigneter Screening Systeme

3.1.1. Stimulation von humanen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit probiotischen Überständen

3.1.1.1. CCL17-Sekretion von humanen L-428 und KM-H2 Zellen

In einem Screening System für probiotische Aktivität sollte das allergiespezifische Chemokin CCL17 (thymus and activation regulated chemokine TARC) als Messparameter dienen. Dafür wurden die humanen Hodgkin Lymphom Zelllinien L-428 und KM-H2 eingesetzt, die konstitutiv große Mengen dieses Chemokins sezernieren. Zunächst wurde diese konstitutive Sekretion beider Zelllinien überprüft. Dafür wurden L-428 und KM-H2 Zellen der Passagen 3, 6 und 12 in einer Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/1 ml kultiviert und nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h wurde das Chemokin CCL17 in den Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 3-1). Bei beiden Zelllinien konnte CCL17 in den Zellkulturüberständen in großer Menge detektiert werden, wobei bei den L-428 Zellen die Konzentration beinahe doppelt so hoch war wie bei den KM-H2 Zellen. Darüberhinaus zeigten die L-428 Zellen große Schwankungen in der konstitutiven CCL17 Sekretion, sowohl zwischen unterschiedlichen aber dennoch vergleichbaren Passagen als auch innerhalb ein und derselben Passage, was an der großen Standardabweichung deutlich wird. Im Gegensatz dazu präsentierten sich die KM-H2 Zellen sehr homogen in ihrer CCL17-Sekretion, sowohl in den unterschiedlichen Passagen 3, 6 und 12, als auch innerhalb einer Passage. Aufgrund dieser Tatsachen wurden die KM-H2 Zellen in den getesteten Passagen für das Screening System ausgewählt.

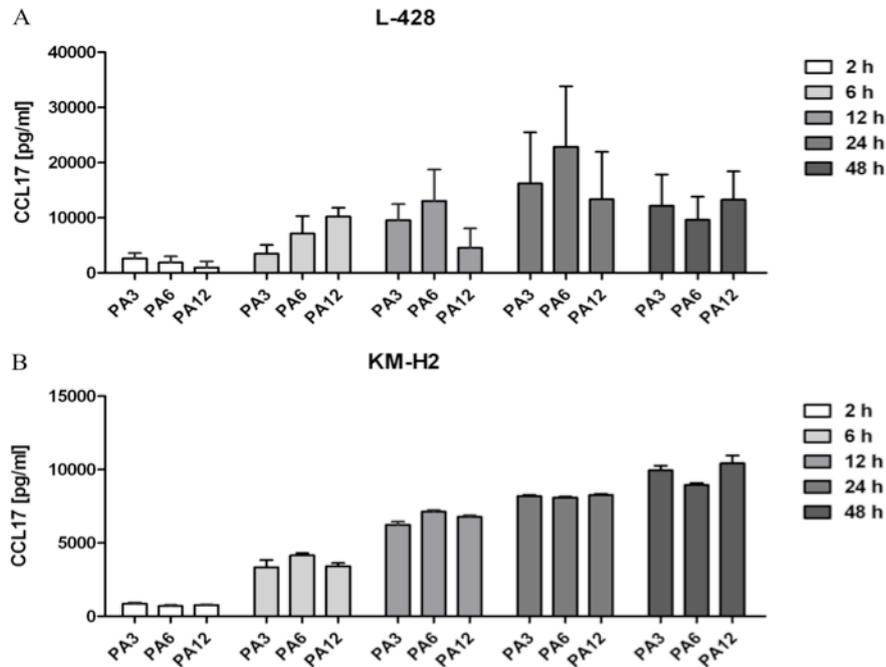


Abbildung 3-1: CCL17-Quantifizierung in den Überständen unbehandelter humaner Hodgkin Lymphom Zellen.

Humane (A) L-428 Zellen und (B) KM-H2 Zellen wurden in den Passagen (PA) 3, 6 und 12 unter Standardbedingungen kultiviert und nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h wurden die zellfreien Überstände abgenommen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils n=5 dar.

3.1.1.1.1. Einfluss probiotischer Überstände auf die CCL17-Sekretion von KM-H2-Zellen

In diesem Screening System sollte der Effekt von probiotischen Überständen auf die CCL17-Sekretion humaner KM-H2 Zellen untersucht werden. Als positives Screening Resultat war eine inhibierende Wirkung der bakteriellen Überstände auf die CCL17-Sekretion zu erwarten, was sich in einer Verringerung der CCL17-Proteinkonzentration nach Behandlung mit den probiotischen Überständen zeigen sollte. Dafür wurden KM-H2 Zellen für 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit unterschiedlichen Mengen der Bakterienüberstände, welche in der stationären Wachstumsphase gewonnen worden waren, inkubiert. In den ersten Etablierungsversuchen wurden die Bakterien in MRS Vollmedium gezogen, damit sie bei optimalen Wachstumsbedingungen stammspezifische Stoffe produzieren und sezernieren. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die zellfreien Kulturüberstände der KM-H2 Zellen gewonnen und die CCL17-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als erster Normierungsbezug diente jeweils ein KM-H2 Ansatz, der nur mit der entsprechenden Menge an purem MRS Bakterienmedium versetzt wurde, um Verdünnungseffekte der eingesetzten Bakterienüberstände auszugleichen. Die so korrigierten CCL17-Werte wurden dann auf eine

unbehandelte Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion normiert. Nachfolgend werden repräsentativ die Daten der Überstände von LGG und DSM20021 graphisch dargestellt (Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3). Die Ergebnisse der restlichen Stämme werden der Übersicht halber nur beschrieben und die Abbildungen finden sich im Kapitel 6 (Abbildung 6-1 bis Abbildung 6-6). Die CCL17-Konzentration zeigte sich in den Absolutmengen des MRS Vollmediums unverändert, das Bakterienmedium MRS hatte also keinen Effekt auf die CCL17-Sekretion der KM-H2 Zellen (Abbildung 3-4). Die einzelnen Bakterienstämme zeigten eine stammspezifische Suppressionskinetik hinsichtlich der Inkubationsdauer und des Stimulationsvolumens. Während der nicht-probiotische DSM 20021 als Negativkontrolle bei keiner Inkubationsdauer und keinem Stimulationsvolumen Auswirkungen auf die CCL17-Sekretion der KM-H2 Zellen hatte (Abbildung 3-3), führte der Überstand der probiotischen Positivkontrolle LGG schon nach 12 h ab einem Stimulationsvolumen von 100 µl zu einer signifikanten Herabregulation der CCL17-Sekretion (Abbildung 3-2). Diese Suppression nach 12 h erreichte ab eingesetzten 250 µl Bakterienüberstand mit ca. 70% der konstitutiven Sekretion ihren Sättigungswert. Der gesättigte Minimalwert stellte sich nach 24 h Inkubationsdauer und ab 250 µl Bakterienüberstand ein mit ca. 30% der konstitutiven CCL17-Sekretion. Nach 48 h Inkubationsdauer erholte sich der CCL17 Level bei den aktiven Stimulationsvolumina ab 50 µl wieder leicht auf ca. 60% des Ausgangswertes. Die Überstände der Stämme LA-2 und BB-46 zeigten ein ganz ähnliches Verhalten mit signifikanter Verringerung der CCL17-Konzentration nach 12 h, 24 h und 48 h (Abbildung 6-1 und Abbildung 6-5). Der Überstand von LA-2 erreichte nach 12 h ab 150 µl eine signifikante Reduktion der CCL17-Konzentration mit einem Minimalwert von ca. 70% der CCL17-Ausgangskonzentration. Nach 24 h Inkubationsdauer wurde schon ab 50 µl Überstand der CCL17-Level signifikant erniedrigt, wobei ab 200 µl der niedrigste Wert von ca. 25% der konstitutiven CCL17-Sekretion erreicht wurde. Ab einem Überstandvolumen von 150 µl wurde nach 48 h noch eine statistisch relevante CCL17-Erniedrigung verzeichnet, wobei ab 200 µl der Minimalwert von 80% der Ausgangskonzentration gemessen wurde. Ähnliche Werte wurden auch beim Überstand des Stammes BB-46 beobachtet, der nach 12 h ab 50 µl CCL17 im KM-H2 Überstand signifikant verringerte und ab 200 µl waren die niedrigsten Werte mit 85% der konstitutiven Sekretion erreicht. Nach 24 h Inkubationsdauer regulierten Überstandsmengen schon ab 50 µl die Chemokinsekretion deutlich herab, wobei der Spitzenwert von ca. 25% ab 200 µl zu sehen war. Inkubierte man die KM-H2 Zellen für 48 h mit dem BB-46 Überstand, so zeigte sich ab 100 µl eine signifikante Erniedrigung der CCL17 Menge, ab 200 µl

veränderte sie sich mit durchgehenden 80% nicht mehr. Die Überstände der Stämme LA-5, BB-12 und BB-420 wiesen ein zueinander sehr ähnliches Verhalten auf, sie regulierten die CCL17-Sekretion nur nach 24 h und 48 h Inkubationsdauer signifikant herab (Abbildung 6-2, Abbildung 6-4 und Abbildung 6-6). Nach 24 h verringerte der Überstand von LA-5 ab 100 µl die CCL17-Konzentration, ab 200 µl pendelte sich der Wert bei ca. 25% ein. Nach 48 h war ab 200 µl eine deutliche Chemokinverringerng zu verzeichnen, die ab 250 µl den Sättigungswert von 80% erreichte. Bei dem Stamm BB-12 reichten nach 24 h 50 µl des Überstandes, um eine relevante Herabregulation der CCL17 Konzentration zu verzeichnen, ab 200 µl sank diese auf ca. 20% der Ausgangskonzentration ab. Bei einer Inkubationsdauer von 48 h erzielten 100 µl des Bakterienüberstandes eine signifikante CCL17-Reduktion, die ab 150 µl um den Minimalwert von 80% pendelte. Bei dem Überstand von BB-420 setzte nach 24 h ab 100 µl eine signifikante Inhibierung der CCL17-Sekretion ein, die ab 200 µl auf 30% der konstitutiven Sekretion fiel. Nach 48 h wurde die Sekretion ab 150 µl Bakterienüberstand deutlich verringert und erreichte ab ebenfalls 200 µl den Sättigungswert von ca. 80%. Allein der Stamm LC-01 stach mit einer signifikanten Herabregulation ab 100 µl nach nur 24 h heraus, jedoch erzielte er ähnliche Mindestwerte von ca. 25% ab 200 µl wie alle anderen probiotischen Stämme (Abbildung 6-3).

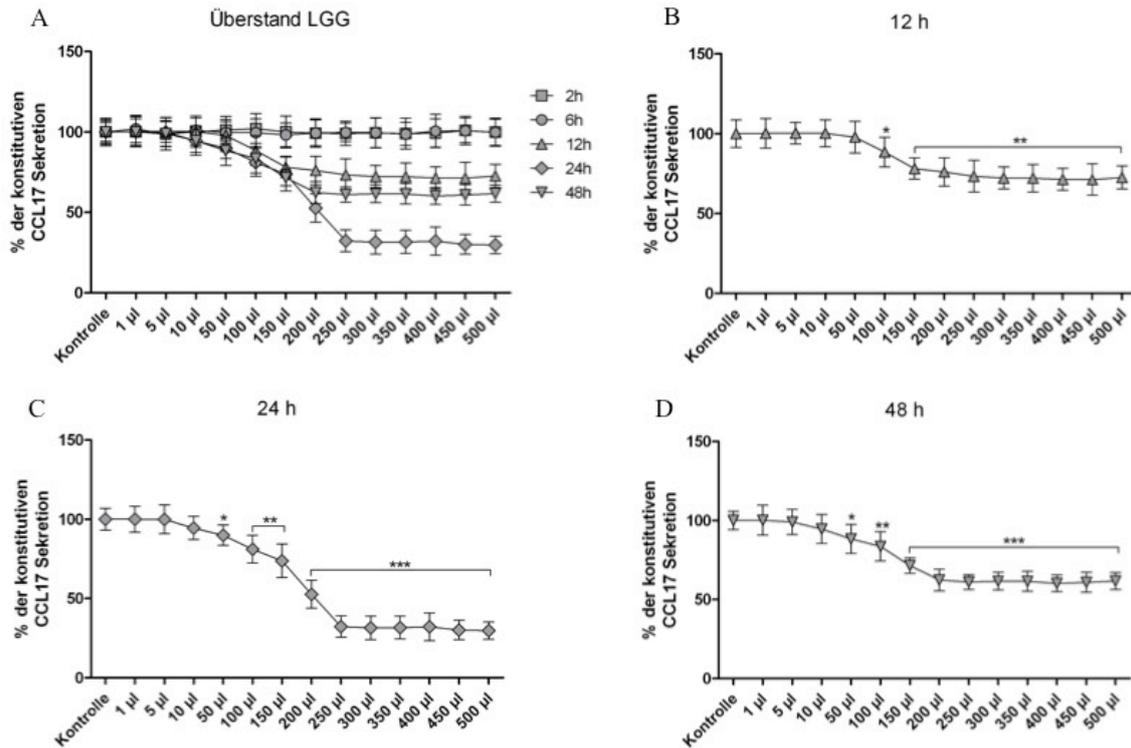


Abbildung 3-2: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* LGG.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur jeweils die Inkubationsdauern 12 h, 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17-Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

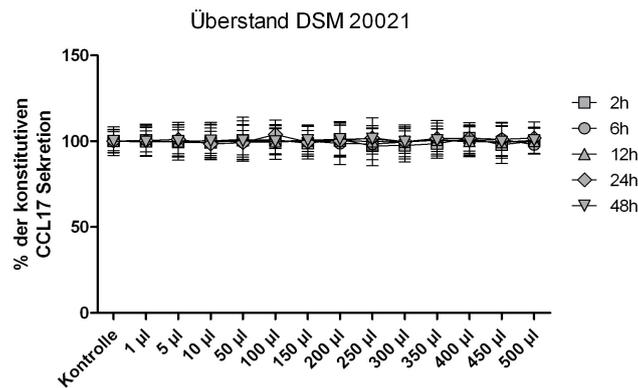


Abbildung 3-3: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar.

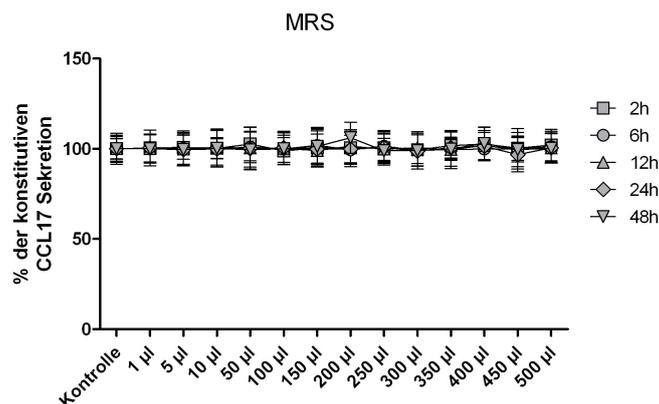


Abbildung 3-4: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Bakterienvollmedium MRS.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienmediums MRS inkubiert. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar.

Für die nächsten Versuche wurden die Bakterienstämme nun in definiertem CDM1 Medium kultiviert, da es für nachfolgende hochsensitive chemische Analysemethoden wie z.B. die Massenspektrometrie notwendig ist, möglichst wenige Signale aus den Medienbestandteilen zu erhalten. Wichtig war es nun festzustellen, ob die in definiertem Medium gewachsenen Stämme ein, den in Vollmedium gewachsenen vergleichbares Suppressionsverhalten zeigen. Der Versuchsaufbau war identisch zu dem oben beschriebenen, nur dienten als erste Normierungskontrollen diesmal die Kulturüberstände von KM-H2 Zellen, die mit

entsprechenden Mengen an CDM1 Minimalmedium versehen wurden. Nachfolgend werden wieder repräsentativ die Daten der Überstände von LGG und DSM 20021 graphisch dargestellt (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Die Ergebnisse der restlichen Stämme werden der Übersicht halber nur beschrieben und die Abbildungen finden sich im Kapitel 6 (Abbildung 6-7 bis Abbildung 6-12). Es konnte festgestellt werden, dass es keinen Unterschied machte, ob die Stämme in definiertem CDM1 oder MRS Vollmedium gezogen wurden; sie zeigten ein nahezu identisches CCL17-Suppressionsverhalten. Auch das definierte CDM1 Medium übte, wie auch schon das MRS Vollmedium, keinen Einfluß auf die CCL17-Sekretion der KM-H2 Zellen aus (Abbildung 3-7).

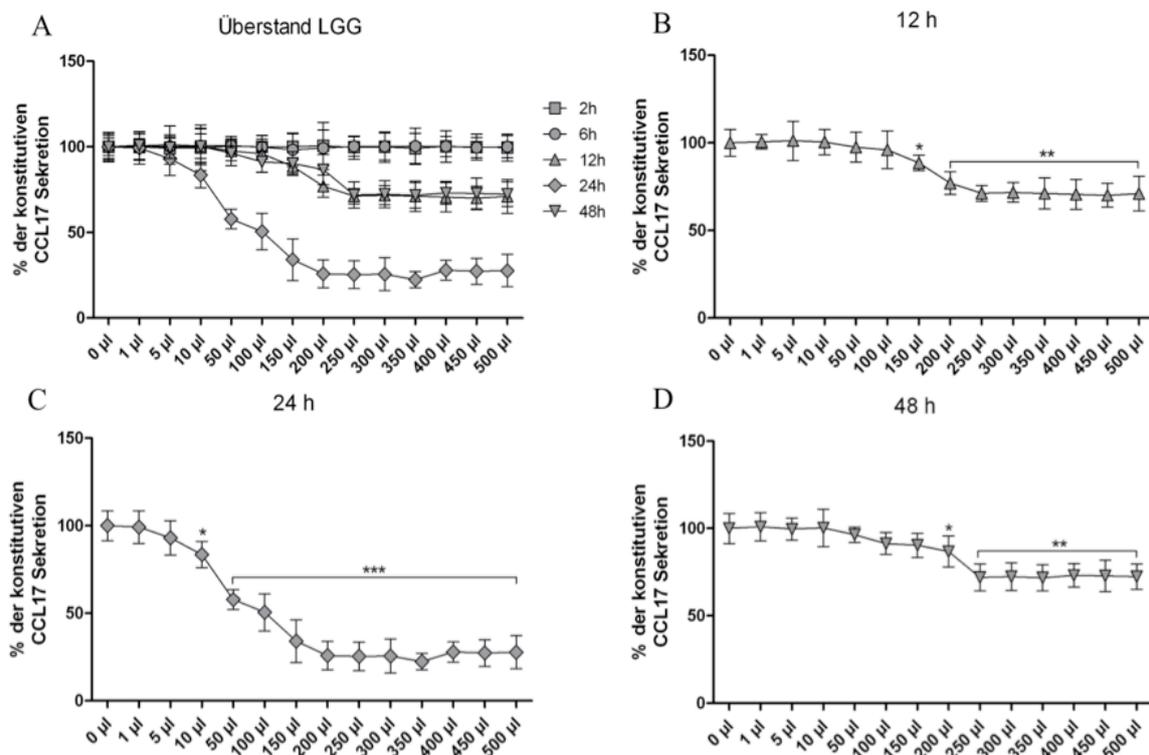


Abbildung 3-5: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* LGG.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur jeweils die Inkubationsdauern herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17-Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.005 und ***p ≤ 0.0005. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

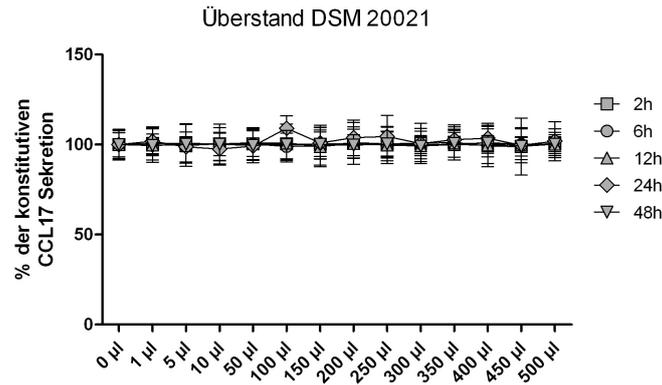


Abbildung 3-6: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar.

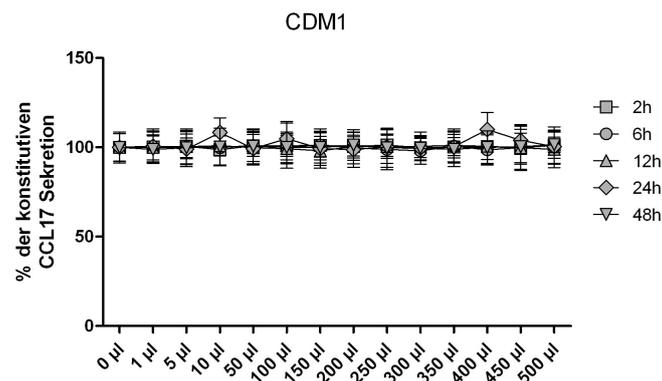


Abbildung 3-7: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem definierten Bakterienmedium CDM1.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienmediums CDM1 inkubiert. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des nun etablierten KM-H2 Screening Systems in allen Überständen der sieben bereits als Probiotika definierten Stämme Aktivität gefunden wurde. Die einzelnen Bakterienspezies zeigen ein stammspezifisches Suppressionsprofil, wobei allen gemeinsam ist, dass das maximale Inhibierungspotential nach 24 h und ab einer eingesetzten Überstandsmenge von 200 μ l eintritt. Deshalb wurden diese zwei Parameter für alle folgenden Versuche mit dem KM-H2 Screening System beibehalten.

3.1.1.1.2. Vitalität der KM-H2 Zellen unter Stimulation mit probiotischen Überständen

Um toxische Effekte der Bakterienüberstände auf die KM-H2 Zellen ausschließen zu können, wurden verschiedene Vitalitätstest durchgeführt. Es wurden mit den Überständen stimulierte KM-H2 Zellen mit Trypanblau angefärbt und lichtmikroskopisch mit unbehandelten Zellen verglichen und die toten bzw. lebenden Zellen wurden ausgezählt (Abbildung 3-8 A). Für einen weiteren Vitalitätstest wurden die stimulierten KM-H2 Zellen mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3-8 B). In einem dritten Test wurden die stimulierten Zellen mit dem CellTiter-Blue®-Reagenz gefärbt und anschließend photometrisch auf ihre Vitalität hin untersucht (Abbildung 3-8 C). Bei keinem der drei Tests konnte eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Bakterienüberständen festgestellt werden. Somit konnten toxische Effekte der Bakterienüberstände ausgeschlossen werden.

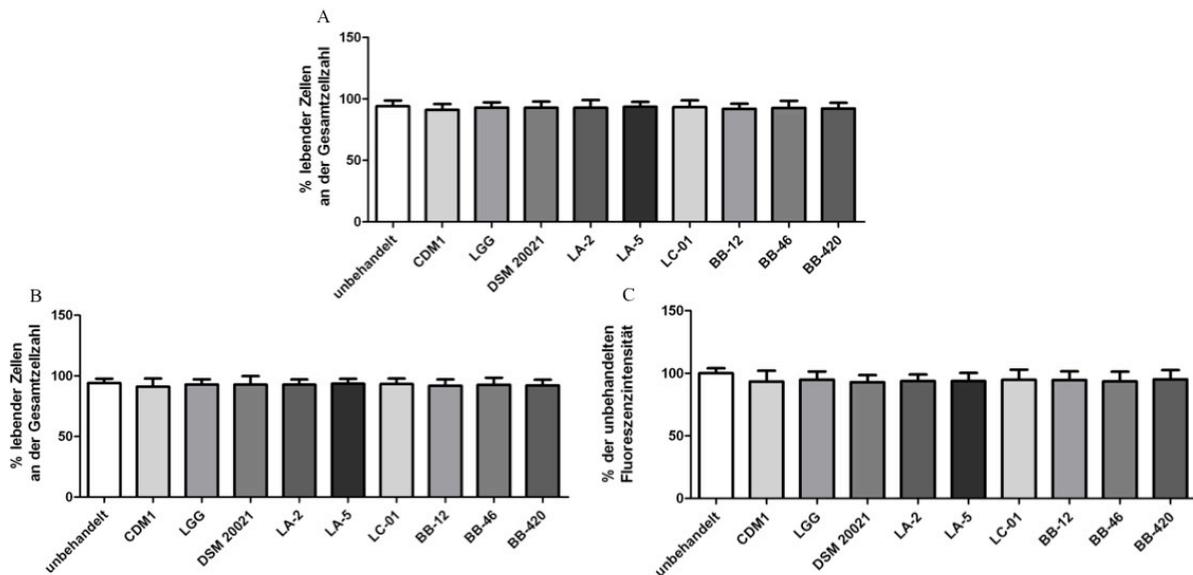


Abbildung 3-8: Vitalität der KM-H2 Zellen nach Behandlung mit probiotischen Überständen.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit 200 μ l der Bakterienüberstände oder des CDM1 Mediums für 24 h inkubiert. In (A) sind die Prozentsätze der lebenden Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach Trypanblau-Färbung mittels optischer Auszählung dargestellt, in (B) sind die Prozentsätze der lebenden Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach 7-AAD-Färbung mittels durchflußzytometrischer Analyse dargestellt und in (C) sind die relativen Veränderungen der Anzahl lebender Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mittels photometrischer Analyse (CellTiter-Blue®-Reagenz, $\lambda=590$ nm) dargestellt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar.

3.1.2. Stimulation humaner DZ mit probiotischen Überständen

3.1.2.1. Ko-Stimulation der iDZ mit LPS und probiotischen Überständen

Nach der erfolgreichen Etablierung des geeigneten Screening System mit den KM-H2 Zellen bestand die Notwendigkeit, ein Kontroll-System zu schaffen, um die positiven Screening Resultate unabhängig in einem zweiten Testsystem zu überprüfen. Dafür sollte ein Assay etabliert werden, der eine starke immunologische Aussagekraft besitzt. Deshalb fiel die Entscheidung auf humane dendritische Zellen, die als immunologische Schaltzentrale einen wichtigen Bestandteil des humanen Immunsystems ausmachen. Für das Testsystem wurden aus peripheren venösem Blut Monozyten isoliert, die mittels eines Zytokincocktails zu immaturren dendritischen Zellen (iDZ) differenziert wurden. Diese iDZ wurden dann mit LPS maturiert und gleichzeitig mit den probiotischen Überständen stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die folgenden ausgewählten Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometrie analysiert: der Maturationsmarker CD83, die kostimulatorischen Marker CD80, CD86, CD40 und das MHC-Klasse II Molekül HLA-DR.

3.1.2.1.1. Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkung die probiotischen Überstände von in MRS Medium gezogenen Bakterien auf die Anzahl von DZ haben, welche die ausgewählten Oberflächenmarker exprimieren. Nachfolgend werden repräsentativ die Daten der Überstände von LGG und DSM 20021 graphisch dargestellt (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10). Die Daten der restlichen Stämme werden der Übersicht halber nur beschrieben und die Abbildungen finden sich im Kapitel 6 (Abbildung 6-13 bis Abbildung 6-18). Die bakteriellen Überstände hatten, bis auf den Überstand von DSM 20021, keinen maturierenden Effekt auf unreife DZ, auch das Bakterienmedium MRS zeigte keinerlei Auswirkungen auf unreife und reife DZ. Es konnte aber festgestellt werden, dass alle probiotischen Überstände, außer der Negativkontrolle DSM 20021, zu einer drastischen Minimierung der Anzahl an reifen DZ führten, die für den jeweiligen untersuchten Marker positiv waren. Die CD83-exprimierende Population von LPS-gereiften DZ wurde von den Überständen im Durchschnitt auf ca. 20% reduziert, die CD80-exprimierende auf knapp unter 50%, die CD86-exprimierende auf ca. 60% und die CD40-exprimierende auf ca. 30%. Die Expression des MHC-Klasse II Moleküls

HLA-DR wurde von den Überständen nicht beeinflusst, die Expression war jedoch auch schon bei unreifen DZ sehr hoch, nahezu identisch zu der LPS-gereifter DZ.

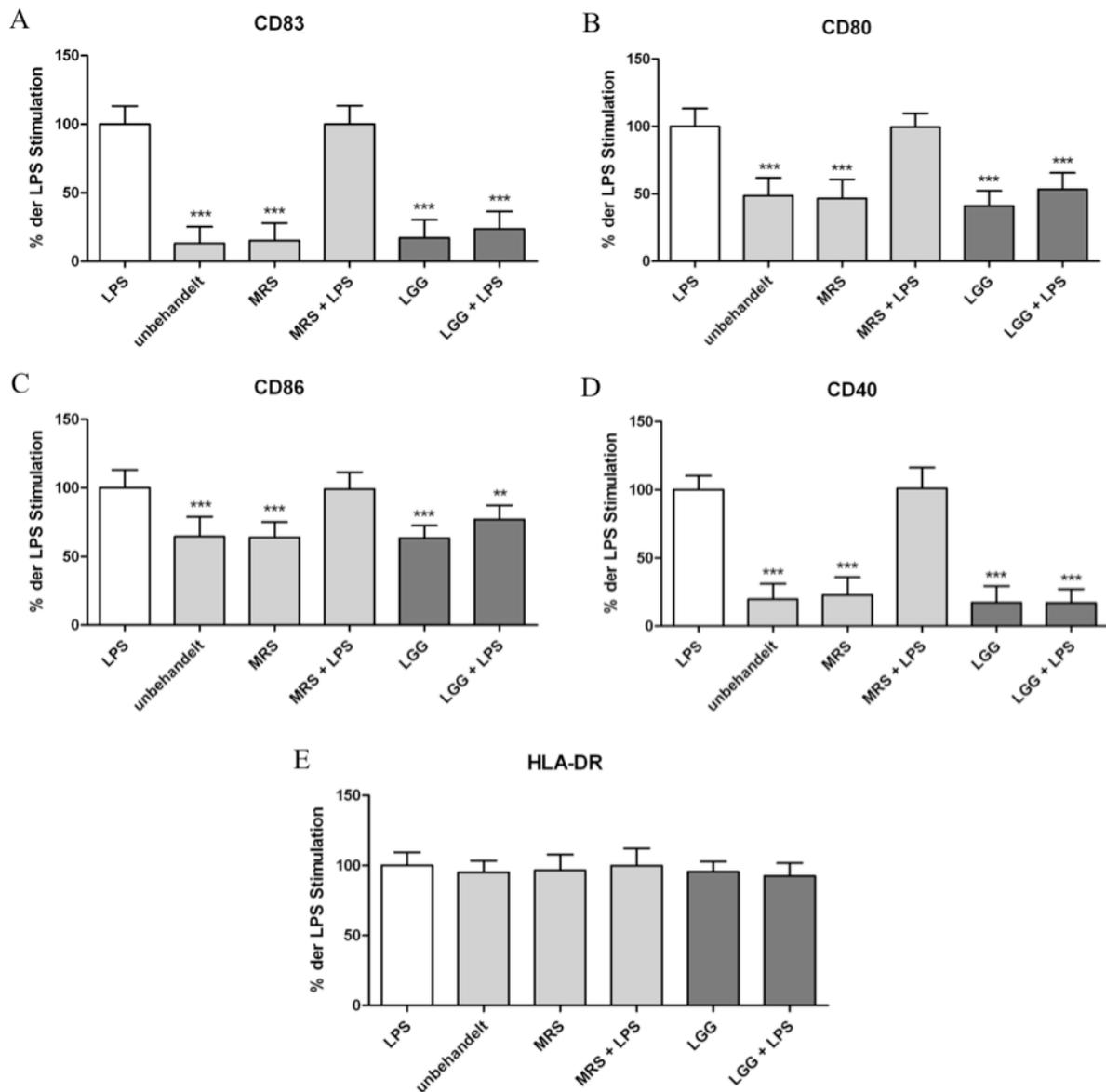


Abbildung 3-9: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 µl Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

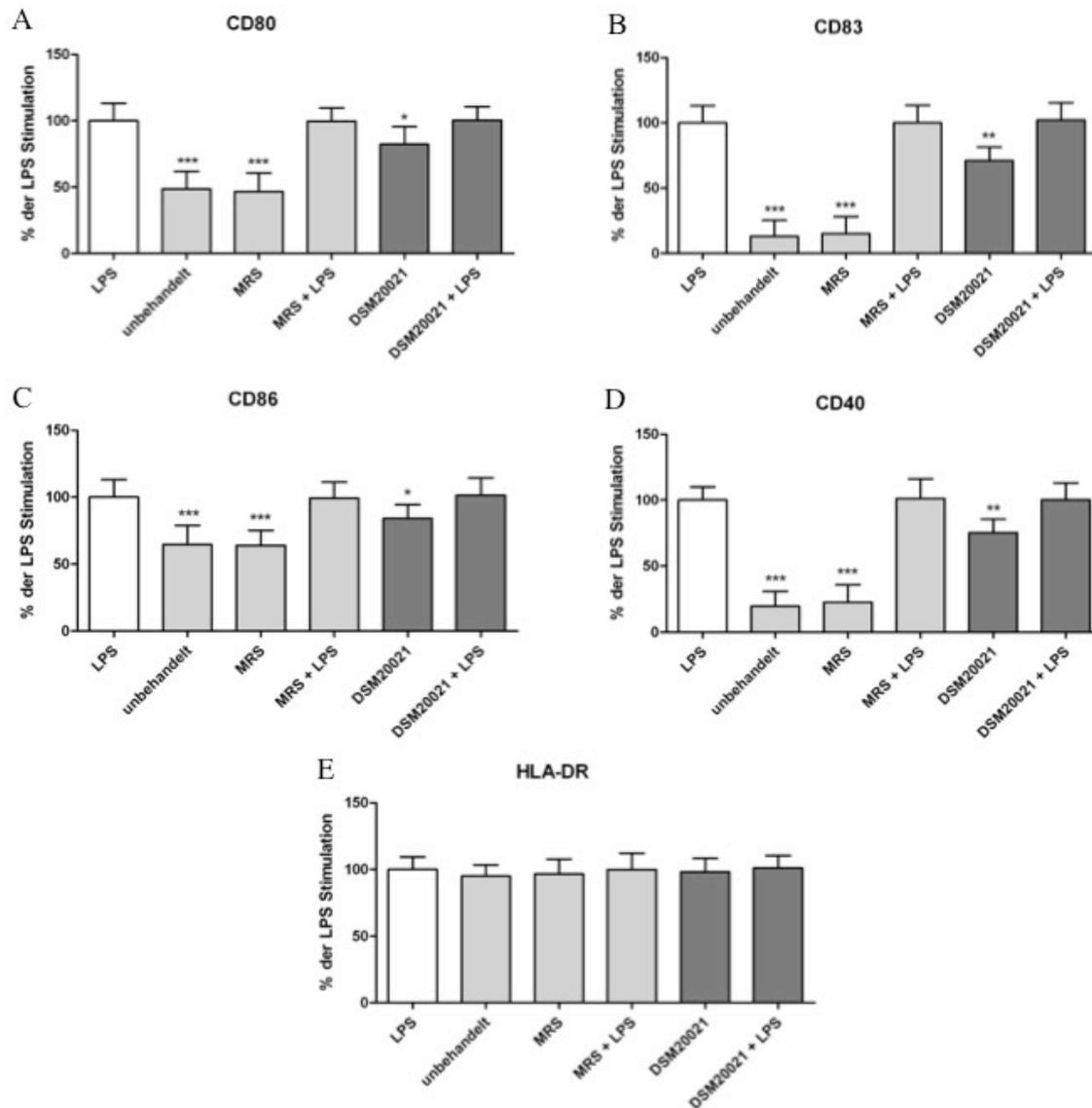


Abbildung 3-10: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* DSM20021.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD80, (B) CD83, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

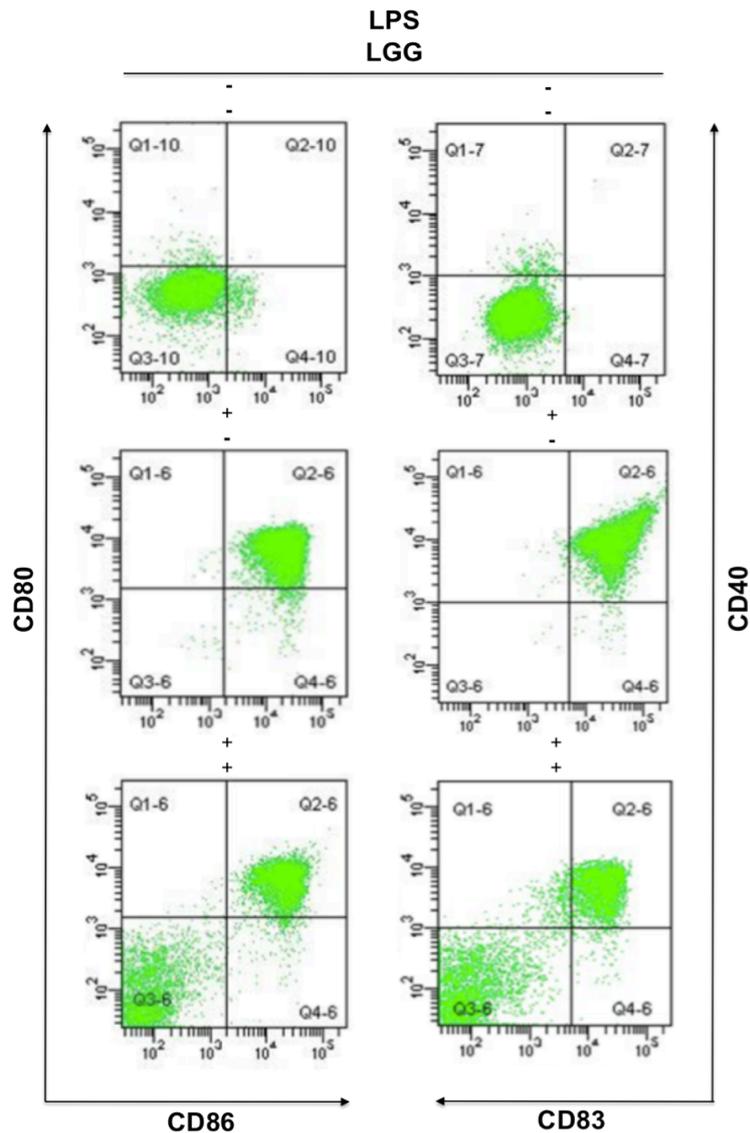


Abbildung 3-11: Punktwolken-Darstellung (Dotplot) der Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86 und CD40 durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* GG. Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 µl Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86, CD83 und CD40 durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle, LPS-gereifte als Positivkontrolle für den Aktivierungsgrad.

In Abbildung 3-11 ist repräsentativ ein Punktwolken-Diagramm von reifen DZ dargestellt, die mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* GG behandelt worden sind. Es ist klar zu sehen, dass sich die Anzahl an Marker-exprimierenden reifen DZ nach Behandlung mit dem probiotischen Überstand deutlich verringert hat, was an der Zellwolke im linken unteren Quadranten sichtbar wird.

Um sicher zu stellen, dass auch in diesem Testsystem die Überstände von probiotischen CDM1-Kulturen denselben Effekt auf die DZ ausüben, wie die Überstände der MRS-

Kulturen, wurden die humanen DZ noch einmal mit LPS und den bakteriellen CDM1-Überständen ko-inkubiert. Nachfolgend werden wieder repräsentativ die Daten der Überstände von LGG und DSM 20021 graphisch dargestellt (Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13). Die Daten der restlichen Stämme werden der Übersicht halber nur beschrieben und die Abbildungen finden sich im Kapitel 6 (Abbildung 6-19 bis Abbildung 6-24). Die probiotischen Überstände von Kulturen aus CDM1 Medium zeigten dieselben Auswirkungen wie auch schon die bakteriellen MRS-Überstände, sie führten zu einer starken Reduktion der für die untersuchten Marker positiven DZ-Population: der Aktivierungsmarker CD83 wurde ebenfalls nur noch von ca. 20% der gesamten DZ exprimiert, die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 von ca. 50%, ca. 60% und weniger als 30%. Wie auch schon das Vollmedium MRS hatte das definierte Bakterienmedium CDM1 ebenfalls keine Effekte auf naive und reife DZ.

Für alle weiteren Versuche wurden die Bakterien nur noch in dem definierten CDM1 Medium kultiviert und folglich wurden die bakteriellen Überstände dann von CDM1-Kulturen gewonnen.

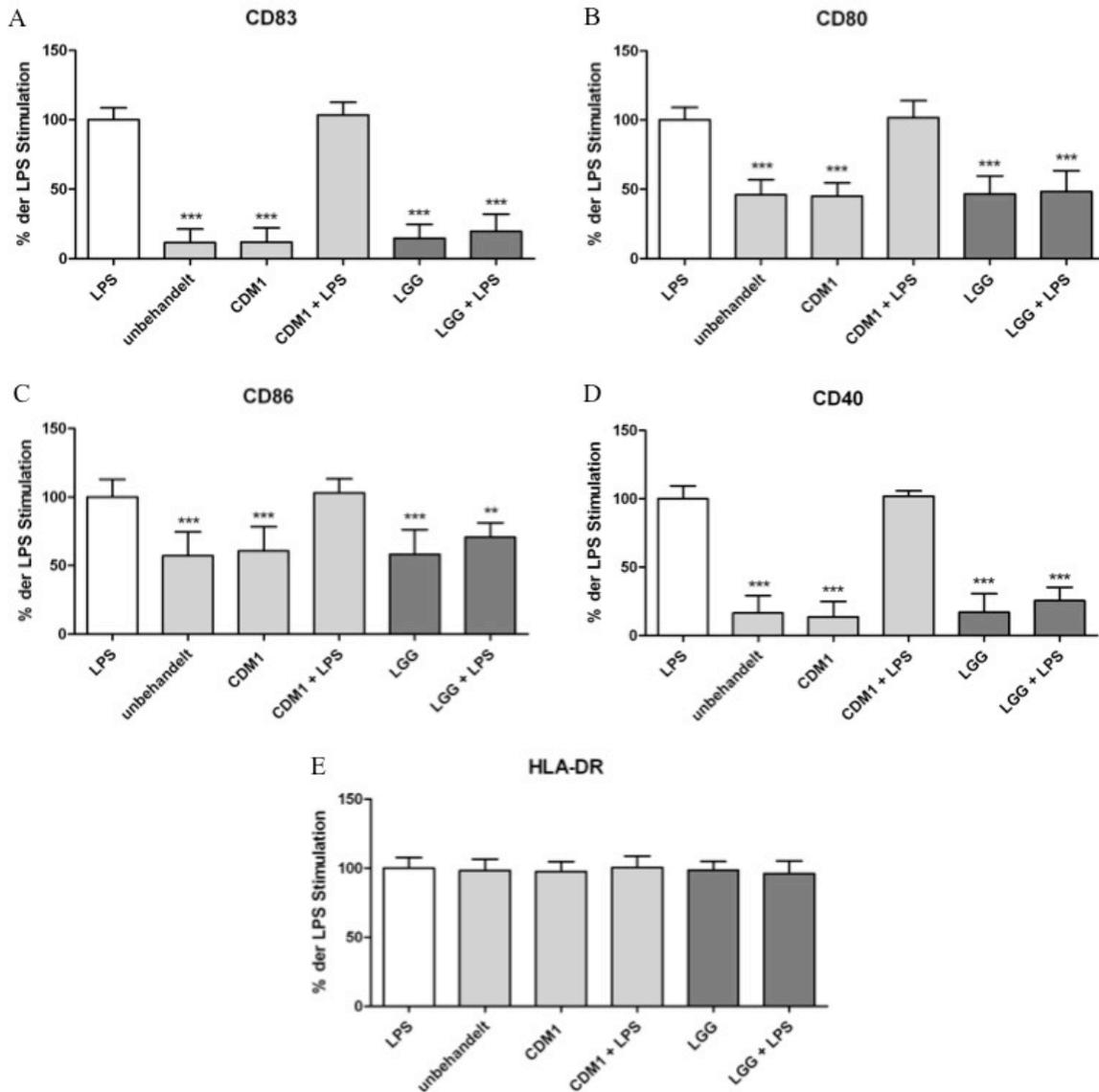


Abbildung 3-12: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

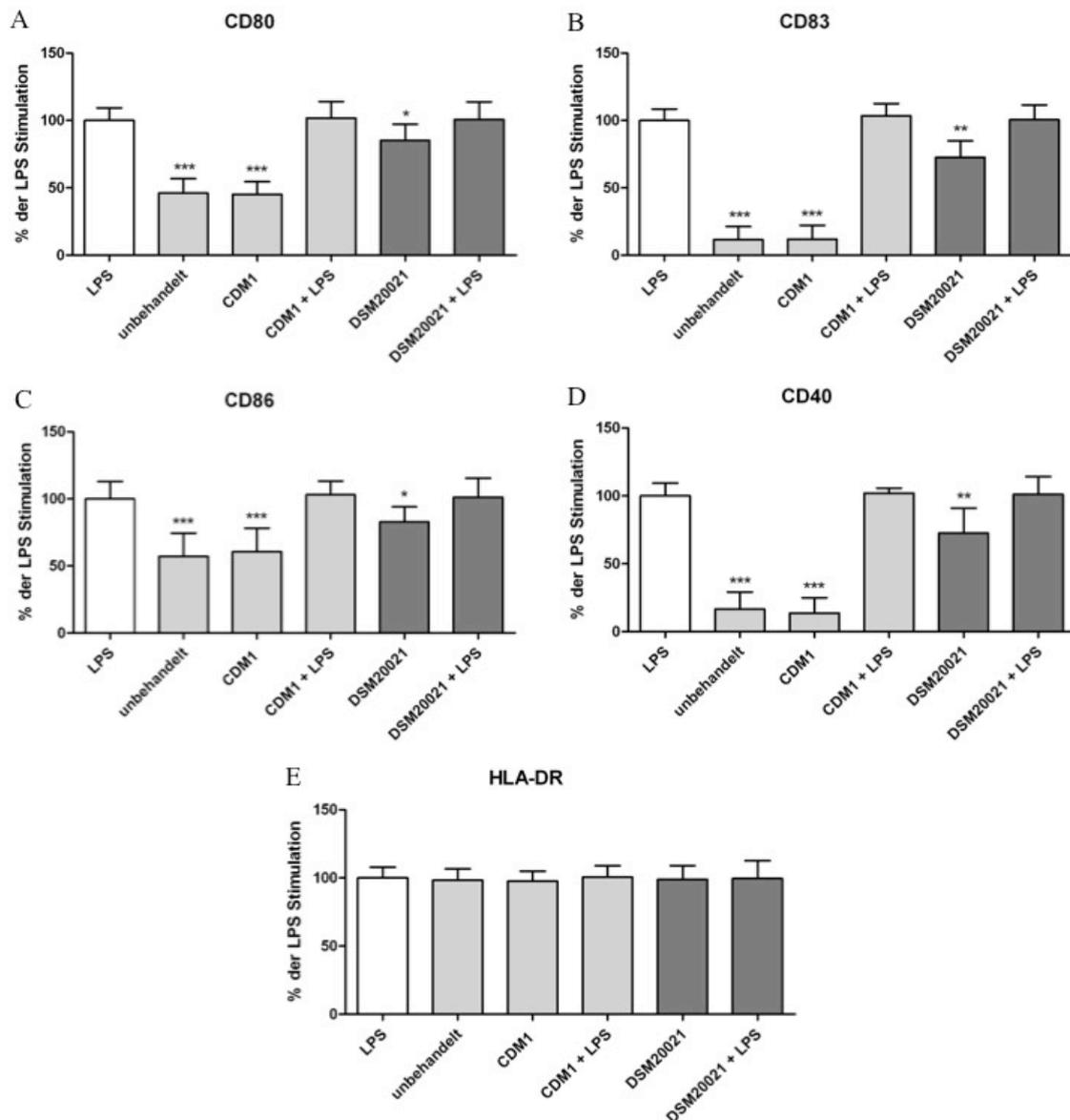


Abbildung 3-13: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD80, (B) CD83, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.1.2.1.2. MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Neben der Anzahl an DZ, welche die ausgewählten Marker nach Behandlung mit den Überständen auf ihrer Oberfläche aufwiesen, sollte nun auch die Dichte der Marker auf den positiven Zellen untersucht werden. Dazu wurde die MFI der einzelnen Proben durchflusszytometrisch erfasst und verglichen. Nachfolgend werden wieder repräsentativ die Daten der Überstände von LGG und DSM 20021 graphisch dargestellt (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15). Die Daten der restlichen Stämme werden der Übersicht halber nur beschrieben und die Abbildungen finden sich im Kapitel 6 (Abbildung 6-25 bis Abbildung 6-30). Es konnte derselbe supprimierende Effekt der probiotischen Überstände wie auch schon bezüglich der Gesamtanzahl an positiven DZ beobachtet werden - sogar noch in stärkerem Ausmaß. Die Überstände der einzelnen Lactobazillen-Stämme regulierten die Dichte des Markers CD83 im Durchschnitt auf 10% herab - verglichen mit der Dichte auf den LPS-gereiften DZ, den Marker CD80 auf ca. 15%, den Marker CD86 auf ca. 20% und den Marker CD40 auf unter 10%. Das stärkste inhibierende Potential zeigte hierbei der Überstand des Stammes *Lactobacillus paracasei* LC-01 (Abbildung 6-27), die übrigen Lactobazillen-Stämme hatten nahezu identische Effekte. Die Überstände der getesteten Bifidobakterien verhielten sich untereinander und den der Lactobazillen ganz ähnlich, wobei der Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12 die Dichte der Oberflächenmarker CD80 und CD86 auf nur ca. 25% und ca. 30% herabregulieren konnte (Abbildung 6-28). Die Dichte des Moleküls HLA-DR blieb von allen verwendeten Überständen nahezu unbeeinflusst. Auch die Negativkontrolle für Bioaktivität, Überstände von *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021, zeigten wieder kein supprimierendes Verhalten (Abbildung 3-15). Im Gegenteil, die Behandlung führte sogar bei unreifen DZ zu einer starken Expressionszunahme der Oberflächenmarker - ähnlich der unter LPS-Stimulation.

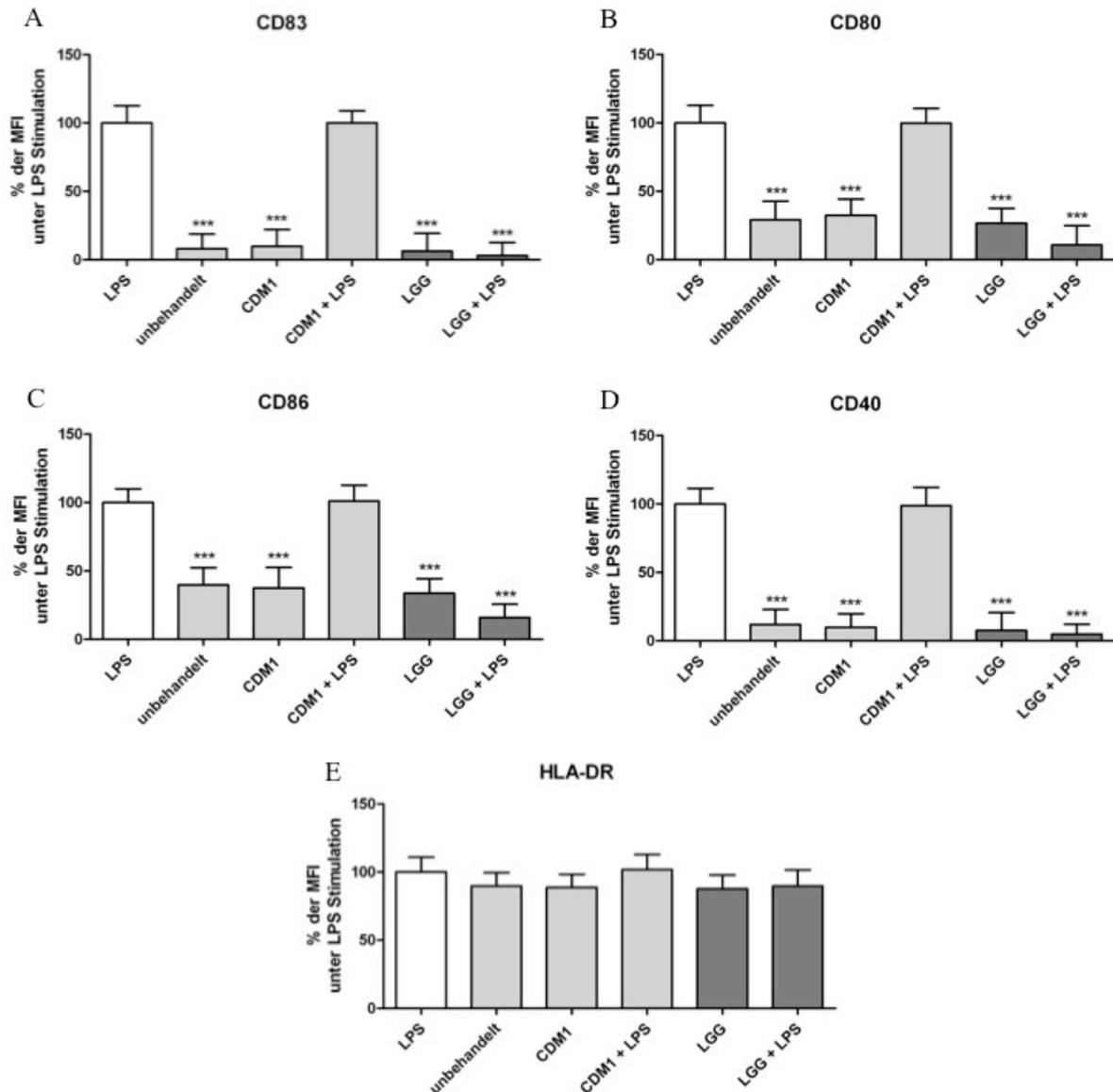


Abbildung 3-14: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflusszytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

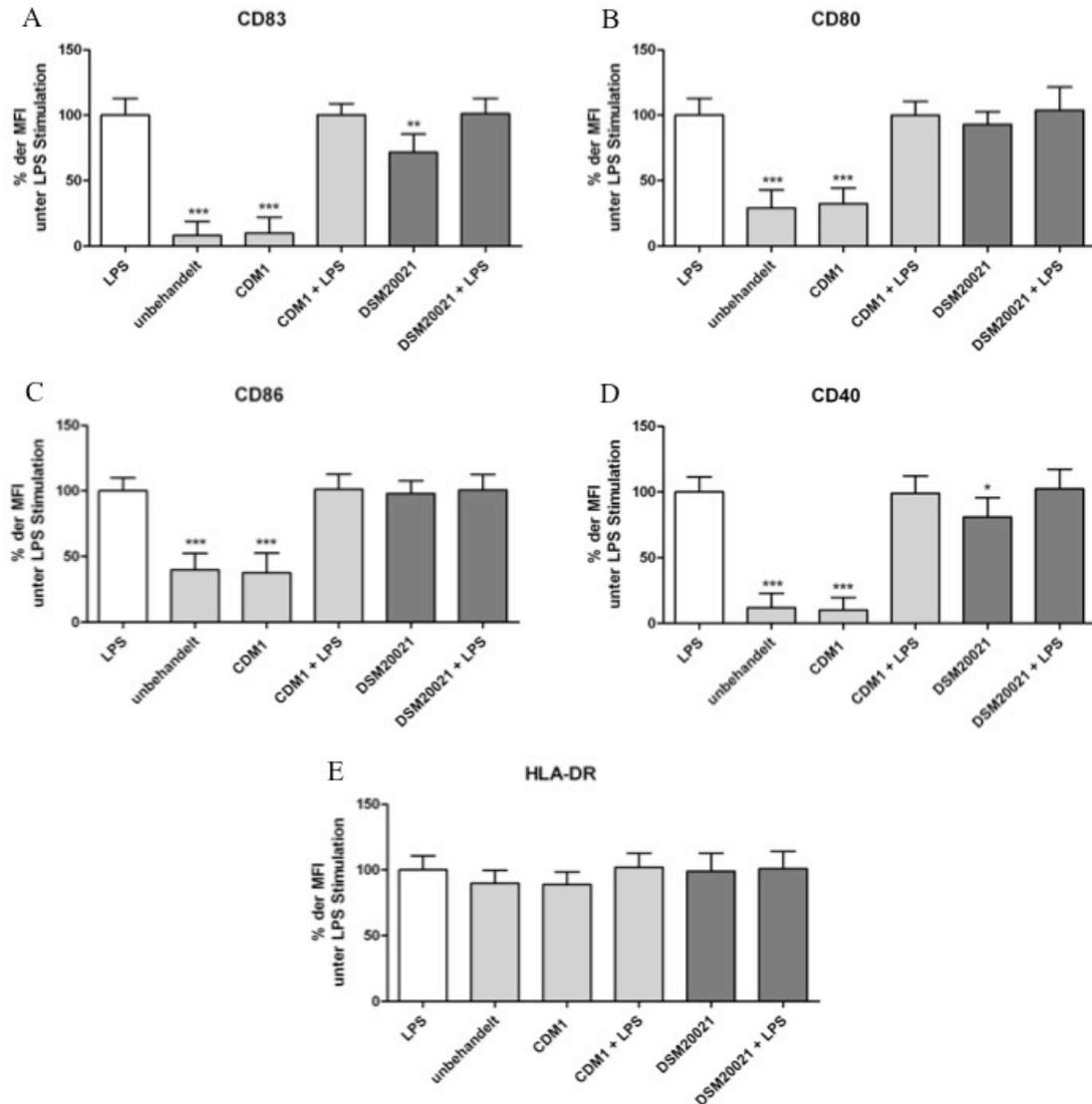


Abbildung 3-15: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD86 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflusszytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.1.2.1.3. Vitalität nach Ko-Stimulation mit LPS und probiotischen Überständen

Um ausschließen zu können, dass die bakteriellen Überstände toxisch auf die empfindlichen DZ wirken, wurden Vitalitätstest durchgeführt (Abbildung 3-16). Hierbei wurde wieder, genauso wie in Kapitel 3.1.1.1.2 bereits für die KM-H2 Zellen beschrieben, verfahren. Bei keinem der drei Tests wurde eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der DZ nach Behandlung mit den Bakterienüberständen festgestellt. Somit konnten toxische Effekte der Bakterienüberstände auch in diesem System ausgeschlossen werden.

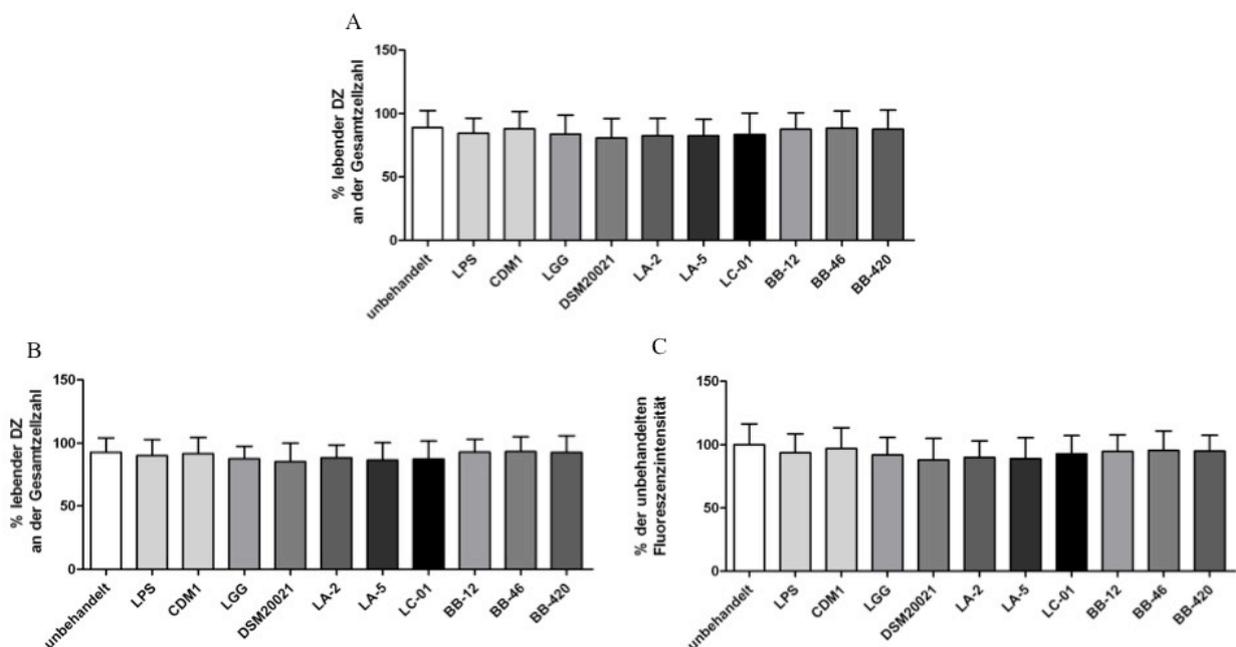


Abbildung 3-16: Vitalität von DZ nach Ko-Stimulation mit LPS und probiotischen Überständen.

Unreife humane DZ wurden mit LPS und mit 200 μ l Bakterienüberstand für 24 h inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. In (A) sind die Prozentsätze der lebenden DZ an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach Trypanblau-Färbung mittels optischer Auszählung dargestellt, in (B) sind die Prozentsätze der lebenden DZ an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach 7-AAD-Färbung mittels durchflusszytometrischer Analyse dargestellt und in (C) sind die relativen Veränderungen der Anzahl lebender DZ im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mittels photometrischer Analyse dargestellt. Als Mediumkontrolle wurden zusätzlich DZ mit LPS und mit dem purem Bakterienmedium CDM1 behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar.

3.1.2.2. Stimulation ausgereifter DZ mit probiotischen Überständen

In einem zweiten, etwas abgewandeltem Ansatz wurden die unreifen DZ für 24 h mit LPS komplett ausgereift und erst nach abgeschlossenem Maturationsprozess für weitere 24 h mit den probiotischen Überständen behandelt. Am folgenden Tag wurden dann wie bereits in den obigen Abschnitten beschrieben die ausgewählten Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert.

3.1.2.2.1. *Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ*

Es wurde die Gesamtanzahl an DZ, die für die untersuchten Marker positiv waren, nach Behandlung mit den probiotischen Überständen ermittelt (Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18). Es stellte sich heraus, dass bei diesem Versuchsaufbau, bei dem die DZ 24 h länger in Kultur gehalten wurden, die Grundexpression der untersuchten Marker höher war. Darüber hinaus war die Herabregulation der Oberflächenmarker durch die probiotischen Überstände nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei dem ersten Versuchsansatz mit der Ko-Inkubation. Im zweiten Versuchsansatz dezimierten die Überstände der getesteten Lactobazillen im Durchschnitt die CD83-positive DZ-Population auf 30% verglichen mit der Expression nur unter LPS-Stimulation, also ca. 10% weniger als im kostimulatorischen Ansatz. Die CD80⁺, CD86⁺ und CD40⁺ DZ-Populationen wurden um 20% weniger auf ca. 70%, auf knapp unter 80% und auf knapp unter 50% herabreguliert.

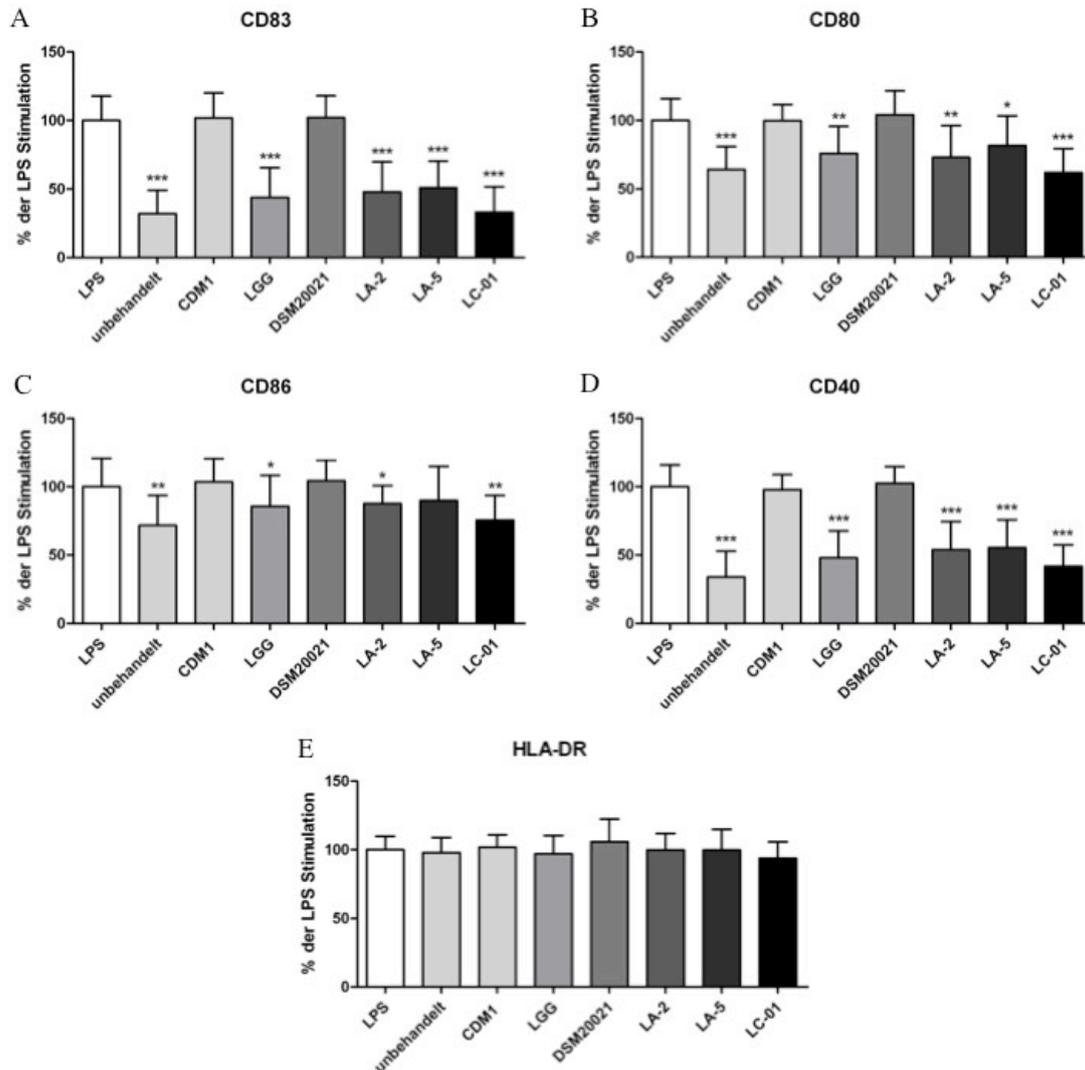


Abbildung 3-17: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch LPS-gereifte DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter *Lactobacillus* spp.

Humane unreife DZ wurden mit LPS für 24 h ausgereift. Daraufhin erfolgte eine Stimulation mit 200 μ l Bakterienüberstand. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ gerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflusszytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden mature DZ nur mit dem purem Bakterienmedium CDM1 behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

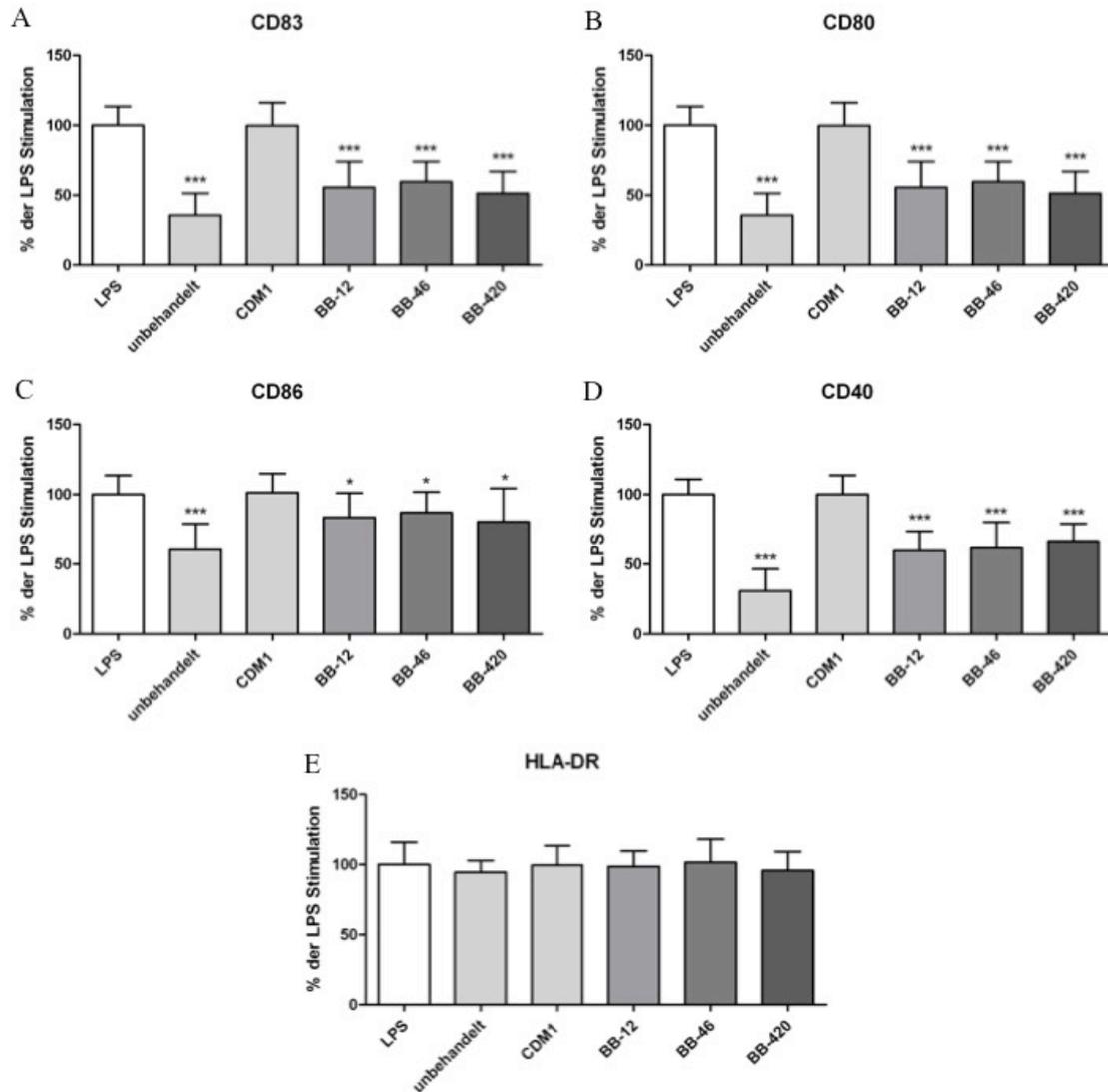


Abbildung 3-18: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch LPS-gereifte DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter *Bifidobacterium* spp.

Humane unreife DZ wurden mit LPS für 24 h ausgereift. Daraufhin erfolgte eine Stimulation mit 200 μ l Bakterienüberstand. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.1.2.2.2. *MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ*

Die Dichte-Analyse der untersuchten Marker hatte zum Ergebnis, dass auch hier der herabregulierende Effekt der probiotischen Überstände nicht mehr so stark war wie bei dem kostimulatorischem Versuchsansatz (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20). Die Überstände der Lactobazillen führten im Durchschnitt zu einer Reduktion des Markers CD83 auf knapp unter 20% verglichen mit der Expression auf den nur LPS-stimulierten DZ (Abbildung 3-19). Das bedeutete, dass im zweiten Versuchsansatz die behandelten DZ ungefähr noch doppelt so viele Oberflächenmoleküle exprimierten wie beim ersten Ansatz. Der Marker CD80 wurde auf ca. 40% verringert, was nur noch ungefähr dem 2,5 fachen des ersten Experimentes entspricht. Das Molekül CD86 wurde in seiner Dichte auf knapp unter 60% verringert, was aber noch ca. dreimal mehr ist als beim ersten Versuch. Nur bei dem kostimulatorischem Marker CD40 konnte kein so starker Unterschied festgestellt werden, hier verringerten die probiotischen Überstände die Dichte auf unter 15%, was einer Differenz von ca. 5% zu dem ersten Versuch entspricht. Die Überstände der getesteten Bifidobakterien zeigten bei den Markern CD86 und CD40 ein nahezu identisches Bild wie die Lactobazillen, während der Marker CD83 von den Überständen der Bifidobakterien auf nur ca. 40% dezimiert wurde, 30% weniger als beim ersten Versuch (Abbildung 3-20). Der Marker CD80 erreichte nach Behandlung mit den Überständen der Bifidobakterien eine Dichte von gut 50%, was ca. 10% weniger als beim ersten Versuch ist. Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Screening Experimenten die erste Versuchsvariante mit Ko-Inkubation der zweiten mit den nacheinander ablaufenden Stimulationen vorgezogen und als Testsystem weiter angewandt.

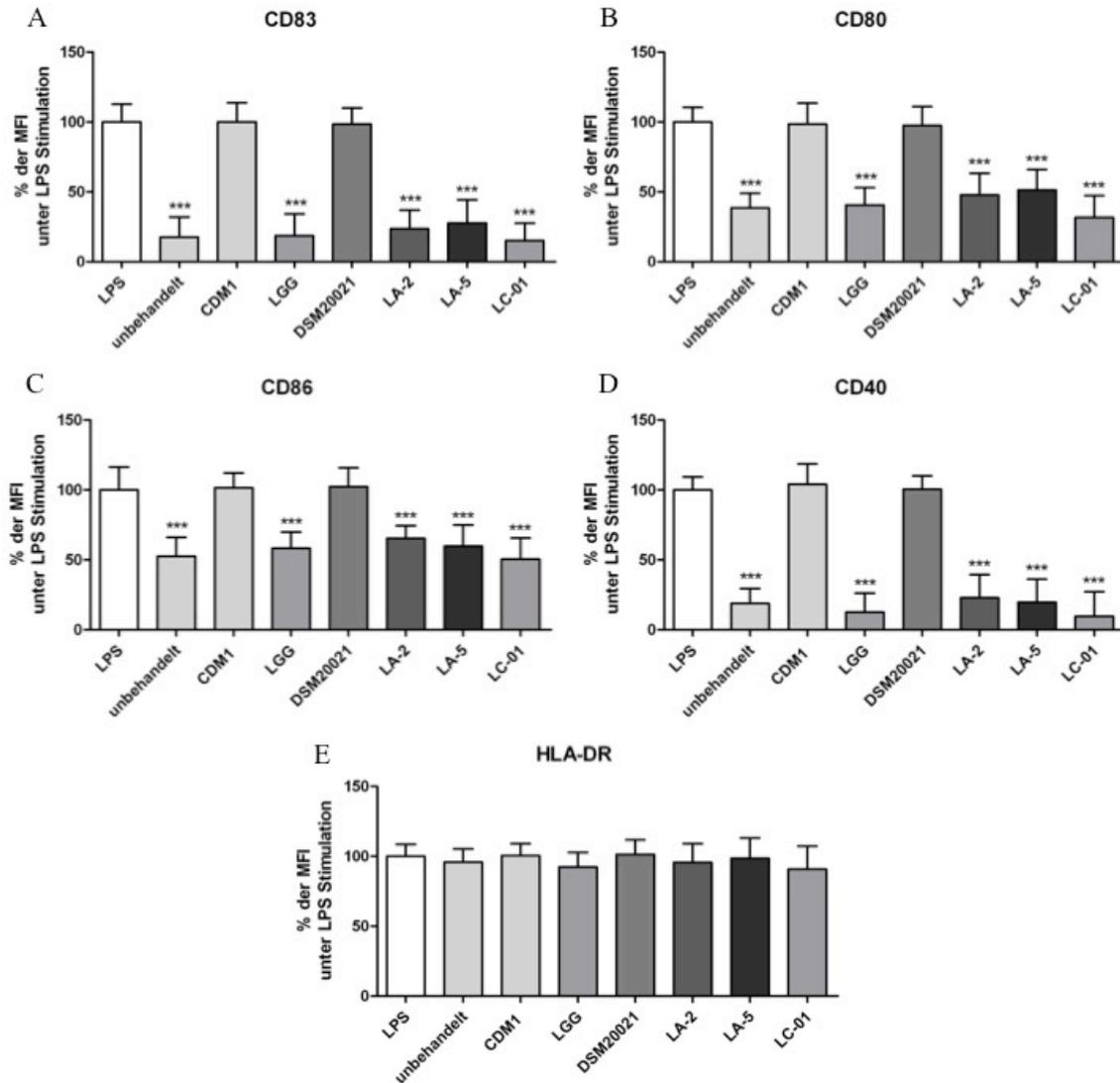


Abbildung 3-19: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter *Lactobacillus* spp.

Humane unreife DZ wurden mit LPS für 24 h ausgereift. Daraufhin erfolgte eine Stimulation mit 200 μ l Bakterienüberstand. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

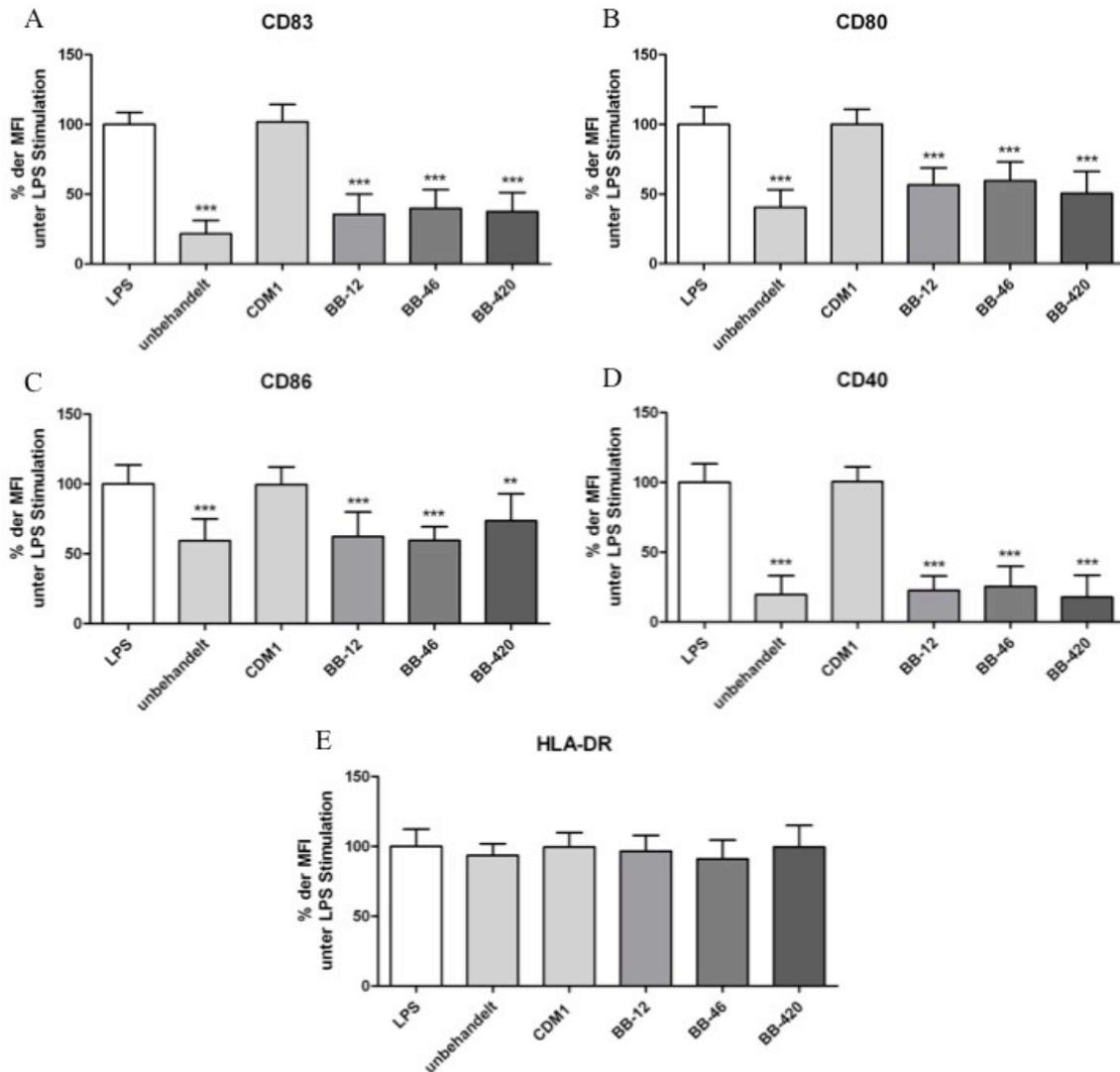


Abbildung 3-20: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter *Bifidobacterium* spp.

Humane unreife DZ wurden mit LPS für 24 h ausgereift. Daraufhin erfolgte eine Stimulation mit 200 μ l Bakterienüberstand. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.1.2.2.3. Vitalität der ausgereiften DZ nach Stimulation mit probiotischen Überständen

Auch bei dem zweiten Versuchsaufbau wurden wieder Vitalitätstest durchgeführt, um toxische Effekte der bakteriellen Überstände auf die reifen DZ ausschließen zu können (Abbildung 3-21). Hierbei wurde wieder, genauso wie in Kapitel 3.1.1.1.2 bereits für die KM-

H2 Zellen und in Kapitel 3.1.2.1.3 auch für DZ beschrieben, verfahren. Dabei konnte zwar beobachtet werden, dass die Behandlung mit den probiotischen Überständen zu keiner weiteren Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der DZ führte, jedoch war die Vitalität der DZ grundsätzlich schon beeinträchtigt, was an den Absolutwerten von nur noch ca. 60% für die unbehandelte Kontrolle in den Abbildung 3-21 A und B sichtbar wird. Eine Ausnahme bildete der Überstand des Stammes *Lactobacillus acidophilus* LA-5, bei dem in dem photometrischen Vitalitätstest eine signifikante Abnahme der Vitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen war (Abbildung 3-21 C). Offensichtlich beeinträchtigte die längere Kultivierungsdauer die Vitalität der DZ. Dies war ein weiterer Grund, weshalb in Zukunft auf diese Versuchsvariante verzichtet wurde.

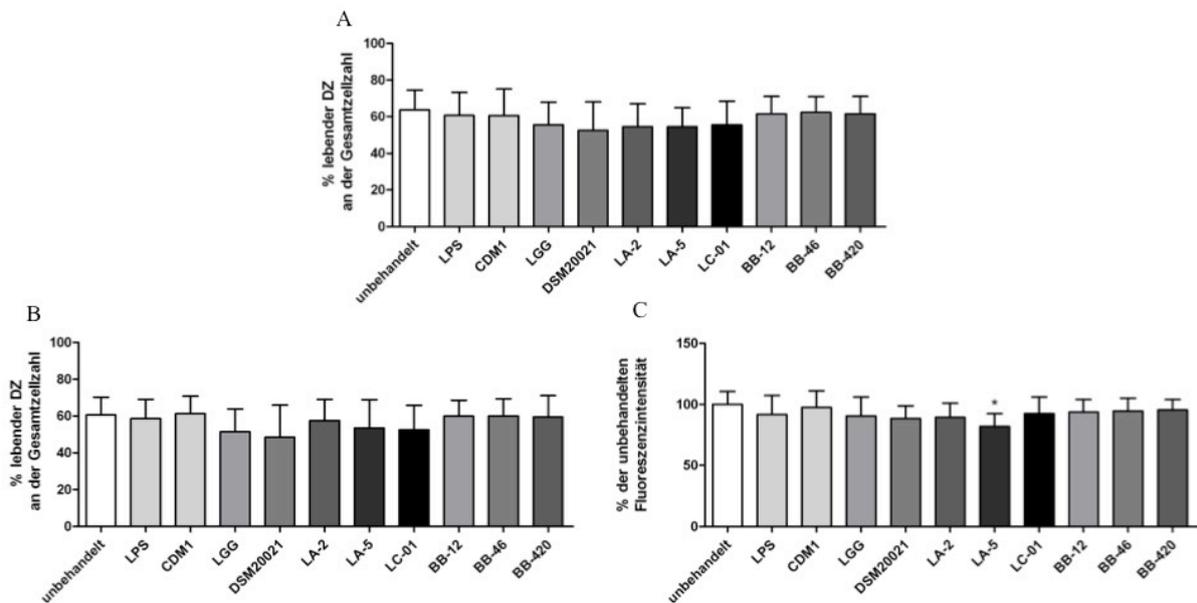


Abbildung 3-21: Vitalität der LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit probiotischen Überständen.

Humane unreife DZ wurden mit LPS für 24 h ausgereift. Daraufhin erfolgte eine Stimulation mit 200 μ l Bakterienüberstand. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet. In (A) sind die Prozentsätze der lebenden DZ an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach Trypanblau-Färbung mittels optischer Auszählung dargestellt, in (B) sind die Prozentsätze der lebenden DZ an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach 7-AAD-Färbung mittels durchflusszytometrischer Analyse dargestellt und in (C) sind die relativen Veränderungen der Anzahl lebender DZ im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mittels photometrischer Analyse dargestellt. Als Mediumkontrolle wurden zusätzlich DZ mit LPS und mit dem purem Bakterienmedium CDM1 behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

3.1.3. Zusammenfassung: Etablierung geeigneter Screening Systeme

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, ein *in vitro* Screening System zu etablieren, mit dem es möglich ist, die Überstände potentiell probiotischer Bakterienstämme auf eine Th-2-immunmodulatorische Aktivität mit einem hohem Durchsatz zu testen. Grundlegender Parameter für das System ist eine Verringerung der Sekretion des Th2-assoziierten Chemokins CCL17 durch humane KM-H2 Zellen nach deren Behandlung mit den zu screenenden Überständen. Als Kontrolle für die Zuverlässigkeit der Screening Resultate konnte ein weiteres System erarbeitet werden, das mit einer hohen immunologischen Aussagekraft ausgezeichnet ist. Dieses DZ-basierte System arbeitet mit Expressionsänderungen von Oberflächenmolekülen, die entscheidende Funktionen in der nachfolgenden T-Zell-Interaktion besitzen. Die Überstände probiotischer Bakterien führen hier zu einer Minimierung des Aktivierungsgrades und des kostimulatorischen Potentials der DZ und induzieren einen Zustand, der vergleichbar mit immunologischer Toleranz ist.

3.2. Anwendung der Screening Systeme: Winlove Bioindustries BV

Im Laufe dieses Projektes wurde eine enge Kooperation mit dem Industriepartner Winlove Bioindustries eingegangen. Winlove Bioindustries ist ein globaler Anbieter von probiotischen Rezepturen für Nahrungsergänzungsmittel und pharmazeutische Unternehmen. In den letzten 25 Jahren hat Winlove Bioindustries mit über 30 Bakterienstämmen mehr als 60 unterschiedliche probiotische Rezepturen entwickelt. Im Rahmen dieser Kooperation sollten 21 von Winlove Bioindustries kommerziell vertriebene probiotische Stämme in dem hier neu entwickelten Screening System auf eine eventuell immunmodulatorische Aktivität gescreent werden.

3.2.1. Screening von *Lactobacillus* spp.

Es wurden insgesamt 12 unterschiedliche Winlove *Lactobacillus* Stämme in dem KM-H2 Screening Assay untersucht (Abbildung 3-22). Von vier getesteten *Lactobacillus acidophilus* Stämmen W22, W37, W50 und W74 konnte bei W22 immunmodulatorische Aktivität festgestellt werden. Die zwei *Lactobacillus casei* Stämme W56 und W79 verringerten beide die CCL17-Konzentration, während weder der getestete *Lactobacillus gasseri* W44, noch der

Lactobacillus helveticus W60 einen Effekt zeigten. W7 als einzig getesteter *Lactobacillus paracasei* wurde negativ gescreent. Auch bei keinem der beiden *Lactobacillus plantarum* Stämme W21 und W62 konnte eine Aktivität festgestellt werden. *Lactobacillus rhamnosus* W102 und die zwei *Lactobacillus salivarius* Stämme W24 und W57 zeigten keinerlei Auswirkungen auf die CCL17-Sekretion.

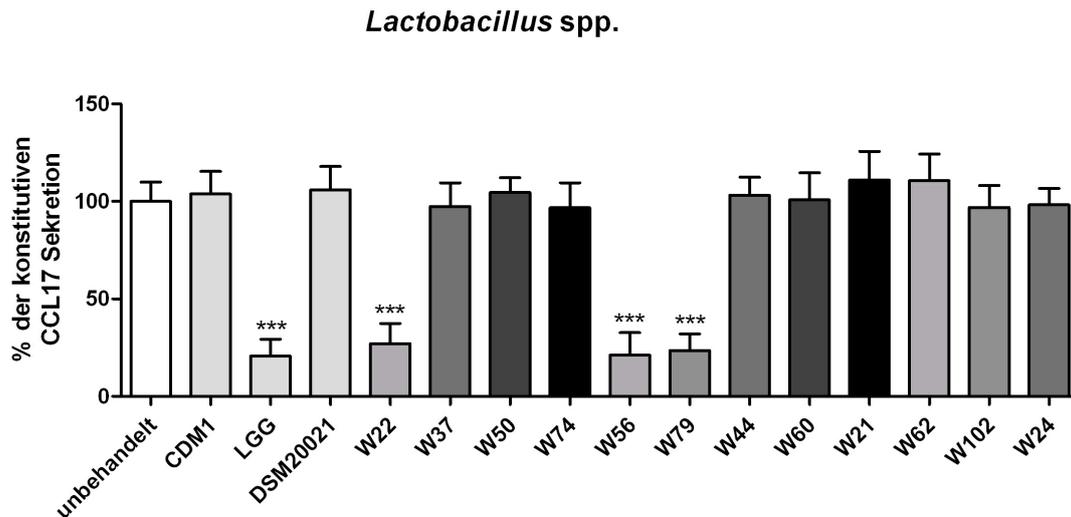


Abbildung 3-22: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit *Lactobacillus* spp. Überständen von Winlove Bioindustries.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit 200 µl des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Mediumkontrolle wurden die KM-H2 Zellen nur mit dem puren CDM1 Medium behandelt, als Positivkontrolle für immunmodulatorische Aktivität diente der Überstand von LGG, als Negativkontrolle der Überstand von DSM20021. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.2.2. Screening von *Bifidobacterium* spp.

Von den insgesamt vier getesteten Bifidobakterien zeigten zwei immunmodulatorische Aktivität (Abbildung 3-23). *Bifidobacterium breve* W25 zeigte keine Beeinflussung der CCL17-Sekretion. Von den zwei *Bifidobacterium lactis* Stämmen W51 und W52 war nur W52 aktiv. Der untersuchte *Bifidobacterium longum* W108 war ebenfalls aktiv.

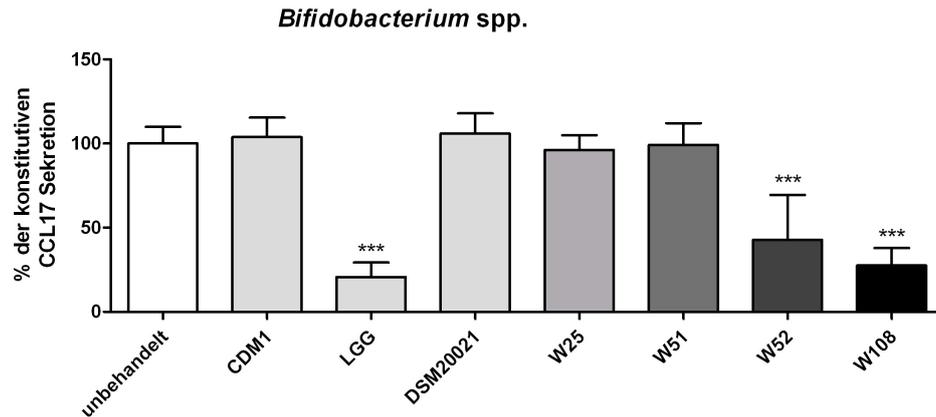


Abbildung 3-23: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit *Bifidobacterium* spp. Überständen von Winlove Bioindustries.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit 200 µl des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Mediumkontrolle wurden die KM-H2 Zellen nur mit dem puren CDM1 Medium behandelt, als Positivkontrolle für immunmodulatorische Aktivität diente der Überstand von LGG, als Negativkontrolle der Überstand von DSM20021. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.2.3. Screening von *Enterococcus* sp., *Lactococcus* spp. und *Streptococcus* sp.

Von den übrigen getesteten Gattungen zeigte nur ein Stamm einer Gattung immunmodulatorische Effekte. W54 als einzig getesteter *Enterococcus faecium* zeigte keine Aktivität, von den drei *Lactococcus lactis* Stämmen W58, W19 und W32 war nur W58 aktiv. *Streptococcus thermophilus* W69 konnte die CCL17-Sekretion nicht herabregulieren (Abbildung 3-24).

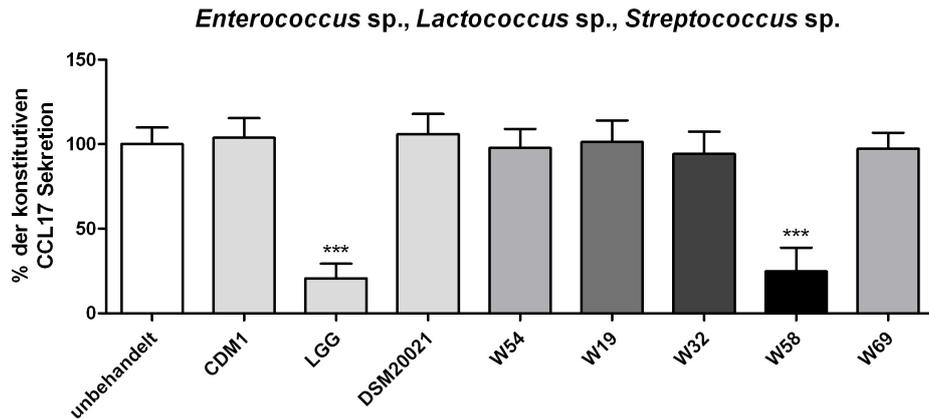


Abbildung 3-24: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit *Enterococcus sp.*, *Lactococcus spp.* und *Streptococcus spp.* Überständen von Winlove Bioindustries.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit 200 µl des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Mediumkontrolle wurden die KM-H2 Zellen nur mit dem purem CDM1 Medium behandelt, als Positivkontrolle für immunmodulatorische Aktivität diente der Überstand von LGG, als Negativkontrolle der Überstand von DSM20021. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.2.4. Zusammenfassung des Winlove Bioindustries BV Screenings

Über die erste Anwendung des hier etablierten Screening Systems läßt sich folgendes zusammenfassend feststellen: 3/12 *Lactobacillus spp.*, 2/4 *Bifidobacterium spp.*, 0/1 *Enterococcus sp.*, 1/3 *Lactococcus sp.* und 0/1 *Streptococcus spp.* führten zu einem positiven Resultat in dem Screening System. Diese Ergebnisse wurden selektiv mit dem DZ-Testsystem überprüft und konnten wieder bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Mit dem Wissen aus den hier erzielten Ergebnissen erhofft sich Winlove Bioindustries eine noch spezifischere Einsetzung und Kombination der probiotischen Stämme, die so noch besser auf die Bedürfnisse der jeweiligen Abnehmer abgestimmt werden können.

In Tabelle 3-1 sind die Winlove Stämme zusammen mit allen anderen getesteten Stämmen in einem Überblick mit ihren immunmodulatorischen Effekten zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Übersicht über alle getesteten Stämme mit den zusammengefassten immunmodulatorischen Effekten.

Bakterienstamm	Immunmodulatorische Aktivität	
	Anti-Th2-Effekt auf KM-H2	Tolerogener Effekt auf DZ
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium breve</i> W9	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium breve</i> W25	Nein	Nein
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM-20091	Nein	Nein
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM-20456	Nein	Nein
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium lactis</i> W51	Nein	Nein
<i>Bifidobacterium lactis</i> W52	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium longum</i> BB-46	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium longum</i> W108	Ja	Ja
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> DSM- 20088	Nein	Nein
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Nein	Nein
<i>Enterococcus faecium</i> W54	Nein	Nein
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2	Ja	Ja
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Ja	Ja
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W12	Nein	Nein
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W22	Ja	Ja
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W33	Ja	Ja
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W37	Nein	Nein
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W50	Nein	Nein
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W74	Nein	Nein
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM-20079	Nein	Nein
<i>Lactobacillus casei</i> W20	Nein	Nein
<i>Lactobacillus casei</i> W56	Ja	Ja
<i>Lactobacillus casei</i> W79	Ja	Ja
<i>Lactobacillus gasseri</i> W44	Nein	Nein
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM-20077	Nein	Nein
<i>Lactobacillus helveticus</i> W60	Nein	Nein
<i>Lactobacillus paracasei</i> W7	Ja	Ja
<i>Lactobacillus paracasei</i> DSM-20312	Nein	Nein
<i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01	Ja	Ja
<i>Lactobacillus plantarum</i> W21	Nein	Nein
<i>Lactobacillus plantarum</i> W62	Nein	Nein
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM-20174	Nein	Nein
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM-20021	Nein	Nein
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Ja	Ja
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> W102	Nein	Nein
<i>Lactobacillus salivarius</i> W24	Nein	Nein
<i>Lactobacillus salivarius</i> W57	Nein	Nein
<i>Lactococcus lactis</i> W19	Nein	Nein
<i>Lactococcus lactis</i> W32	Nein	Nein
<i>Lactococcus lactis</i> W58	Ja	Ja
<i>Streptococcus salivarius</i> W122	Nein	Nein
<i>Streptococcus thermophilus</i> W69	Nein	Nein

3.3. Identifizierung immunaktiver sezernierter Substanzen in den bakteriellen Überständen

3.3.1. Pilotversuche: Screening von bakteriellen Signalpeptiden

Nachdem das Screening System und das Testsystem zum Nachweis immunmodulatorischer probiotischer Aktivität erfolgreich etabliert werden konnten, sollten die bioaktiven sezernierten bakteriellen Substanzen in den Überständen mithilfe dieser Assays identifiziert werden. Da bereits bekannt ist, dass bei Gram-negativen Bakterien Quorum sensing Moleküle mit dem menschlichen Immunsystem interagieren, sollten in Vorversuchen bereits bekannte Signalmoleküle probiotischer Gram-positiver Bakterien in den Screening Systemen auf einen immunmodulatorischen Effekt hin untersucht werden.

3.3.1.1. *Bacillus subtilis*: CSF, ComX

Basierend auf einer Literaturrecherche wurden zwei sezernierte Signalpeptide von dem probiotischen Stamm *Bacillus subtilis* identifiziert: das Pentapeptid CSF (*competence and sporulation factor*) und das Decapeptid ComX Pheromon. Beide Signalpeptide regulieren autokrin die Expression spezifischer Gene in Abhängigkeit von der Populationsdichte, wobei ComX die natürliche genetische Kompetenz induziert [181]. CSF stimuliert bei einer geringen Zelldichte die Expression von Genen, die von dem Transkriptionsfaktor ComA aktiviert wurden, während bei hohen Konzentrationen die Expression dieser Gene inhibiert wird und die Sporulation eingeleitet wird [182]. Die beiden Signalpeptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zuerst im KM-H2 System getestet (Abbildung 3-25). Bei den eingesetzten Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM und bei 50 µM zeigten beide Peptide keinen Effekt. Bei 5 µM, 10 µM und 100 µM jedoch führten beide Peptide zu einer Herabregulation der CCL17-Sekretion auf ca. 50% der konstitutiven Sekretion. Bei der anschließenden Überprüfung dieser Ergebnisse im DZ-Testsystem konnte jedoch bei keiner Konzentration eine immunmodulatorische Bioaktivität der Peptide festgestellt werden (Abbildung 3-26 und Abbildung 3-27).

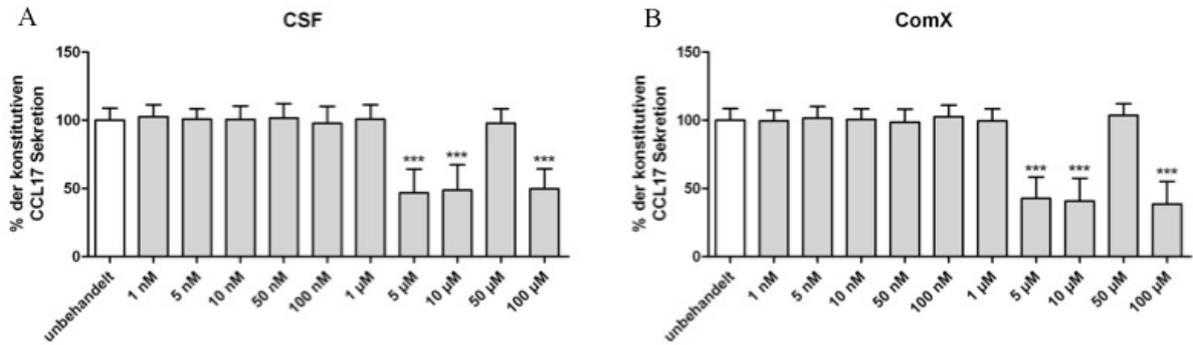


Abbildung 3-25: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Quorum sensing Peptiden CSF und ComX.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den bakteriellen Peptide (A) CSF und (B) ComX in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

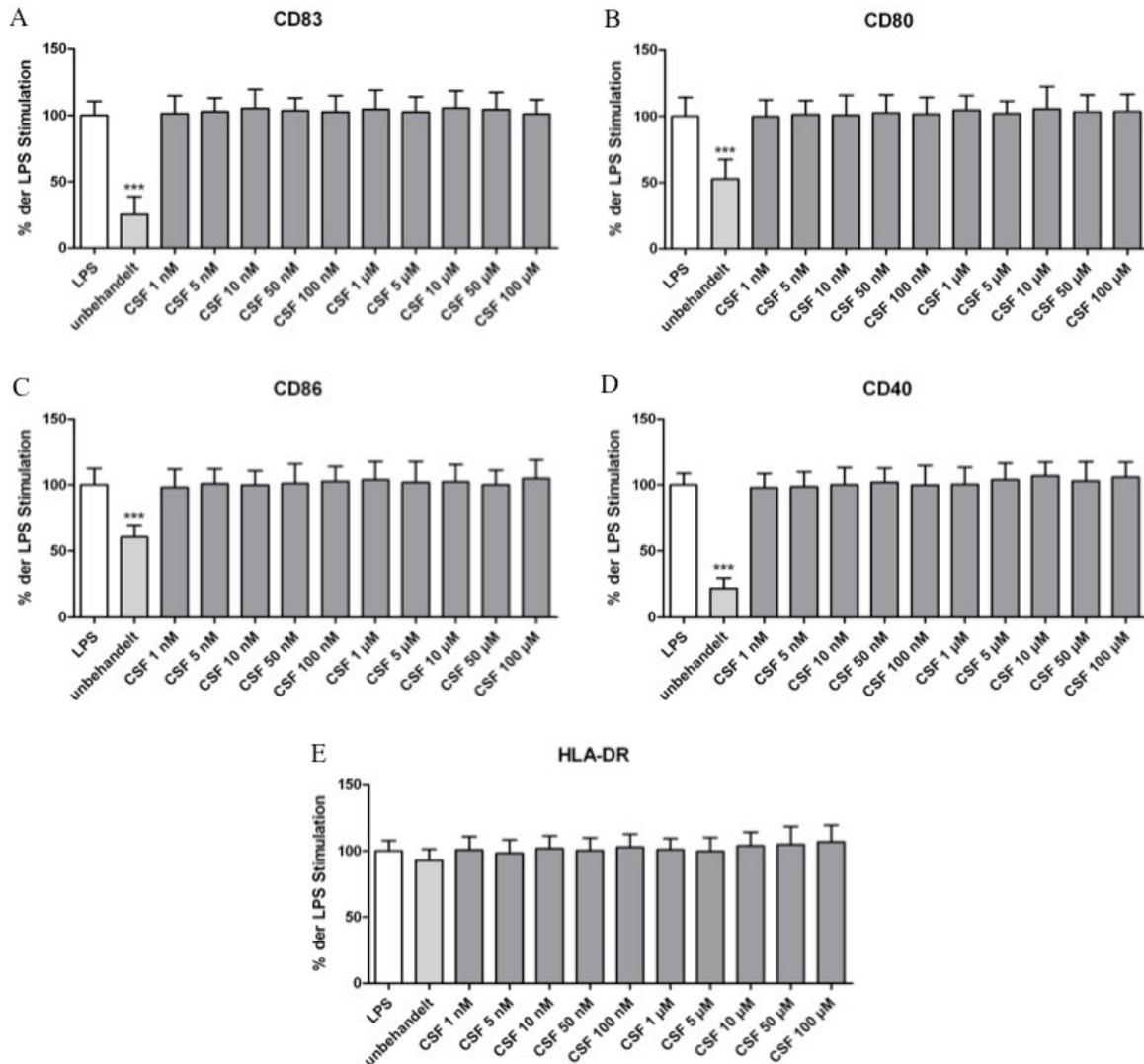


Abbildung 3-26: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid CSF.

Humane DZ wurden in Anwesenheit von LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen des bakteriellen Peptids stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

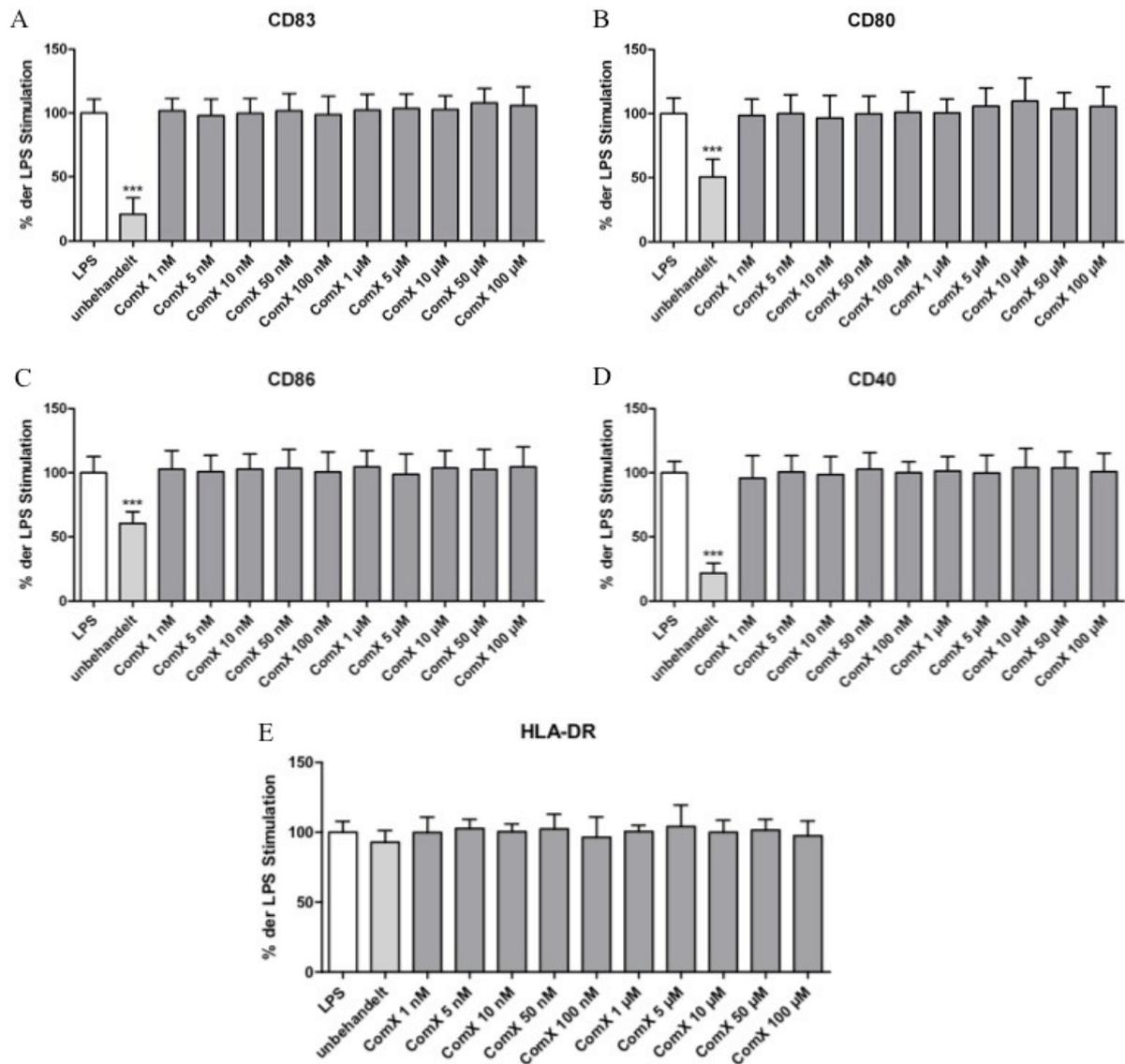


Abbildung 3-27: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid ComX.

Humane DZ wurden in Anwesenheit von LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen des bakteriellen Peptids stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.3.1.2. *Bifidobacterium lactis* BB-12: p(CHWPR)

Neben den beiden Quorum sensing Molekülen CSF und ComX von *Bacillus subtilis* ist noch ein weiteres von *Bifidobacterium lactis* BB-12 identifiziert, nämlich das extrazelluläre Pentapeptid p(CHWPR). Von diesem ist bekannt, dass es die Genexpression der Oxalyl-CoA Decarboxylase verstärkt und in der Zelllinie HL-60 die Expression von c-myc und IL-6

induzieren kann [183]. Von dem Peptid wurden ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen in beiden Systemen untersucht (Abbildung 3-28 und Abbildung 3-29). Hier zeigte sich das gleiche Bild wie schon bei den ersten beiden Quorum sensing Peptiden, p(CHWPR) verringerte in den Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M und 100 μ M die CCL17-Sekretion auf unter 50% im Vergleich zur Kontrolle. Auf die Expression der getesteten Oberflächenmoleküle der DZ hatte p(CHWPR) aber bei keiner Konzentration einen inhibierenden Effekt.

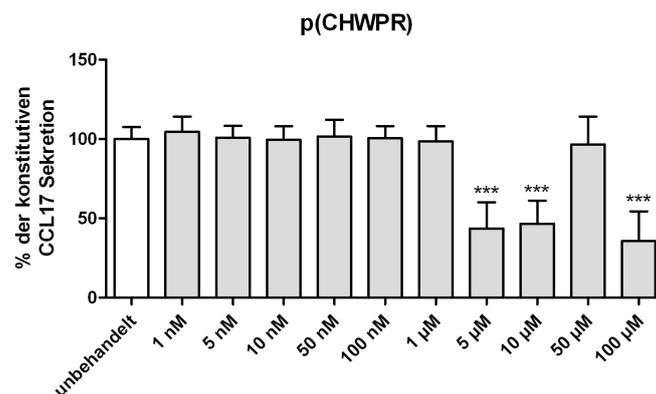


Abbildung 3-28: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid p(CHWPR).

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit dem bakteriellen Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

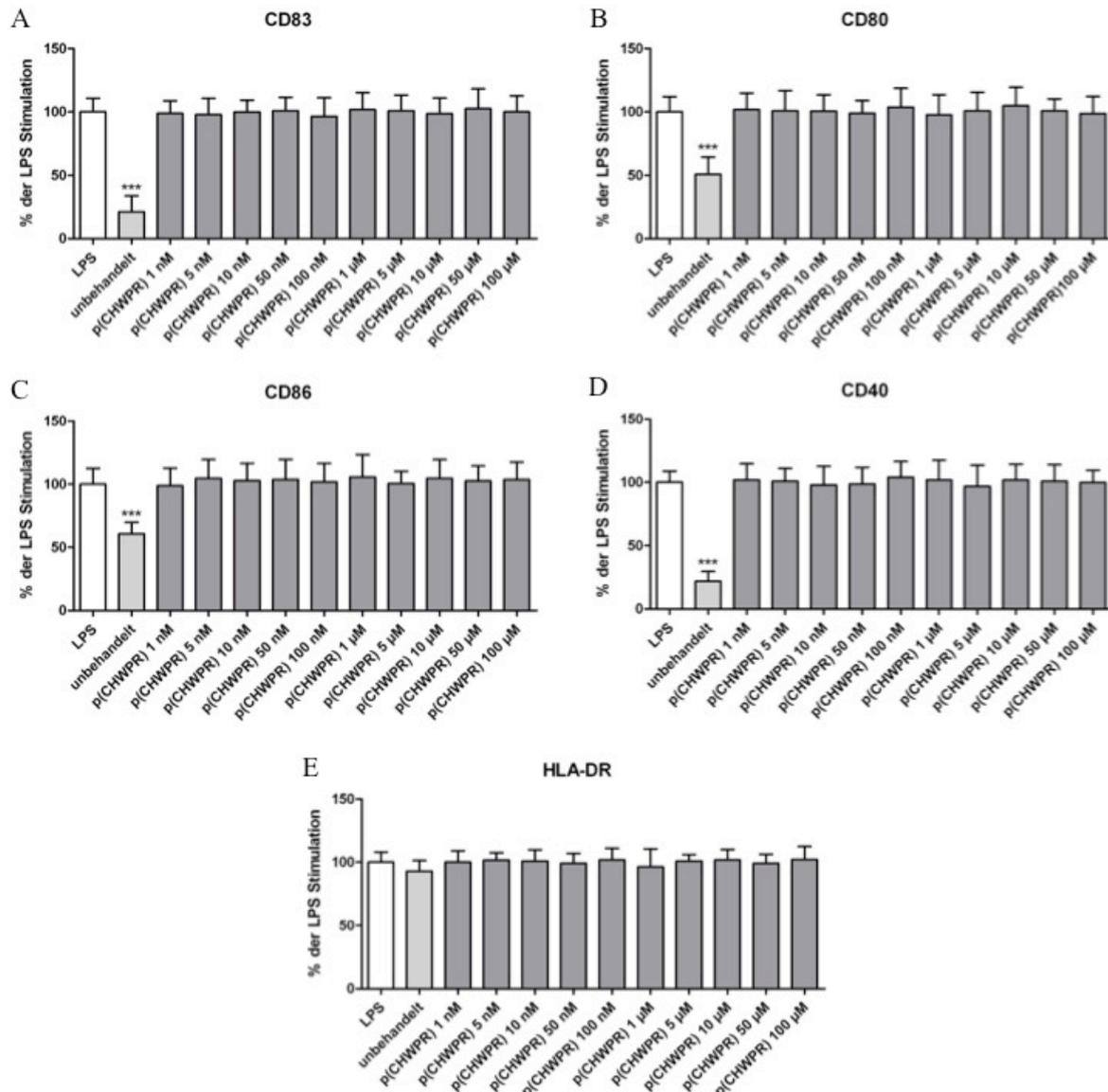


Abbildung 3-29: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid p(CHWPR).

Humane DZ wurden in Anwesenheit von LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen des bakteriellen Peptids stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

3.3.1.3. Vitalität der KM-H2 nach Stimulation mit den Quorum sensing Molekülen

Die Stimulation mit den bakteriellen Signalpeptiden lieferte nicht konkordante Ergebnisse in den beiden Testsystemen: bei den DZ zeigte sich keine Veränderung in der Expression der Oberflächenmoleküle, während die KM-H2 Zellen in ihrer CCL17-Sekretion von allen drei

Peptiden nur bei den Konzentrationen 5 μM , 10 μM und 100 μM inhibiert wurden. Aufgrund dieser widersprüchlichen Resultate wurde die Vitalität der KM-H2 Zellen mit den bereits beschriebenen Tests überprüft (Abbildung 3-30). Dabei stellte sich heraus, dass genau bei den Konzentrationen 5 μM , 10 μM und 100 μM die Vitalität der KM-H2 Zellen stark eingeschränkt war und auf unter 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gefallen war. Somit ist die Verringerung der CCL17-Konzentration im Kulturmedium nicht auf einen immunmodulatorischen Effekt der bakteriellen Peptide zurückzuführen, sondern auf eine toxische Wirkung der Quorum sensing Moleküle auf die KM-H2 Zellen bei hohen unphysiologischen Konzentrationen. Somit konnte in den Vorversuchen kein bekanntes Quorum sensing Molekül von probiotischen Bakterien gefunden werden, dass in den etablierten Assays immunmodulatorisch auf DZ oder KM-H2 Zellen wirkte.

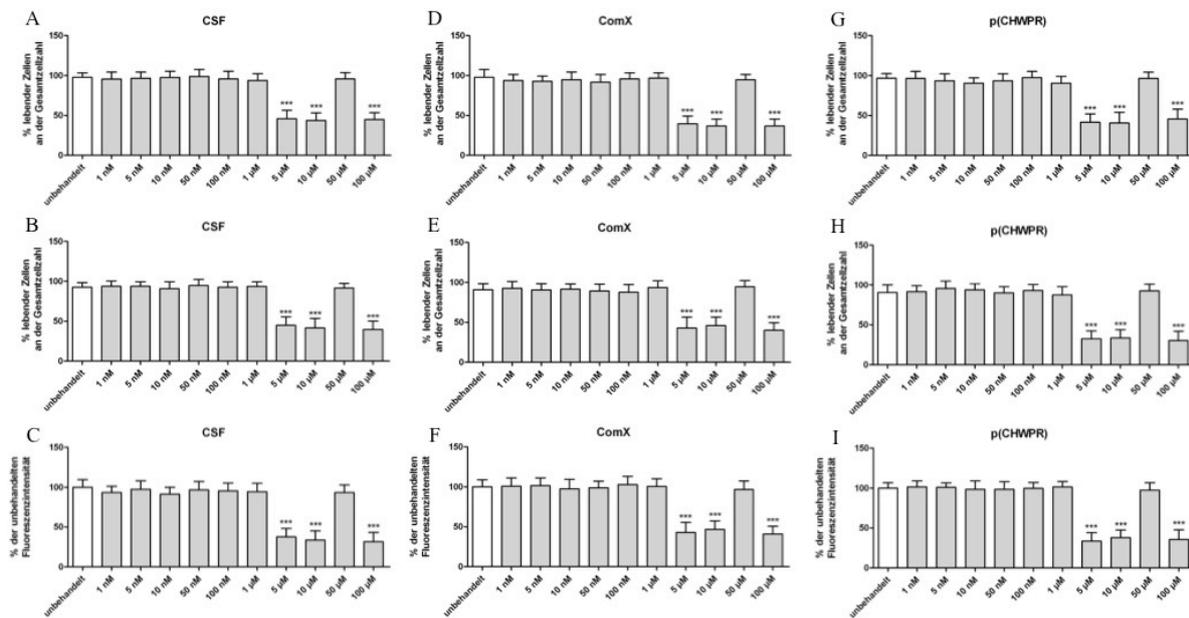


Abbildung 3-30: Vitalität der KM-H2 Zellen nach Stimulation mit den Quorum sensing Molekülen CSF, ComX und p(CHWPR).

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den bakteriellen Peptiden (A) - (C) CSF, (D) – (F) ComX und (G) – (I) p(CHWPR) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. In (A), (D) und (G) sind die Prozentsätze der lebenden Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach Trypanblau-Färbung mittels optischer Auszählung dargestellt, in (B), (E) und (H) sind die Prozentsätze der lebenden Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl nach 7-AAD-Färbung mittels durchflußzytometrischer Analyse dargestellt und in (C), (F) und (I) sind die relativen Veränderungen der Anzahl lebender Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mittels photometrischer Analyse dargestellt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

3.3.2. Strategie zur Identifizierung immunaktiver Substanzen in den probiotischen Überständen

In einem nächsten Schritt sollten mit Hilfe der Screening Systeme die sezernierten bakteriellen Moleküle in den Überständen identifiziert werden, die in Interaktion mit den humanen Immunzellen treten und den modulatorischen Effekt der probiotischen Bakterien vermitteln. Um dieses Ziel zu realisieren, wurde die in Abbildung 3-31 dargestellte Strategie entwickelt. Während der schrittweisen Fraktionierungsprozedur wurden die erhaltenen chemischen Proben in beiden Bioassays auf Bioaktivität rückgetestet. Dabei wurde immer eine unbeeinträchtigte Vitalität der stimulierten Zellen getestet.

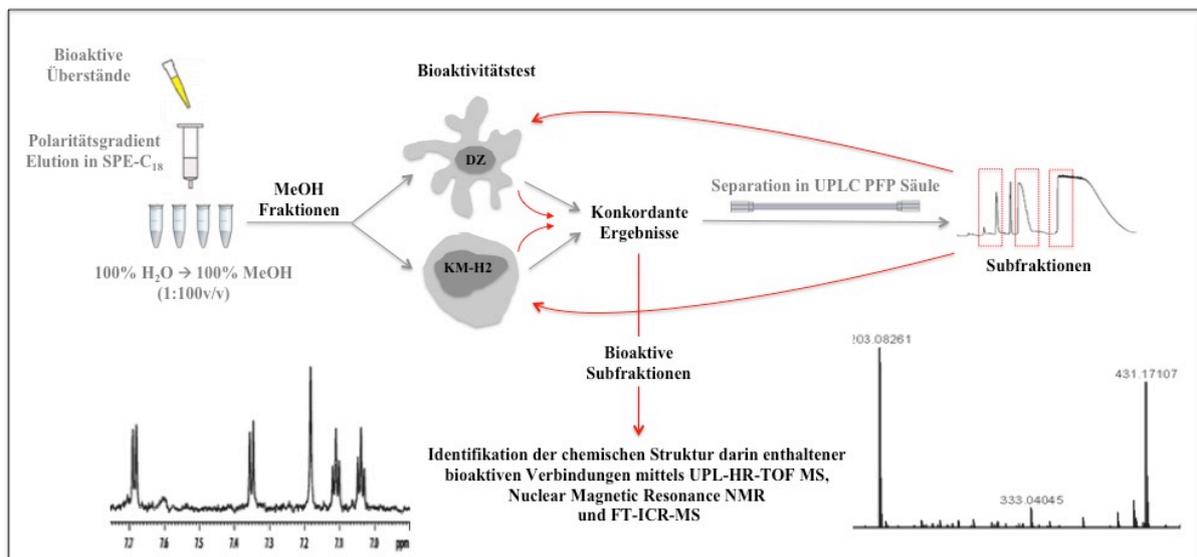


Abbildung 3-31: Strategie zur Identifizierung bioaktiver Verbindungen in ausgewählten Überständen probiotischer Bakterien.

Ausgewählte immunmodulatorische Überstände wurden in einem ersten Fraktionierungsschritt durch eine Festphasenextraktion (SPE-C₁₈) polaritätsabhängig aufgetrennt. Die erhaltenen MeOH-Fraktionen wurden im DZ- und im KM-H2-System auf konkordante immunmodulatorische Eigenschaften getestet. Bioaktive MeOH-Fraktionen wurden in einem zweiten Fraktionierungsverfahren mittels UPLC (PFP Säule) noch weiter in Subfraktionen aufgetrennt, die separat auf Bioaktivität wieder in beiden Systemen rückgetestet wurden. Bioaktive Subfraktionen wurden daraufhin mittels UPLC-HR-TOF MS, NMR und FT-ICR-MS auf enthaltene Verbindungen hin untersucht, die wiederum auf Bioaktivität in beiden Systemen rückgetestet wurden. Für Details der chemischen Analysen siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

3.3.3. Semi-präparative Chromatographie ausgewählter Überstände

Die Überstände der Stämme *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus casei* W56, die in beiden Systemen konkordante immunmodulatorische Eigenschaften gezeigt haben, wurden

für eine Anreicherung und chemische Charakterisierung ausgewählt. Als Mediumkontrolle wurde pures CDM1, als Negativkontrolle der Stamm *Lactobacillus rhamnosus* W102 mitgeführt. Als initialer Fraktionierungsschritt erfolgte eine Festphasenextraktion. Die bakterienfreien Überstände wurden auf SPE-C₁₈-Säulen geladen und mittels eines 10%-stufigen MeOH-Polaritätsgradienten eluiert. Als Resultat wurden jeweils 11 Wasser/Methanol-Extrakte erhalten (für Details der Festphasenextraktion siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan), die in beiden Systemen mit konkordanten Ergebnissen getestet wurden (Abbildung 3-32, DZ-Daten werden nicht gezeigt). Bei den aktiven Überständen von LGG und W56 wurde jeweils in der 20%, 40% und 50% MeOH-Fraktion Bioaktivität nachgewiesen, wobei bei LGG das CCL17-inhibierende Potential der drei Fraktionen mit ca. 24% der konstitutiven Sekretion annähernd gleich war. Bei W56 hingegen zeigte die 20% MeOH-Fraktion den stärksten Effekt mit ca. 20%, während die zwei anderen aktiven Fraktionen die CCL17-Sekretion nur auf ca. 35% verringerten. Die Fraktionen des CDM1-Mediums und die des Überstandes des negativen Stammes W102 verhielten sich alle immunneutral. Der Überstand der Negativkontrolle W102 wurden aus Zeitgründen und aufgrund hoher Geräteauslastung nur bis zu dem 60% MeOH-Extrakt fraktioniert, da bei keinem der immunmodulatorischen Überstände in einer höherprozentigen Fraktion Aktivität festgestellt werden konnte.

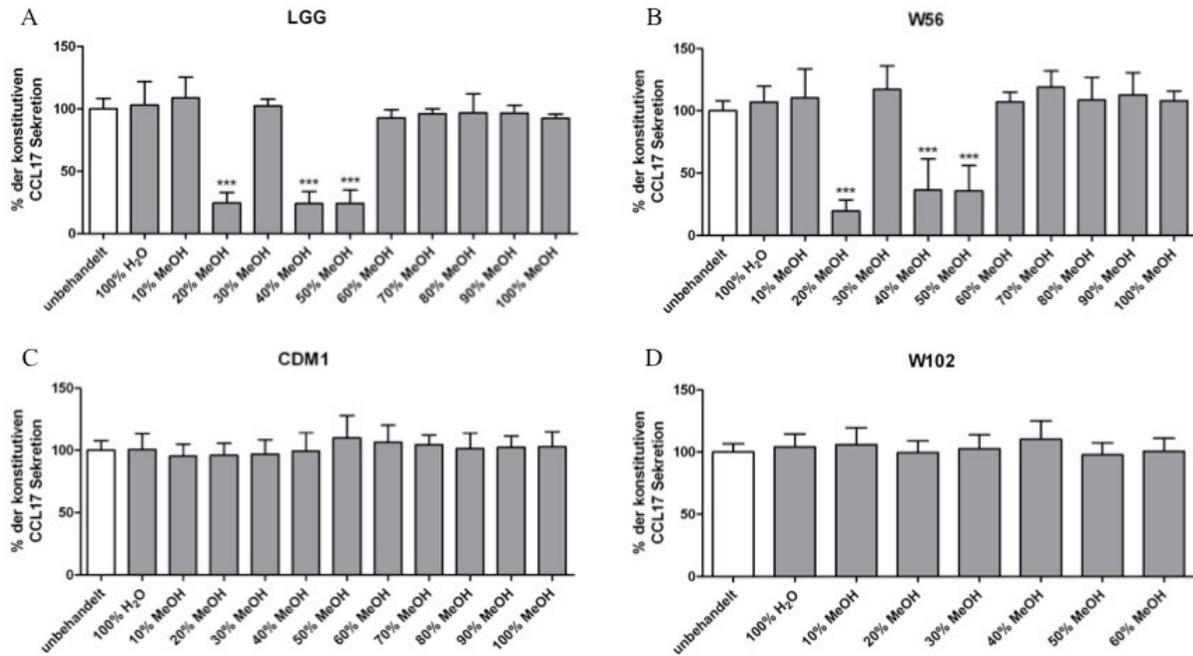


Abbildung 3-32: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den MeOH-Fractionen ausgewählter immunaktiver Überstände.

Die Überstände von LGG und W56 wurden für die chemische Polaritätsfraktionierung (für Details der Polaritätsfraktionierung siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) ausgewählt. KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den unterschiedlichen MeOH-Fractionen der Überstände von (A) LGG und (B) W56 stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Kontrollen wurden in (C) fraktioniertes CDM1 und in (D) die MeOH-Fractionen des Überstandes des nicht-aktiven W102 mitgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.3.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie UPLC der aktiven Fraktionen

3.3.4.1. MeOH-Fractionen: UPLC-PDA Chromatogramme und Rücktest der Subfraktionen

In einem nächsten Schritt sollten die aktiven MeOH-Fractionen noch weiter in feinere Subfraktionen aufgetrennt werden. Um eine solche effektive Anreicherung der potentiell bioaktiven Substanzen in den Fraktionen zu erreichen, wurde ein UPLC-PDA System an einen Roboter gekoppelt, der die chemischen Subfraktionen automatisch in einer 96-well Platte sammelte (für Details der chemischen Analysen siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan).

Die Methode der UPLC lieferte das für die jeweilige MeOH-Fraktion spezifische Chromatogramm (Abbildung 8-1, Abbildung 8-2 und Abbildung 8-3). Anhand dieser

Chromatogramme wurde individuell die Definition der einzelnen Subfraktionen vorgenommen, welche daraufhin in beiden Testsystemen auf immunmodulatorische Aktivität untersucht wurden (Abbildung 3-33, Abbildung 3-34 und Abbildung 3-35). Bei den 20% MeOH-Extrakten sowohl von LGG, als auch von W56 zeigten zwei Subfraktionen, die in der chromatographischen Retentionszeitspanne von 7–9 min gesammelt wurden, Bioaktivität (Abbildung 3-33 A und B). Wie erwartet traten weder bei den Subfraktionen der Mediumkontrolle CDM1 noch bei denen der Negativkontrolle W102 immunmodulatorische Effekte auf (Abbildung 3-33 C und Abbildung 3-33 D). Deshalb wurde auf die Negativkontrolle aus Zeitgründen und hoher Geräteauslastung bei den Rücktests der Subfraktionen der folgenden anderen beiden MeOH-Fraktionen verzichtet. Bei diesen Subfraktionen zeigte sich kein solch eindeutiges Bild. Zwei Subfraktionen des 40% MeOH-Extraktes von LGG verringerten die CCL17-Sekretion, wobei die erste Subfraktion in der Retentionszeitspanne nach 5–6 min, die zweite nach 7–8 min erschienen ist (Abbildung 3-34 A). Bei den Subfraktionen des 40% MeOH-Extraktes von W56 konnte keine signifikante Aktivität mehr festgestellt werden (Abbildung 3-34 B). Es war jedoch ein leichter Trend zu einer Herabregulation der CCL17-Konzentration bei den Subfraktionen 3 nach 2-2,5 min und bei Subfraktion 6 nach 5–6 min zu beobachten. Innerhalb der 50% MeOH-Fraktionen konnte eine bioaktive Subfraktion nur noch bei LGG festgestellt werden, deren Retentionszeitrahmen 10–10,5 min betrug (Abbildung 3-35).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die eindeutigsten Ergebnisse für die 20%MeOH-Fraktion erzielt wurden. Hier konnte die Aktivität der gesamten MeOH-Fraktion nach der UPLC-Separation deutlich zwei Subfraktionen zugeordnet werden. Bei den 40% und 50 % MeOH-Fraktionen verliert sich eine signifikante Aktivität bei W56 ganz, bei LGG zeigen zwar Subfraktionen gerade noch signifikante Bioaktivität, jedoch nicht mehr so ausgeprägt und aufgrund der vergleichsweise hohen Standardabweichung nicht wirklich robust. Aus diesen Gründen wurde eine Fokussierung auf die 20% MeOH-Fraktionen bei den folgenden Experimenten durchgeführt, zumal diese auch die polarste und somit am besten wasserlösliche Fraktion ist.

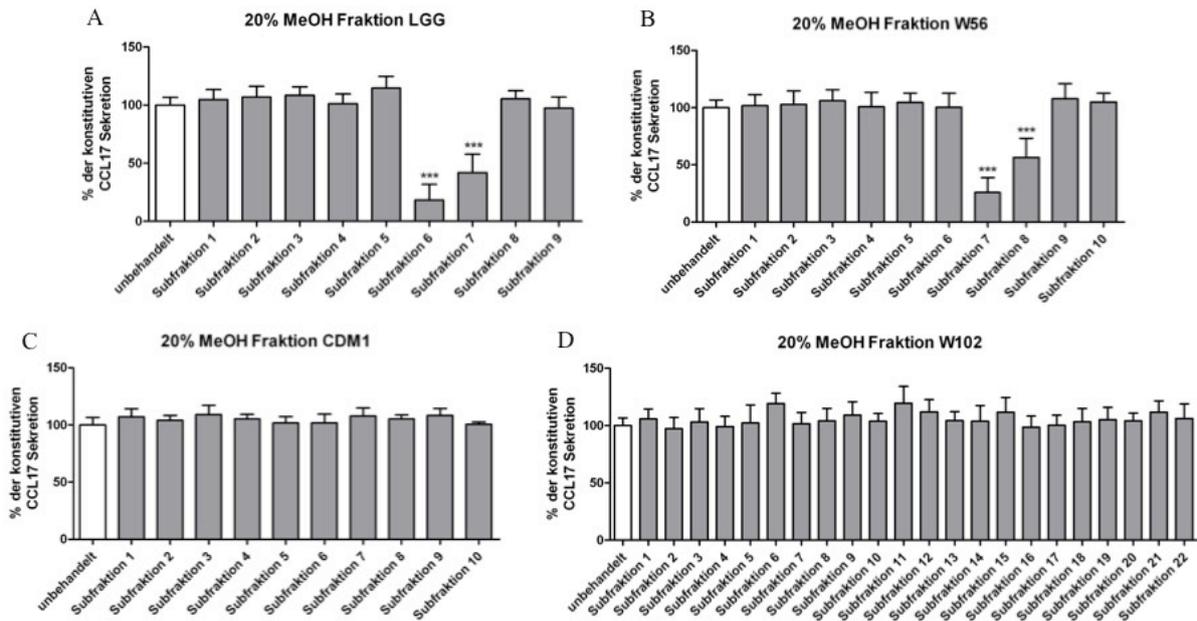


Abbildung 3-33: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 20% MeOH-Fractionen von LGG, W56 und W102.

Die 20% MeOH-Fractionen von LGG, W56 und W102 wurden mittels UPLC in feinere Subfraktionen aufgetrennt (für Details der UPLC siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den unterschiedlichen Subfraktionen der 20% MeOH-Fraktion von (A) LGG und (B) W56 stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Kontrollen wurden in (C) die Subfraktionen der 20% MeOH-Fraktion von CDM1 und in (D) die Subfraktionen der 20% MeOH-Fraktion des Überstandes des nicht-aktiven W102 mitgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

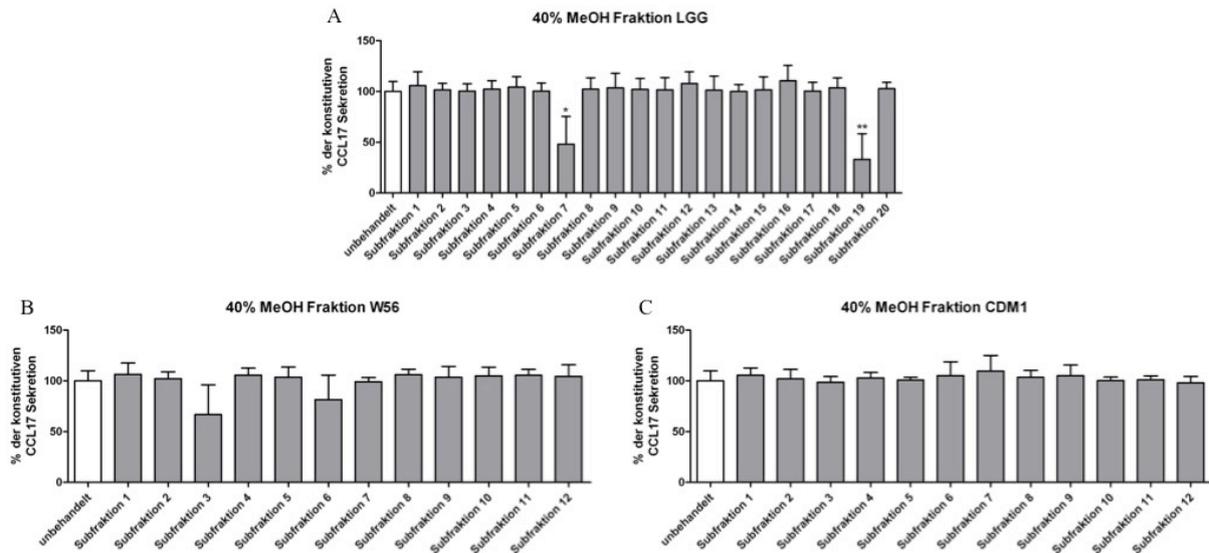


Abbildung 3-34: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 40% MeOH-Fractionen von LGG und W56.

Die 40% MeOH-Fractionen von LGG und W56 wurden mittels UPLC in feinere Subfraktionen aufgetrennt (für Details der UPLC siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den unterschiedlichen Subfraktionen der 40% MeOH-Fraktion von **(A)** LGG und **(B)** W56 stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Kontrolle wurden in **(C)** die Subfraktionen der 40% MeOH-Fraktion von CDM1 mitgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

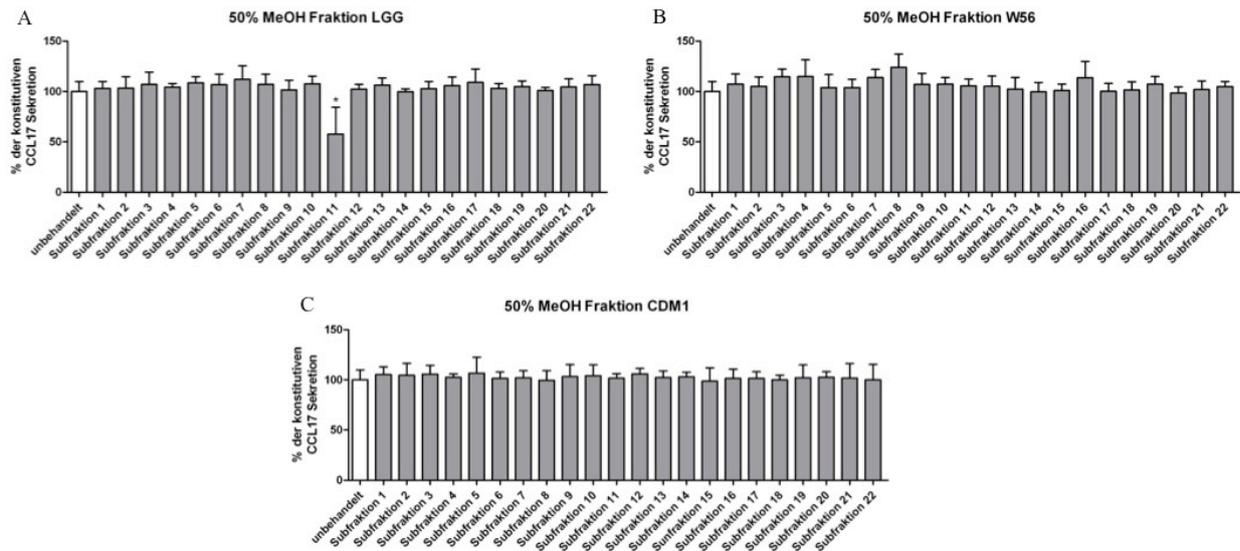


Abbildung 3-35: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 50% MeOH-Fractionen von LGG und W56.

Die 50% MeOH-Fractionen von LGG und W56 wurden mittels UPLC in feinere Subfraktionen aufgetrennt (für Details der UPLC siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit den unterschiedlichen Subfraktionen der 50% MeOH-Fraktion von (A) LGG und (B) W56 stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Kontrolle wurden in (C) die Subfraktionen der 50% MeOH-Fraktion von CDM1 mitgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.3.4.2. UPLC-UV-Massenspektrometrie

Die zwei immunaktiven Subfraktionen des 20% MeOH-Extraktes wurden nun mittels reversed phase UPLC-High Resolution TOF MS neu bewertet (für Details dieser chemischen Analyse siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). Mithilfe dieser Technik ist es möglich, Total Ion Chromatogramme (TIC) herzustellen (Abbildung 8-4 A). Durch den Vergleich von Ähnlichkeiten zwischen den Chromatogrammen gelang es, eine Verbindung zu identifizieren, welche gemäß der Retentionszeit und der Information über die molekulare Masse nur in den bioaktiven Subfraktionen vorhanden war (Abbildung 8-4 A). Die TIC lieferten so den ersten Hinweis, dass der Peak mit der Retentionszeit t_R von 4.2 min möglicherweise die bioaktive Substanz enthält. Der Konzentrationsunterschied der potentiell bioaktiven Substanz in den TIC Peakarealen der Subfraktionen, der in Abbildung 8-4 A deutlich ist, spiegelt sich exakt in dem Bioassay wider (Abbildung 3-33). Subfraktion 6 von LGG hat einen stärkeren inhibierenden Effekt auf die CCL17-Sekretion als die Subfraktion 7 von LGG. Genauso bei

W56, hier hat die Subfraktion 7 eine stärker ausgeprägte Aktivität als Subfraktion 8. Das extrahierte Massenspektrum der TIC Peakareale bei der t_R von 4.1–4.3 min wies ein identisches Profil auf mit Signalen bei m/z 409.1875, 205.0971 und 188.0702, was auf die Tryptophan-Ionen $[2M+H]^+$, $[M+H]^+$ und auf das Fragment $[M+H-NH_3]^+$ hindeutete (Abbildung 8-4 B) (vergleichbar mit MassBank, freizugängliche Datenbank, <http://www.massbank.jp/>).

Nach einer vorsichtigen Anreicherung dieser potentiell bioaktiven Substanz durch wiederholte chromatographische Läufe (für Details siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) zeigte die isolierte Kandidatenverbindung im Gegensatz zu den angrenzenden Nachbararealen konkordante immunmodulatorische Aktivität in beiden Bioassays (Abbildung 3-36, DZ-Daten werden nicht gezeigt).

Als Ergebnis der High Resolution MS Analyse mittels FT-ICR-MS ermöglichte das Signal bei m/z 205.09714 in ESI positivem Zustand und bei m/z 203.08261 in negativem Zustand die Bestätigung von $C_{11}H_{12}N_2O_2$ als molekulare Formel dieser Ionen mit einer sehr hohen Präzision (Fehler < 0.01 ppm) (Abbildung 8-4 C und D, für Details der chemischen Analysen siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan).

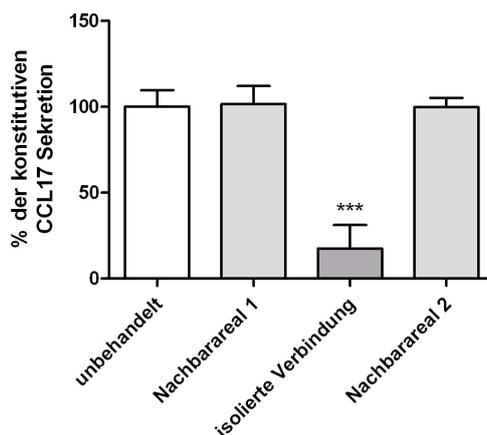


Abbildung 3-36: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit der isolierten Kandidatenverbindung.

Die Kandidatenverbindung für Bioaktivität wurde aus der LGG Subfraktion 6 und der W56 Subfraktion 7 nach $t_R=4.2$ min isoliert (für Details der chemischen Analyse siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit der Kandidatenverbindung stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Nachbarareale ebenfalls isoliert und in dem Bioassay mitgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.3.5. Kernspinresonanz-Spektroskopie NMR

Die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) ist die momentan leistungsfähigste Analyse-methode zur Aufklärung der Strukturen organischer Substanzen. In Ergänzung mit hochauflösender Massenspektroskopie ist es möglich, neben der Zusammensetzung auch die chemische Struktur organischer Substanzen zu ermitteln. Die NMR-Analyse ergab eine nahe Übereinstimmung zwischen den ^1H -NMR Spektren von Standard-Tryptophan und der Kandidatenverbindung (Abbildung 8-5, für Details der NMR-Analyse siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). Die Doppelt- und Dreifachpeaks zwischen δ 7.8–7.0 deuten das Auftreten eines Indol-Ringes an. Resonanzsignale in der Region von δ 3.9–3.8 und δ 3.2–3.1 konnten α -CH und β -CH zugeordnet werden, obwohl die Konzentration der bioaktiven Substanz sehr gering für die Anwendung dieser Technik war.

3.3.6. D-/L-Tryptophan: Enantiomeren-Separation und Chiralitätstest

Da L-Tryptophan Bestandteil des definierten Mediums CDM1 ist, wurde die Hypothese entwickelt, dass die bioaktive Eigenschaft möglicherweise auf die enantiomere D-Form der Aminosäure Tryptophan beschränkt ist, die von den probiotischen Bakterien erst gebildet und dann sezerniert wird. Deshalb wurde eine chemische Derivatisierungsreaktion durchgeführt, mit der es möglich war, eine enantiomere Separation der aufgereinigten bioaktiven Subfraktion durchzuführen (Abbildung 8-6 A, für Details der Enantiomeren-Separation siehe Dissertationsschrift von Herrn Dr. Fonseca, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan). So gelang es, neben L-Tryptophan auch die Anwesenheit von D-Tryptophan in der bioaktiven Subfraktion nachzuweisen. Wie vermutet enthielt die entsprechende inaktive Subfraktion von CDM1 nur die L-Form (Abbildung 8-6 B).

Neben dem chemischen Hinweis der Abhängigkeit der Bioaktivität von der Chiralität von Tryptophan sollte nun auch in den Bioassays direkt demonstriert werden, dass nur der D-Isomer immunmodulatorisch wirkt. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von D- und L-Tryptophan in beiden Assays getestet (Abbildung 3-37, DZ-Daten werden nicht gezeigt). Auch in diesen Versuchen zeigte nur D-Tryptophan Immunaktivität in beiden Systemen in einer Dosis-abhängigen Art und Weise, während L-Tryptophan in beiden Assays keinen Effekt bewirkte.

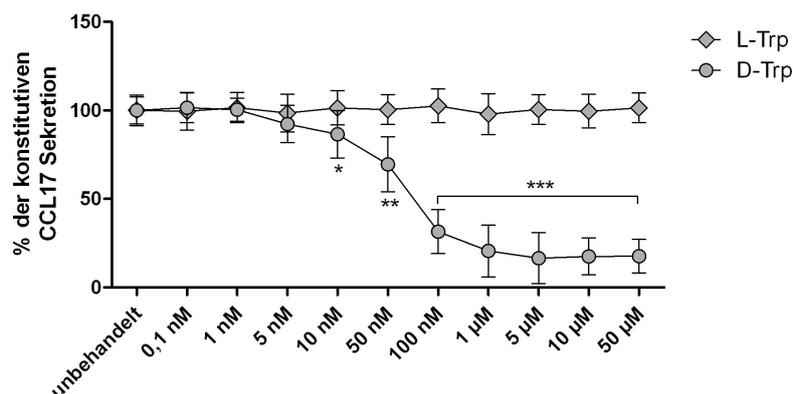


Abbildung 3-37: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit D- und L-Tryptophan.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von D- und L-Tryptophan stimuliert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der unbehandelten konstitutiven CCL17-Sekretion.

3.3.7. Screening von D-Aminosäure-Standards

Nun stellte sich die Frage, ob neben D-Tryptophan die D-Isomere anderer Aminosäuren in der Lage sind, ähnliche immunologische Veränderungen hervorzurufen. Dafür wurden von elf weiteren synthetischen Aminosäuren die zwei optischen Formen in beiden Bioassays untersucht (Tabelle 3-2, Daten der L-Isomere und KM-H2-Daten werden nicht gezeigt). Als konkordantes Ergebnis zeigte sich, dass sowohl die L- als auch alle D-Isomere aller weiteren getesteten Aminosäuren inaktiv waren.

Tabelle 3-2: Prozentsatz von Marker⁺- DZ nach Behandlung mit D-Aminosäuren

	D-Alanin	D-Histidin	D-Isoleucin	D-Leucin	D-Methionin	D-Phenylalanin
CD83	97.67 ± 2.29	103.09 ± 0.33	100.51 ± 1.18	97.07 ± 2.39	102.40 ± 2.19	99.55 ± 2.02
CD86	99.24 ± 2.13	102.49 ± 0.43	99.84 ± 1.19	101.94 ± 1.34	102.22 ± 2.53	99.19 ± 3.33
CD80	98.34 ± 2.64	102.02 ± 0.88	98.23 ± 1.48	100.28 ± 1.55	100.39 ± 0.15	92.40 ± 3.45
CD40	102.34 ± 3.36	101.44 ± 3.22	100.43 ± 2.41	100.37 ± 1.72	102.66 ± 0.60	100.35 ± 2.72
HLA-DR	98.06 ± 1.06	99.85 ± 0.93	100.08 ± 0.33	98.95 ± 9.97	98.91 ± 2.02	98.02 ± 3.17

	D-Prolin	D-Serin	D-Threonin	D-Tryptophan	D-Tyrosin	D-Valin
CD83	100.98 ± 0.40	100.78 ± 0.29	102.62 ± 0.46	7.63 ± 3.31	101.63 ± 0.56	102.06 ± 1.20
CD86	101.18 ± 1.85	101.08 ± 2.76	102.09 ± 0.68	24.14 ± 2.67	102.23 ± 0.85	101.77 ± 0.87
CD80	100.32 ± 0.10	100.13 ± 2.78	100.76 ± 0.35	12.11 ± 1.68	101.62 ± 0.37	99.62 ± 2.03
CD40	99.19 ± 1.33	100.78 ± 1.12	100.56 ± 1.49	15.18 ± 6.51	100.37 ± 1.25	101.42 ± 2.35
HLA-DR	98.39 ± 2.60	98.64 ± 0.58	97.06 ± 3.91	88.85 ± 2.96	98.43 ± 2.42	100.02 ± 1.02

Die D-Isomere der getesteten Aminosäuren hatten keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD83, CD86, CD80, CD40 und HLA-DR durch LPS-gereifte DZ. DZ wurden mit LPS in der Anwesenheit der aufgelisteten D-Aminosäuren [10 µM] für 24 h stimuliert. Daten aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwerte ± SD relativ zur LPS-induzierten Stimulation).

3.4. Molekulare Mechanismen

3.4.1. Zytokinprofil von DZ induziert von probiotischen Überständen und D-Tryptophan

Um einen ersten Einblick in potentielle Mechanismen der Immunmodulation zu erhalten, wurden das immunregulatorische Zytokin IL-10, das Th2-Zytokin IL-5 und die Th1-Zytokine IFN- γ und IL-12 in den Zellüberständen von DZ 24 h nach Behandlung mit ausgewählten probiotischen Überständen (Abbildung 3-38) oder Tryptophan (Abbildung 3-39) in An- oder Abwesenheit von LPS quantifiziert. LPS alleine führte zu einer deutlichen Induktion von IL-5, IL-12 und IFN- γ , nicht aber von IL-10 in den DZ. Alle sieben getesteten probiotischen Überstände von sowohl Lactobazillen als auch Bifidobakterien verringerten LPS-induziertes IL-5, IL-12 und IFN- γ . Im Gegensatz dazu induzierten die probiotischen Überstände die IL-10-Sekretion von immaturren DZ, was in der Anwesenheit von LPS noch verstärkt wurde. Dies deutet möglicherweise auf einen synergistischen Effekt hin. Ein ähnliches Muster konnte bei D-Tryptophan, nicht aber bei L-Tryptophan beobachtet werden. Insgesamt resultierte dies in einem gesteigerten IL-10/IL-12 Verhältnis und in einem verminderten IL-5/IFN- γ Verhältnis (Ausnahme: BB-46). Bei keiner der Negativkontrollen (Überstand von DSM20021 und die Enantiomere der Aminosäure Prolin) konnte ein ähnlicher Effekt gesehen werden.

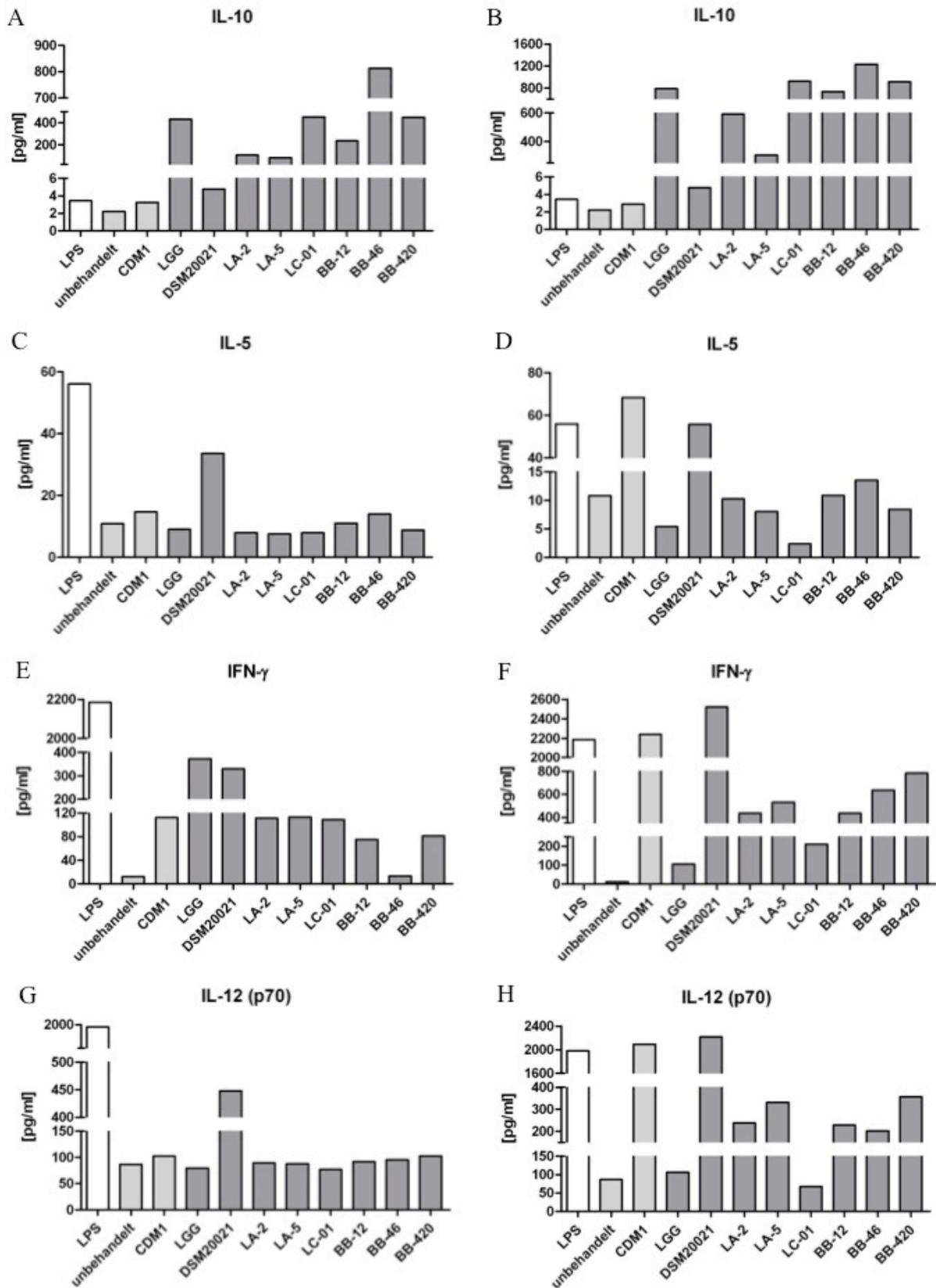


Abbildung 3-38: Zytokin-Quantifizierung in den Überständen humaner DZ nach Behandlung mit ausgewählten probiotischen Überständen.

Immature DZ wurden mit den Überständen ausgewählter probiotischer *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. in (A), (C), (E) und (G) in Abwesenheit von LPS und in (B), (D), (F) und (H) in Anwesenheit von LPS stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die zellfreien DZ-Überstände gewonnen und die Zytokine (A), (B) IL-10, (C), (D) IL-5, (E), (F) IFN- γ und (G), (H) IL-12 (p70) mittels eines Milliplex-Assays quantifiziert.

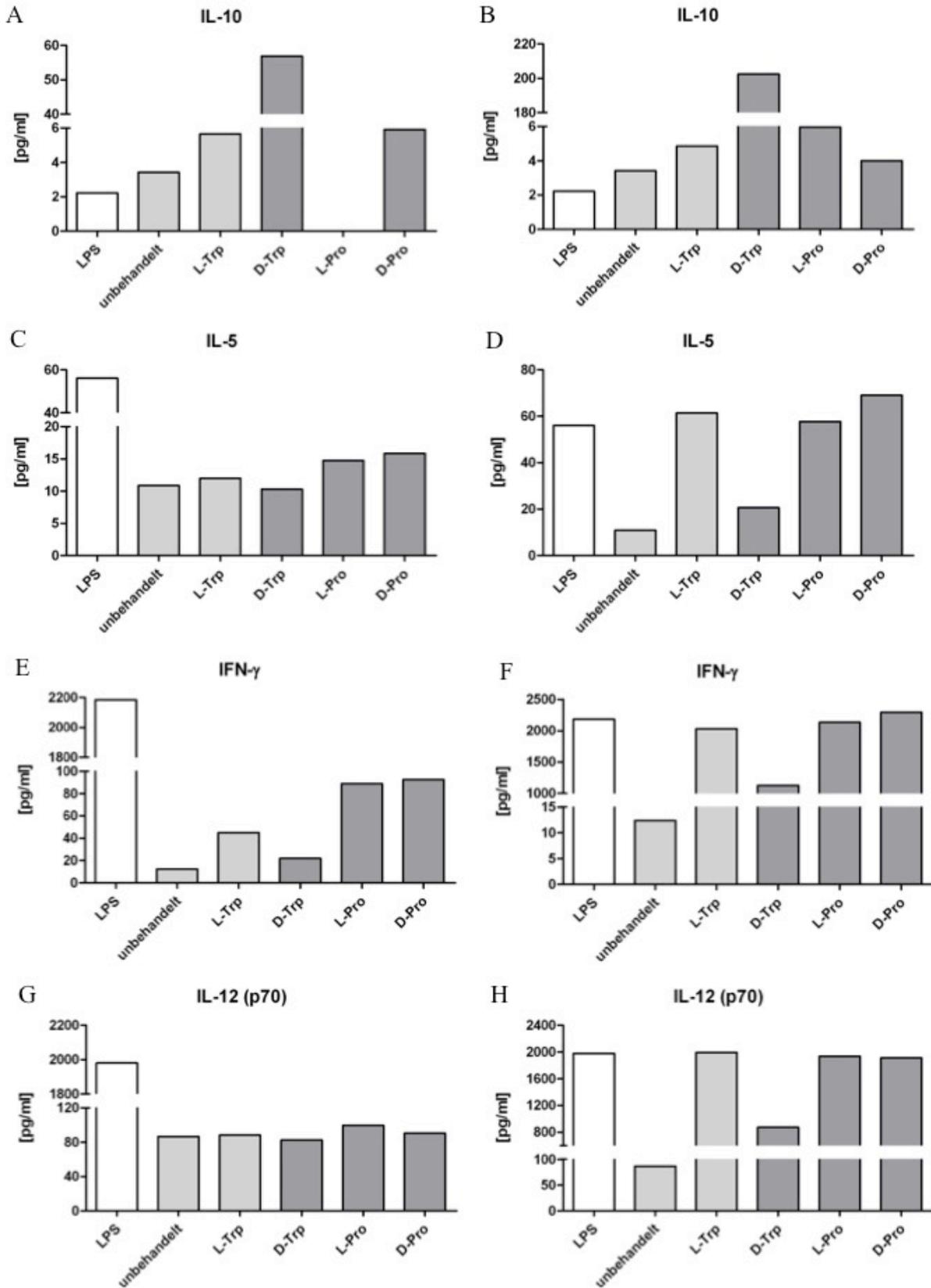


Abbildung 3-39: Zytokin-Quantifizierung in den Überständen humaner DZ nach Behandlung mit L- und D-Tryptophan.

Immature DZ wurden mit L- oder D-Tryptophan in (A), (C), (E) und (G) in Abwesenheit von LPS und in (B), (D), (F) und (H) in Anwesenheit von LPS stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die zellfreien DZ-Überstände gewonnen und die Zytokine (A), (B) IL-10, (C), (D) IL-5, (E), (F) IFN- γ und (G), (H) IL-12 (p70) mittels eines Milliplex-Assays quantifiziert.

3.4.2. Vorversuche zur Überprüfung von Kandidatenrezeptoren für D-Tryptophan: AhR und GPR109b

In einem letzten Schritt sollte versucht werden, Kandidatenrezeptoren für D-Tryptophan zu finden. Nach Literaturrecherche rückten zwei Rezeptoren in den Fokus, an die D-Tryptophan möglicherweise bindet und so die immunmodulatorische Kaskade starten könnte. Zunächst wurde der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor AhR als möglicher Kandidatenrezeptor untersucht. Dies wurde in einem bereits etabliertem Assay in dem Labor von Herrn Tobias Stoeger, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Deutschland durchgeführt [184]. Kurz zusammengefasst wurden murine Alveolar-Typ-II-Zellen mit L-, D-Tryptophan oder der Positivkontrolle Benzantracen behandelt und nach 24 h wurde die Expression des AhR-abhängigen Transkriptionsfaktors Cyp1a1 mittels RT PCR gemessen (Abbildung 3-40). Dabei wurde festgestellt, dass in den murinen LA-4 Zellen sowohl D- als auch L-Tryptophan mit nahezu identischer Affinität an den AhR binden und somit die Expression von Cyp1a1 induzieren. Somit konnte in diesem Modell nicht nachgewiesen werden, dass nur D-Tryptophan spezifisch an AhR bindet und so seine immunaktiven Effekte vermittelt.

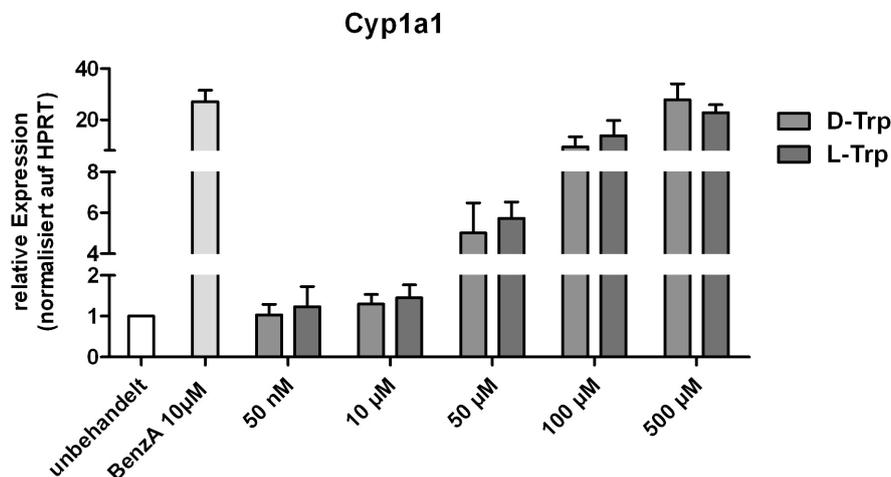


Abbildung 3-40: Cyp1a1-mRNA-Expression in murinen LA-4 Zellen nach Behandlung mit D- oder L-Tryptophan.

Murine LA-4 Zellen wurden mit L- oder D-Tryptophan stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die AhR-abhängige Cyp1a1-mRNA-Expression mittels RT PCR gemessen. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Stimulation diente 10 µM Benzantracen. Veränderungen der Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar.

Als nächster potentieller Kandidat wurde der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR109b auf humanen DZ überprüft. Zunächst wurden *GPR109b*-spezifische Primer hergestellt, um mittels

RT PCR herauszufinden, ob die hier generierten DZ diesen Rezeptor überhaupt exprimieren. Bei der *GPR109b*-RT PCR ergab sich sowohl für die Neutrophilen Granulozyten als Positivkontrolle als auch für die DZ ein Signal auf mRNA Ebene (Abbildung 3-41). So konnte bestätigt werden, dass die hier generierten DZ positiv für GPR109b sind. Eine Prüfung auf Funktionalität des exprimierten GPR109b lässt dieser Versuchsansatz jedoch nicht zu.

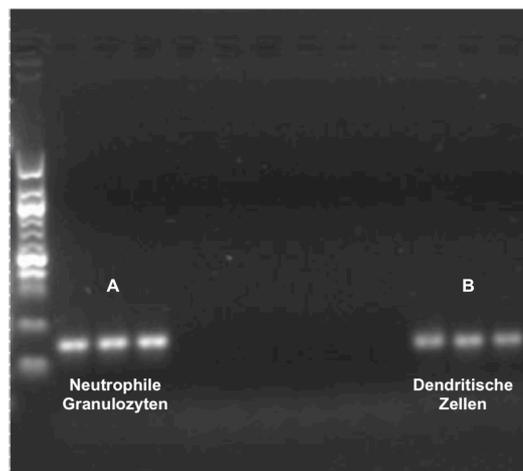


Abbildung 3-41: Bild der Agarose-Gelelektrophorese der *GPR109b*-RT PCR.

Humane Neutrophile Granulozyten und DZ wurden aus venösem Vollblut isoliert bzw. generiert. Anschließend wurde eine *GPR109b*-spezifische RT PCR durchgeführt und die Amplifikate auf ein 2,5% iges Agarose-Gel aufgetragen. Unter **A** sind die Triplikate der *GPR109b*-RT PCR mit Neutrophilen Granulozyten zu sehen, welche *GPR109b* stark exprimieren und hier als Positivkontrolle dienen. Unter **B** sind die Triplikate der *GPR109b*-RT PCR mit dendritischen Zellen aufgetragen.

Nachdem bewiesen werden konnte, dass die DZ *GPR109b* exprimieren, sollte nun mit dem Agonisten 1-(Isopropyl)-1H-Benzotriazol-5-Carbonsäure ($C_{10}H_{11}N_3O_2$) untersucht werden, ob durch die Aktivierung des GPR109b ähnliche immunmodulatorische Effekte hervorgerufen werden können wie mit D-Tryptophan. Dazu wurde das Triazolderivat in unterschiedlichen Konzentrationen im DZ-System getestet (Abbildung 3-42). Es stellte sich heraus, dass $C_{10}H_{11}N_3O_2$ in keiner der getesteten Konzentrationen einen herabregulierenden Effekt auf die DZ-Oberflächenmoleküle ausübte und somit keine D-Tryptophan vergleichbare Bioaktivität aufwies. Somit konnte in diesem System nicht bewiesen werden, dass die immunmodulatorischen Effekte über GPR109b induziert werden.

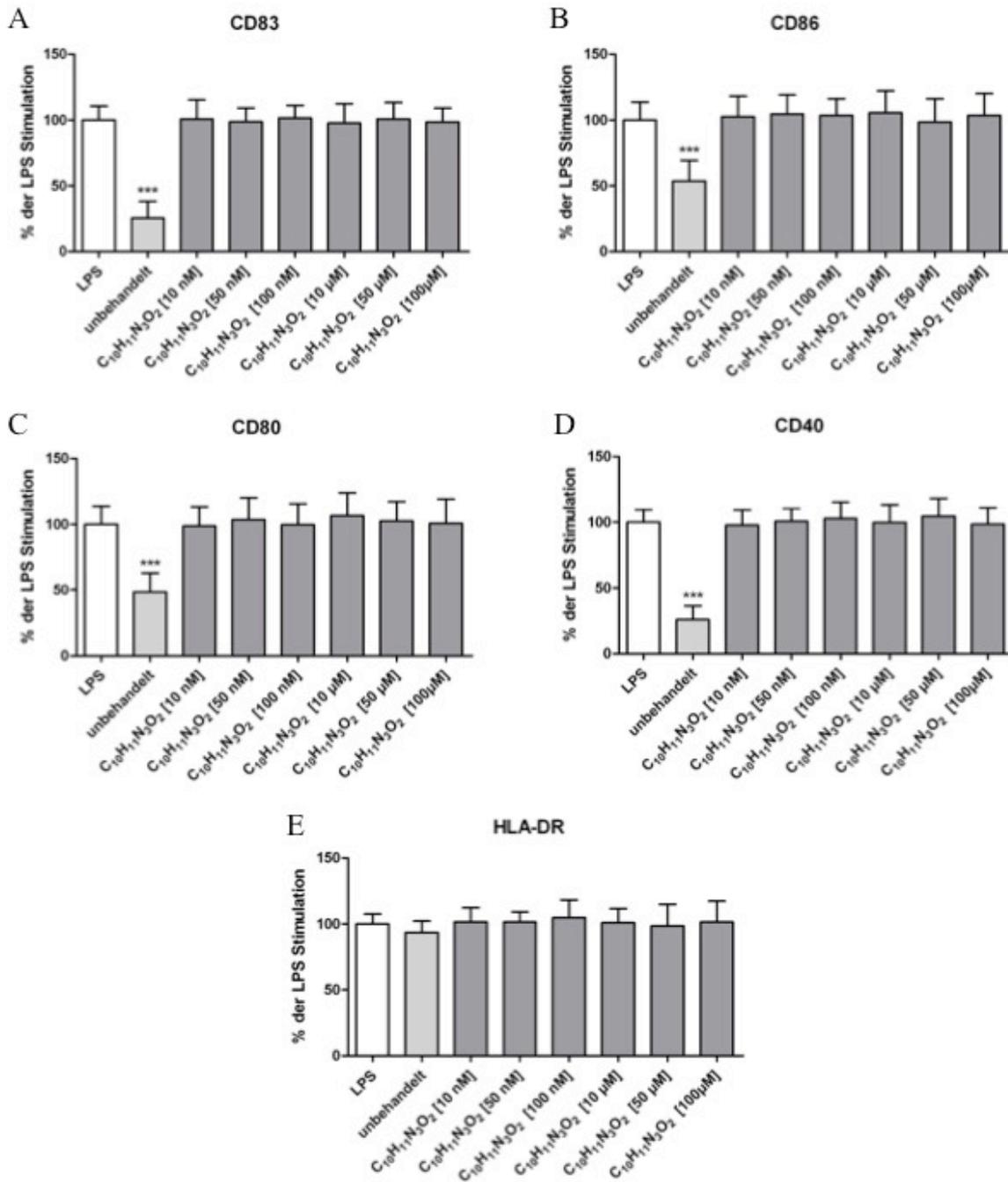


Abbildung 3-42: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem GPR109B-Agonisten 1-(Isopropyl)-1H-Benzotriazol-5-Carbonsäure ($C_{10}H_{11}N_3O_2$).

Humane DZ wurden in Anwesenheit von LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen von $C_{10}H_{11}N_3O_2$ stimuliert. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD86, (C) CD80, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

4. DISKUSSION

Es ist bekannt, dass probiotische Bakterien Immunantworten *in vitro* (z.B. [185], [186], [187]) und in Tiermodellen (z.B. [188], [189]) modulieren können, aber ihre klinische Wirksamkeit für die Prävention oder Behandlung chronischer inflammatorischer Erkrankungen bleibt umstritten [190]. Grund dafür mag zumindest teilweise die komplexe Interaktion zwischen den Bakterien und sowohl der Darmflora als auch dem Immunsystem des individuellen Menschen sein. Deshalb könnte die Applikation von definierten kleinen bakteriellen Molekülen mit immunmodulatorischem Potential eine interessante Alternative sein.

4.1. Screening-Systeme

Lösliche niedermolekulare Verbindungen von probiotischen Bakterien sind bis heute kaum untersucht und allgemeine anerkannte Screening Systeme für eine definierte Immunaktivität in probiotischen Überständen existieren nicht [191], [192], [186], [187].

4.1.1. CCL17-Sekretion von KM-H2 Zellen

CCL17, auch bekannt als „*thymus and activation-related chemokine*“ TARC, ist ein inflammatorisches, Th2- und Allergie-assoziiertes Chemokin. Die späte allergische Inflammationsreaktion, welche einige Stunden nach dem Kontakt mit dem Allergen auftritt, ist charakterisiert durch eine Gewebeeinfiltration von antigenpräsentierenden Zellen, Eosinophilen und Th2-Zellen, welche zu den Gewebeschäden beitragen [193], [194]. Diese Infiltration der späte-Phase-Antwort wird u.a. streng von dem Chemokin CCL17 kontrolliert. CCL17 wird von antigen-präsentierenden Zellen, hauptsächlich DZ, in den inflammatorischen Regionen produziert und adressiert den Rezeptor CCR4, welcher hauptsächlich auf aktivierten Th2-Zellen zu finden ist [195], [196], [197], [198]. Aus diesem Grund wird CCL17 als Th2-Zytokin und als Allergie-assoziiert bezeichnet [195]. Während einer Entzündungsreaktion wird CCL17 also die Funktion der chemotaktischen Rekrutierung von aktivierten Th2-Zellen an den Ort der CCL17-Sezernierung zugesprochen [199], [200], [201]. Weiterhin wurde die Expression von CCL17 mit Th2-assoziierten allergischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht, da die CCL17-Levels im Plasma von Patienten mit atopischer Dermatitis, Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis signifikant höher sind als bei gesunden Individuen [202]. Viele wissenschaftliche Untersuchungen haben daraufhin gezeigt,

dass CCL17 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von solchen allergischen Erkrankungen spielen könnte. Bei Patienten mit erfolgreich behandelter allergischer Rhinitis war die CCL17 Serumkonzentration signifikant verringert [203]. Für atopische Dermatitis konnte bewiesen werden, dass die CCL17-Konzentration nach Gabe von Kortikosteroiden und oralen Antihistaminika reduziert war [204]. Darüber hinaus korreliert bei der atopischen Dermatitis die Stärke der CCL17-Expression innerhalb der Haut und im Serum eng mit dem Schweregrad dieser Hauterkrankung [195], [205], [206], [207]. Kawasaki *et al.* beobachteten, dass die Gabe von anti-CCL17-Antikörper den Grad der Luftweghypersensibilität in einem Mausmodell für allergisches Asthma verringern konnte [208]. Kinder, die zum Zeitpunkt ihrer Geburt hohe CCL17-Levels aufwiesen, entwickelten später auch eine allergische Erkrankung [209]. So wäre es denkbar, dass das Chemokin CCL17 die Th2-Dominanz bei allergischen Erkrankungen induziert und somit einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Es sind bereits einige Effekte auf die CCL17-Regulation durch probiotische Bakterien bekannt. In einem Mausmodell für Nahrungsmittelallergie konnte der Stamm *Lactococcus lactis* NCC 2287 u.a. die CCL17-Konzentration im Ileum senken und so allergische Manifestationen reduzieren [210]. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass das Probiotikum *Bifidobacterium longum* BB536 durch die Unterdrückung des Chemokins CCL17 die Symptome von Heuschnupfen signifikant mildern konnte [211], [212]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von probiotischen Überständen auf die CCL17-Sekretion in einem Screening System analysiert (Kapitel 3.1.1). Für dieses System fiel die Wahl auf KM-H2 Zellen. Das sind humane Hodgkin Lymphom Zellen, die 1974 aus dem Pleuraerguss eines erkrankten Mannes etabliert wurden [213], [214]. Mehrere Zelllinien des hämopoietischen Systems wurden als Kandidaten für den Ursprung dieser Zellen vorgeschlagen: T-Lymphozyten [215], B-Lymphozyten [216], [217], Makrophagen [218], Granulozyten [219] und dendritische Zellen [220]. Allgemein bekannt von KM-H2 Zellen ist, dass sie Eigenschaften von antigen-präsentierenden Zellen aufweisen [221]. Die jüngste Studie über KM-H2 Zellen spricht ihnen einen DZ-ähnlichen Phänotyp mit T-Zell-stimulatorischen Funktionen zu [222]. Bis jetzt ist ihre originale Natur jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Wie einige andere Hodgkin Lymphom Zellen sezernieren KM-H2 Zellen konstitutiv große Mengen des Chemokins CCL17 [177], [176]. Ko-kultiviert man solche Hodgkin Lymphom Zellen mit T-Zellen, so entwickeln die T-Zellen einen aktivierten Th2-Phänotyp [223], [224]. Aufgrund dieser Eigenschaften schienen KM-H2 Zellen bestens für das Screening System geeignet. Es zeigte sich auch in dem hier etabliertem Model, dass viele der getesteten probiotischen Überstände zu einer signifikant reduzierten CCL17-

Konzentration im KM-H2 Kulturmedium führten und somit einen stark hemmenden auf die CCL17-Sekretion der KM-H2 Zellen ausübten (Kapitel 3.1.1.1.1). Kinetische Studien mit den KM-H2 Zellen zeigten den stärksten Effekt der Überstände nach 24 h mit einer Abschwächung nach 48 h. Diese ist wahrscheinlich auf ein weiteres kontinuierliches Wachstum der Tumorzelllinie zurückzuführen, was mit der Zeit eine niedrigere Menge an bakteriellem Überstand pro Zelle zur Folge hat. Somit ist es gelungen, ein System zu etablieren, das spezifisch ist für die Detektion einer anti-Th2-immunmodulatorischen Aktivität.

4.1.2. Kostimulatorische Oberflächenmarker auf DZ

Für ein Testsystem, das die Ergebnisse des KM-H2 Screeningtests auf biologische Relevanz überprüfen sollte, wurden humane dendritische Zellen (DZ) gewählt, da dieser Zelltyp als Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem essentiell für die Initiierung einer Immunantwort ist und auch gleichzeitig die Polarisierung dieser Reaktion bestimmt. So besitzt das DZ-Testsystem eine starke immunologische Aussagekraft. DZ im gastrointestinalen Immunsystem spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf intestinale Bakterien, einschließlich der kommensalen Bakterien. DZ werden von gewebespezifischen Faktoren, welche meist von Epithelzellen stammen, konditioniert und polarisieren naive T-Zellen in Th1-, Th2- oder regulatorische T-Zellen [225]. Darüber hinaus spielen DZ eine wichtige Rolle bei atopischen Erkrankungen [226]. Durch die Kontrolle der Entwicklung von Toleranz auf Allergene, könnten DZ die Entstehung von atopischen Erkrankungen regulieren und erscheinen somit als potentes Target in der therapeutischen und präventiven Beeinflussung des Immunsystems.

Die Generierung der unreifen humanen DZ aus Monozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Protokoll von Sallusto und Lanzavecchia durchgeführt, was eine etablierte und häufig angewandte Methode darstellt [92], [227] (Kapitel 2.3.9.11). Der Anteil LPS-gereifter CD83⁺, CD80⁺, CD86⁺ und CD40⁺ DZ entsprach den bekannten Zahlen aus der Literatur [228]. Auch die Morphologie und der Phänotyp stimmte mit veröffentlichten Ergebnissen überein [229], [230]. Die Thrombozyten wurden im Protokollprozedere durch eine sanfte Zentrifugation entfernt, da sie sich später an die Monozyten anhaften und diese so aktivieren hätten können [231]. Die Anreicherung der Monozyten erfolgte mittels Plastikadhärenz, einer einfachen und kostengünstigen Methode im Vergleich zu immunomagnetischen Selektionen, für die aber einige Nachteile beschrieben sind [232]. Ein Nachteil besteht in der

Kontamination aus Lymphozyten, vor allem B- und T-Zellen und verbliebenen Monozyten. Kontaminationsrelevante Parameter, wie die Dauer der Adhärenz und die Anzahl der Waschschriffe zur Entfernung der nichthaftenden Zellen wurden dementsprechend optimal angepasst [233] und so betrug der Anteil an kontaminierenden CD3⁺ und CD16⁺ Zellen unter 4%.

Für diese Arbeit wurden die Monozyten, aus denen dann die DZ generiert wurden, aus venösem Vollblut isoliert. Oft werden Modelle, welche die Darmmukosa imitieren, bevorzugt, da sie der *in vivo* Situation mit den zahlreichen Mikromilieufaktoren näher kommen [234]. Die mukosale Subpopulation von DZ im GIT besteht jedoch hauptsächlich aus myeloiden Zellen monozytärer Herkunft, so dass das hier gewählte System als Model akzeptabel ist.

Nach einer Antigenerkennung durchlaufen naive DZ einen komplexen Reifungsprozess, der die Expression von Aktivierungs- und kostimulatorischen Markern, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, sowie die Wanderung in lokale Lymphknoten umfasst, wo sie in Interaktion mit T-Zellen treten, welche daraufhin charakteristische Funktionen, entsprechend der klinischen Situation, annehmen [235]. Während komplett aktivierte DZ angeborene und erworbene Immunantworten induzieren, führt deren unvollständige Aktivierung zu einem Zustand, der als Toleranz bekannt ist [236]. Aus diesem Grund wurde in dem DZ-System nach einer reduzierten Expression kostimulatorischer Moleküle in Anwesenheit von probiotischen Überständen gesucht. Da der phänotypische Reife- und Aktivierungsgrad von DZ u. a. anhand des Expressionsmusters der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 bestimmt werden kann, wurden diese Moleküle als Messparameter herangezogen [237]. Es zeigte sich, dass alle Überstände, die im KM-H2 System schon Aktivität gezeigt hatten, auch in der Lage waren, sowohl die LPS-induzierte Expression der Aktivierungsmarker zu unterdrücken, als auch eine bereits erfolgte Aktivierung herabzuregulieren (Kapitel 3.1.2). Auf immature naive DZ hatten die Überstände keine Auswirkungen. Aufgrund der Schwierigkeit, humane DZ von charakterisierten Spendern in ausreichender Menge zu generieren, konnten Kinetik- und Konzentrationsstudien mit diesen Zellen nicht durchgeführt werden.

Somit ließ sich feststellen, dass alle aktiven Überstände neben einem anti-Th2-Effekt im KM-H2 System, auch einen tolerogenen Phänotyp in den LPS-behandelten reifen DZ induzieren konnten.

Es gibt bereits zahlreiche Studien, die sich mit einem probiotischen Einfluss auf DZ befassen. In fast allen diesen Arbeiten wurden lebende Bakterien verwendet und keine zellfreien

Überstände. Bis heute gibt es auch noch keine Studie, in welcher der Effekt von probiotischen Überständen auf Aktivierungs- und kostimulatorische Oberflächenmarker humaner LPS-stimulierter DZ im Kontext von allergischen Erkrankungen untersucht wurde. In einigen Studien wurde der Effekt von lebenden Probiotika auf den Phänotyp von naiven DZ untersucht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. In der Arbeit von Christensen *et al.* hatten inaktivierte *Lactobacillus* spp. einen aktivierenden Effekt auf naive murine DZ und führten zu einer Heraufregulation von CD86 [238]. Drakes *et al.* untersuchten eine Kombination aus acht unterschiedlichen probiotischen Stämmen (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. und *Streptococcus* sp.) und beobachteten entweder keinen, oder aber auch einen stimulierenden Effekt auf die Expression von CD80, CD86 und CD40 auf naiven murinen DZ [239]. Die Behandlung mit verschiedenen Probiotika induzierte bei Latvala *et al.* ebenfalls eine Maturation in naiven humanen DZ [240]. Auch Gillet-Hladky *et al.* publizierten vergleichbare Daten. Bei ihnen führte die Stimulation von naiven humanen DZ mit dem Zellwandbestandteil *LCOS 1013* eines probiotischen Bakterienstammes zu einer gesteigerten CD86-, CD40- und CD80-Expression [241]. Die Studie von Thomas *et al.*, welche ein der vorliegenden Arbeit vergleichbares experimentelles Design hatte, stützt jedoch die hier erzielten Ergebnisse. Die probiotische *Saccharomyces boulardii* reduzierte signifikant die LPS-induzierte Expression von CD40 und CD80 auf humanen DZ [242]. Hart *et al.* beobachteten ebenfalls eine signifikant verminderte Expression von CD80 auf humanen DZ nach Stimulation mit unterschiedlichen Bifidobakterium-Stämmen und einen Trend zu einer verminderten CD40-Expression [243]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein direkter Vergleich dieser Studien schwierig ist, da der jeweilige experimentelle Aufbau entscheidende Unterschiede aufweist: einmal werden lebende, das andere Mal inaktivierte Bakterien eingesetzt, die Bakterienstämme sind verschieden, es werden bakterielle Mono- oder Mischkulturen eingesetzt, die untersuchten DZ stellen häufig unterschiedliche Subpopulationen dar und können sogar von unterschiedlichen Spezies stammen. Es wurden jedoch auch bei ähnlichen Versuchsansätzen mit intakten probiotischen Bakterien durchaus vergleichbare Effekte beschrieben.

4.1.3. Zusammenfassung DZ- System und KM-H2-System

Obwohl in dieser Arbeit die Empfindlichkeit und Spezifität der beiden Screening Systeme nicht direkt gegen einen allgemeinen Standard getestet werden konnten, zeigten beide Systeme konkordante Ergebnisse für alle getesteten Überstände und probiotischen Fraktionen. Die Systeme waren so gewählt, dass sie solche Substanzen detektieren, die ein tolerogenes Profil in DZ induzieren und das Allergie-assoziierte Chemokin CCL17, welches aktivierte Th2-Zellen rekrutiert, vermindern. Deshalb ist es möglich, dass andere immunregulatorische Substanzen, die keine allergischen Erkrankungen betreffen, nicht erfasst wurden.

Der Fokus dieser Arbeit lag ferner auf der Identifikation einer mutmaßlich bioaktiven Verbindung in den 20% MeOH-Fractionen der probiotischen Überstände, da die Fraktionen mit dieser Polarität die stärkste immunmodulatorische Aktivität aufwiesen. Bioaktivität wurde auch in der 40% und der 50% MeOH-Fraktion nachgewiesen, was die Möglichkeit für die Identifizierung weiterer immunaktiver Substanzen bietet.

4.2. D-Aminosäuren

In der vorliegenden Studie ist es gelungen, biologische Systeme für den Nachweis von immunmodulatorischer Aktivität in den zellfreien Überständen probiotischer Bakterien zu entwickeln. Die schrittweise chemische Fraktionierung der Überstände zusammen mit Aktivitätstest der erhaltenen Subfraktionen führte zu der Identifikation von D-Tryptophan als neue lösliche, probiotische Verbindung mit immunmodulatorischen Eigenschaften.

D-Aminosäuren sind nicht-proteinogene Enantiomere der L-Aminosäuren. Bis zur Entdeckung von freiem D-Aspartat [244] und D-Serin [245] in den Gehirn von Säugetieren um 1990 herum, maß man D-Aminosäuren keine größere Bedeutung in komplexeren Organismen zu. Aufgrund der relativ großen Menge von D-Aspartat und D-Serin im Gehirn, wurde die Forschung über D-Aminosäuren hauptsächlich auf das Nervensystem beschränkt. Die Analyse von D-Tryptophan in anderen Geweben und Körperflüssigkeiten ist aufgrund von fehlenden sensiblen Techniken zur Quantifizierung geringer Mengen von D-Aminosäuren erschwert [246].

Im Gegensatz zu höheren Organismen produzieren eine Reihe von Bakterien D-Aminosäuren wie D-Glutamat und D-Alanin. Sie benutzen diese für die Vernetzung von Glykan-Ketten in der Zellwand [247], [248]. Während die Regulation des bakteriellen L-Tryptophan-Metabolismus gut erforscht ist [249], wurde erst kürzlich eine Rolle für D-Tryptophan in dem probiotischen Stamm *Bacillus subtilis* entdeckt, welche demonstriert, dass es zusammen mit

D-Leucin, D-Tyrosin und D-Methionin zur Zerstörung bakterieller Biofilme führt [250]. Dieser Cocktail aus D-Aminosäuren konnte sogar die Biofilmbildung der Pathogene *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* verhindern.

Da der menschliche Körper eine ergiebige und komplexe Vielfalt an Mikroben beherbergt [251], ist es sehr wahrscheinlich, dass er mit D-Aminosäuren in Kontakt kommt [252]. Ähnlich zu dem, was bereits für Acyl-Homoserin-Laktone von Gram-negativen Bakterien gezeigt wurde, ist es möglich, dass die Mechanismen zur Erkennung und Interaktion mit bakteriellen D-Aminosäuren einschließlich D-Tryptophan ko-evolviert sind [253], [254], [255], [256], [257], [258], [259].

Techniken für eine direkte Quantifizierung von D-Tryptophan stehen noch nicht zur Verfügung. Die hier angewandten chemischen Methoden zur Anreicherung und Identifizierung von D-Tryptophan erlauben keine quantitativen Aussagen, was die Kalkulation der Konzentrationen in den unbearbeiteten Überständen leider unmöglich macht. Die Experimente mit Tryptophan-Isomeren zeigten eine signifikante Immunmodulation für D-Tryptophan bei einer Konzentration ab 10 nM mit einem Maximum zwischen 0,1 µM und 1 µM, während L-Tryptophan bis 50 µM inaktiv blieb. Des Weiteren belegen die Experimente mit D-Tryptophan, dass der immunmodulatorische Effekt auf die DZ und KM-H2 Zellen unabhängig von weiteren probiotischen Kofaktoren ist.

4.3. Mögliche Mechanismen probiotischer Aktivität

In zahlreichen *in vitro* Studien z.B. [251], [185], [186] und Tierversuchen z.B. [188], [189] werden lebende Probiotika verwendet, um den probiotischen Wirkmechanismus zu erforschen. Da das menschliche Mikrobiom in gesunden Individuen beträchtliche Unterschiede aufweist, ist es sehr schwer, aufbauend auf *in vitro* Daten oder Tierversuche, Vorhersagen über die Funktionalität eines probiotischen Stammes im Menschen zu treffen.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist, dass die Anzahl lebender Bakterien in funktionalen Lebensmitteln mit der Zeit abnimmt [260]. Auf diese Weise befinden sich neben den lebenden auch inaktivierte Bakterien in den Nahrungsmitteln, was deren Verhalten möglicherweise beeinflussen kann. Dies trägt noch weiter zu der Ungewissheit bei, wie lebende Bakterien und der individuelle Wirt aufeinander reagieren.

Bei der Untersuchung der Oberflächenmarker der DZ konnte festgestellt werden, dass der probiotische immunmodulatorische Effekt in dem hier angewandten Modell wahrscheinlich

auf der Induktion eines tolerogenen Phänotyps beruht. Um den ersten Einblick in mögliche Mechanismen der Immunmodulation zu vertiefen, wurde das Zytokinprofil behandelter DZ untersucht.

4.3.1. Zytokine

Da in dieser Arbeit mit einer Mischpopulation aus DZ und kontaminierenden Lymphozyten gearbeitet wurde, der kontaminierende Anteil jedoch vernachlässigbar gering war, darf angenommen werden, dass die gemessenen Zytokinkonzentrationen überwiegend von DZ stammten. Alle getesteten probiotischen Überstände reduzierten LPS-induziertes IL-4, IL-12 und IFN-gamma. In naiven DZ induzierten die unbehandelten Überstände die Produktion von IL-10. Darüber hinaus führte die Anwesenheit von *E. coli*-LPS über einen möglichen synergistischen Mechanismus zu einer vermehrten IL-10-Synthese, was die Interaktion mit den Produkten anderer Bakterien andeutet. Ein ähnliches Muster wurde mit D-Tryptophan, nicht aber mit L-Tryptophan oder anderen D-Aminosäuren, beobachtet. Insgesamt resultierte die Behandlung mit probiotischen Komponenten in erhöhten IL-10/IL-12 Verhältnissen und verminderten IL-4/IFN-gamma Verhältnissen.

Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche *in vitro* Studien gestützt, welche die Effekte von verschiedenen probiotischen Bakterien auf mononukleäre Zellen untersucht haben. Diese Effekte schließen die Suppression von Th2-Zytokinen und die Induktion von T_{reg} mit ein. Für *B. bifidum*, *B. infantis* und *Lc. lactis* wurde gezeigt, dass sie die Produktion von Th2-Zytokinen reduzieren konnten und potente Auslöser einer IL-10 Produktion in PBMZ waren [261]. Vissers *et al.* demonstrierten ebenfalls, dass unterschiedliche *Lactobacillus* spp. Th2-Zytokine in den PBMZ allergischer Individuen reduzieren konnten [262]. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 für die Oberflächenmarker erwähnt, arbeiten die meisten Studien mit lebenden bakteriellen Mono- oder Mischkulturen und nicht mit zellfreien Überständen, so dass ein direkter Vergleich erschwert ist. In zwei relativ aktuellen Studien wurden aber auch bakterielle Überständen eingesetzt und auch dort konnte eine Verminderung von proinflammatorischen Zytokinen und eine Induktion von IL-10 beobachtet werden [263], [264].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier erzielten Ergebnisse frühere Beobachtungen bestätigen, dass probiotische Bakterien ihre positiven Effekte bei atopischen Erkrankungen möglicherweise durch die spezifische Reduktion von Th2-Zytokinen, kombiniert mit der Induktion von IL-10 und den daraus resultierenden regulatorischen

Mechanismen, ausüben. Die Auswirkungen von aufgenommenen probiotischen Bakterien bzw. Substanzen auf das intestinale und systemische Immunsystem sind jedoch mit komplexen Wirt-Mikroben-Interaktionen verknüpft, bei deren Untersuchung und molekularen Aufklärung man gerade erst am Anfang steht [265].

4.3.2. Kandidatenrezeptoren für D-Tryptophan

Die mögliche Beteiligung von spezifischen Rezeptoren bei der D-Tryptophan-Reaktion wird durch folgende Beobachtungen gestützt. Erstens arbeiten die hier etablierten Screening Systeme mit menschlichen Zellen, die sehr selektiv auf D-Tryptophan reagieren, aber weder auf L-Tryptophan noch auf andere gestestete D-Aminosäuren. Zweitens existieren im Menschen mindestens zwei Rezeptoren für D-Tryptophan: D-Tryptophan und sein Metabolit D-Kynurenin wirken als Chemoattraktoren für menschliche Neutrophile mittels des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR109B bei einer Konzentration von 0,1 mM [266]. Dieser Rezeptor wird von Makrophagen, Monozyten, Lungen- und Fettgewebe in höheren Primaten exprimiert [267], [268]. In dieser Arbeit konnte GPR109B auf mRNA-Level in den hier generierten humanen DZ nachgewiesen werden, jedoch war ein chemischer Agonist nicht in der Lage, die Oberflächenmarker der reifen DZ ähnlich wie D-Tryptophan herab zu regulieren. Eine hier vorgenommene Analyse von bereits veröffentlichten Transkriptom-Daten zeigte aber, dass GPR109B in den Atemwegsepithelzellen von Kindern mit allergischem Asthma deutlich herabreguliert war im Vergleich zu nicht-atopischen gesunden Kindern. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der Rezeptor GPR109B möglicherweise in allergische Erkrankungen involviert ist.

Ein zweiter Rezeptor, der Aminosäuretransporter SLC6A14 (SLC-Transporter Nummer 14 alias ATB^{0,+}) transportiert D-Tryptophan und andere D-Aminosäuren durch Epithelzellen [269]. Aufgrund seiner hohen Expression im Dickdarm ist SLC6A14 einer starken bakteriellen Last und Vielfalt ausgesetzt. Weiter ist SLC6A14 ausnehmend stark in der fötalen Lunge exprimiert [270], aber seine physiologische Funktion in der fötalen Periode ist bis jetzt noch unklar.

Weitere Literaturrecherche hat ergeben, dass es noch einen möglichen dritten Kandidatenrezeptor für D-Tryptophan gibt. Es konnte gezeigt werden, dass Indol-enthaltende Substanzen den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor AhR potent aktivieren können [271]. Die Mehrzahl dieser AhR-Liganden sind chemische Abkömmlinge von Tryptophan, die durch zahlreiche biologische und physiochemische Prozesse entstehen (Abbildung 4.1). Dabei

spielte es keine Rolle, ob diese Substanzen endogen vorkommen oder mit der Nahrung aufgenommen wurden. Leider wurden in dieser Studie keine Aussagen über mögliche enantiomerbedingte Unterschiede gemacht.

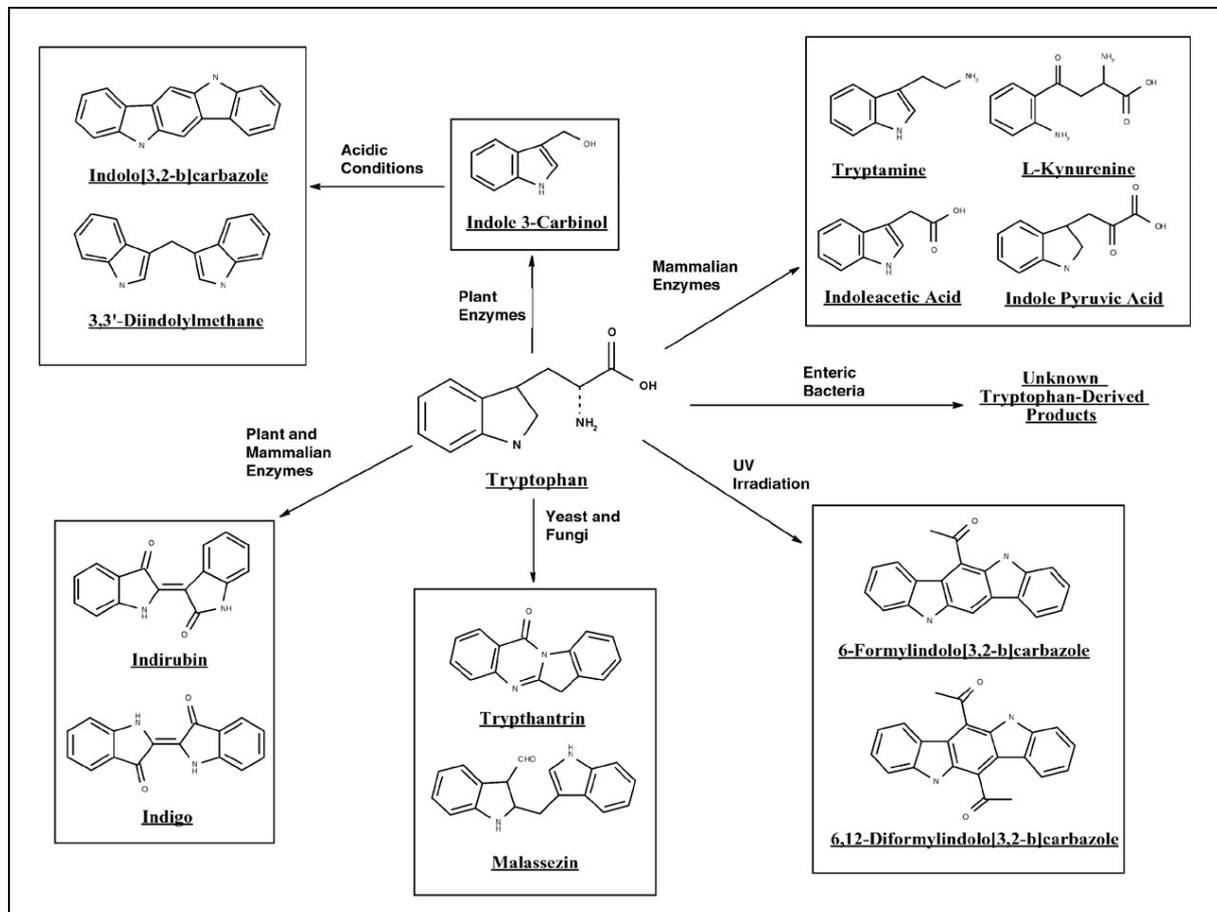


Abbildung 4-1: Umwandlung von Tryptophan in AhR-Liganden.

Die indolhaltige Aminosäure Tryptophan kann durch zahlreiche Mechanismen in AhR-Liganden konvertiert werden und so die Expression AhR-abhängiger Gene induzieren. Übernommen aus Denison et Nagy 2003 [271].

Desweiteren ist der AhR bekannt für seine zahlreichen Funktionen im menschlichen Immunsystem. Besonders scheint er mit der Induktion immuntolerogener Phänotypen und Mechanismen assoziiert zu sein [272], [273], [274], [275].

Die Aktivierung des AhR führt zur Induktion zahlreicher spezies- und gewebespezifischer Gene [276], [277], [278], [279], [280]. Obwohl zahlreiche Gene durch AhR reguliert werden, sind diejenigen am besten untersucht, welche xenobiotaabbauende Enzyme, wie CYP1A1, kodieren. Die Induktion von CYP1A1 ist eine der AhR-abhängigen Antworten, die übereinstimmend in vielen Spezies gefunden wurde und mittlerweile als Modellsystem für die Aktivierung von AhR benutzt wird [271]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in murinen

LA-4 Zellen überprüft, ob D-Tryptophan, im Gegensatz zu L-Tryptophan, an AhR bindet und die Expression von *cyp1a1* auslöst. In diesem Assay induzierten aber beide Tryptophanisomere die Expression von *cyp1a1* und präsentierten sich als AhR-Liganden mit nahezu identischer Affinität. Somit konnte die Hypothese von AhR als spezifischem Rezeptor für immunaktives D-Tryptophan in dieser murinen Zelllinie nicht bestätigt werden.

In anderen Arbeiten wurde von dem niedermolekularen AhR-Agonisten VAF347 demonstriert, dass er in einem Mausmodell für Th2-abhängiges allergisches Asthma als potente immunsuppressive Verbindung wirkt [281], [282]. Darüber hinaus konnten Jeong *et al.* vor kurzem zeigen, dass ein Photoreaktionsprodukt von Tryptophan als physiologischer Ligand für AhR fungiert, und über dessen Aktivierung die Produktion von Th2-Zytokinen in einem Mausmodell für allergisches Asthma unterdrücken kann [283]. So scheint es weiterhin denkbar, dass dieser Rezeptor bei allergischen Erkrankungen eine potentiell wichtige Rolle spielt.

4.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, *in vitro* Systeme zur Detektion von allergie-assoziiertes immunmodulatorischer Aktivität zu etablieren. Mit Hilfe dieser Systeme wurde D-Tryptophan als neue immunmodulatorische, lösliche Substanz identifiziert, die von den probiotischen Stämmen *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus casei* W56 produziert und sezerniert wird. Die beobachteten Effekte von D-Tryptophan sind unabhängig von der Anwesenheit weiterer probiotischer Kofaktoren. In mechanistischen und translationalen Studien bleibt es noch zu untersuchen, wie D-Tryptophan das menschliche Immunsystem und/oder das Mikrobiom im Darm beeinflusst. Es könnten unterschiedliche Applikationen ins Auge gefasst werden: erstens könnte D-Tryptophan -möglicherweise in Kombination mit anderen Verbindungen probiotischer Bakterien- lebende Bakterien in Supplementationsstudien ersetzen. Zweitens könnte D-Tryptophan als Biomarker für die Überwachung der Effektivität von Interventionsstrategien mit D-Tryptophan-produzierenden probiotischen Bakterien dienen. Für diesen Zweck ist es zwingend erforderlich, Testverfahren für die Quantifizierung von D-Tryptophan in menschlichem Plasma zu entwickeln. Drittens könnte mit D-Tryptophan eine Präselektion geeigneter probiotischer Stämme für definierte klinische Studien vorgenommen werden.

Insgesamt tragen die vorhandenen Daten zu der neu aufkommenden Überzeugung bei, dass D-Aminosäuren eine vermeintlich größere Rolle im menschlichen Organismus spielen, als bisher angenommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Schon seit längerer Zeit sind probiotische Bakterien Gegenstand intensiver Forschung. Unter Probiotika versteht man lebende, apathogene, mikrobielle Nahrungsmittelzusätze, die einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Wirtes haben. In zahlreichen Studien wurden neben der Mikrobiologie und der Sicherheit probiotischer Stämme auch mögliche positive Effekte bei der Behandlung von Darmerkrankungen und der Verhinderung von Infektionen untersucht. Da seit einigen Jahren die Häufigkeit allergischer Erkrankungen in den westlichen Ländern stark zunimmt, rückt nun auch die Erforschung ihres Einsatzes in der Prävention und Therapie von Atopien und Allergien in den wissenschaftlichen Fokus.

Ziel dieser Arbeit war es, erstens *in vitro* Screening Systeme für die Detektion immunmodulatorischer Aktivität in den Überständen probiotischer Bakterien zu etablieren, zweitens diese Systeme in einem Screening von kommerziell vertriebenen Stämme der Firma Winlove anzuwenden, und drittens mit Hilfe der Systeme sezernierte bakterielle Substanzen, welche die immunmodulatorische Aktivität vermitteln, biochemisch zu identifizieren.

Es ist gelungen, ein Screening System und ein Testsystem für immunmodulatorische Aktivität probiotischer Komponenten zu etablieren. Als Hochdurchsatzsystem wurde ein ELISA-basierter Ansatz entwickelt, welcher von Änderungen in der hohen konstitutiven Sekretion des Th2-assoziierten Chemokins CCL17 durch die humane Hodgkin Lymphom Zelllinie KM-H2 abhängt. Als Positivkontrolle für die gewünschte Bioaktivität wurde der Überstand des Keims *Lactobacillus rhamnosus* GG eingesetzt, da für diesen Keim die meisten positiven Effekte in klinischen Studien beschrieben sind. Als Negativkontrolle diente der Überstand des Stammes *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021, für den keine probiotische Aktivität dokumentiert ist. Allein die Überstände der probiotischen Stämme führten zu einer signifikanten Reduktion des Chemokins CCL17. Dieser anti-Th2-Effekt zeigte eine deutliche Dosis- und Zeitabhängigkeit mit einem klar definierten Sättigungslimit. Für eine unabhängige Bestätigung der immunmodulatorischen Aktivität in dem KM-H2 System wurde ein zweiter Test mit humanen dendritischen Zellen DZ entwickelt. Dieses System war so konstruiert, dass es Substanzen detektierte, welche durch die Unterdrückung von Aktivierungs- und kostimulatorischen Oberflächenmarkern ein tolerogenes Profil in den DZ induzierten. Für alle im KM-H2 Screening System erhaltenen immunmodulatorischen Ergebnisse konnten auch in dem DZ System übereinstimmende Resultate erzielt werden. Bei der ersten Anwendung der Screening Systeme führten 3/12 *Lactobacillus* spp., 2/4 *Bifidobacterium* spp., 0/1 *Enterococcus* sp., 1/3 *Lactococcus* sp. und 0/1 *Streptococcus* spp. zu einem positiven Resultat

und konnten als immunmodulatorische Stämme mit einer tolerogenen und anti-Th2-Aktivität neu charakterisiert werden.

Die Überstände von LGG und W56 wurden für eine weitere chemische Aufreinigung und Charakterisierung ausgewählt. Während der schrittweisen chemischen Fraktionierung wurden alle erhaltenen Proben auf Bioaktivität in beiden Systemen getestet. Nach der initialen Polaritätsauftrennung konnte in der 20% MeOH-Fraktion der Überstände beider Stämme konkordante immunmodulatorische Aktivität gefunden werden, ebenso in den 40% und 50% MeOH-Fractionen wenn auch in etwas abgeschwächter Form. Da die 20% MeOH-Fractionen die stärksten Effekte hervorriefen, wurden die weiteren chemischen Methoden wie UPLC und NMR auf diese Fraktion fokussiert mit dem Ergebnis, dass D-Tryptophan als spezifische immunmodulatorische bakterielle Substanz identifiziert werden konnte. Die noch uncharakterisierte Bioaktivität in den 40% und 50% MeOH-Fractionen bietet die Möglichkeit der Identifizierung weiterer aktiver probiotischer Verbindungen.

Eine erste Analyse möglicher zugrundeliegender Mechanismen im DZ-System ergab eine Suppression von IL-5, IL-12 und IFN- γ , sowie eine Induktion von IL-10 in LPS-gereiften DZ durch die probiotischen Überstände und D-Tryptophan.

Durch die erstmalige Entdeckung von D-Tryptophan als sezernierte bakterielle Verbindung mit immunmodulatorischen Eigenschaften, könnte der Grundstein gelegt sein für eine zukünftige Entwicklung von geeigneten pharmakologischen Substanzen für die Behandlung und/oder Prävention von chronischen Immunstörungen wie allergische Erkrankungen.

SUMMARY

For some time probiotic bacteria are the subject of intensive research. Probiotics are live, nonpathogenic microbial food supplements that have a beneficial impact on the host. Besides their microbiology and security, potential positive effects in the treatment of intestinal diseases and the prevention of infections were tested in numerous studies. As the prevalence of allergic diseases increased sharply over the last few years in western countries, their use in the prevention and treatment of atopic diseases and allergies moved in the scientific focus.

So the aim of the present work was firstly, to establish *in vitro* screening tools for the detection of immunomodulatory activity in probiotic supernatants, secondly to apply these systems in a screening of commercialized strains of the company Winclove, and thirdly to biochemically identify a secreted molecule that mediates the immune modulatory activity.

For high-throughput screening of immune modulatory activity, an ELISA based approach was developed. This assay depends on changes in the high constitutive secretion of the Th2-associated chemokine CCL17 by the human Hodgkin Lymphoma cell line KM-H2. As positive control for the desired biological activity, the microorganism *Lactobacillus rhamnosus* GG was designated as this is the probiotic strains with the most positive effects in clinical trials. The supernatants of the nonprobiotic *Lactobacillus rhamnosus* DSM20021 was used as negative control. As expected supernatants of the DSM20021 had no effect on the CCL17 concentrations, whereas the supernatants of the probiotic strains led to a significant decrease of CCL17 concentrations relative to untreated KM-H2. This anti-Th2 effect showed a clear dose- and time-dependence with a clearly defined saturation limit. For an independent confirmation of the immune modulatory activity seen in the KM-H2 system, a second assay using human monocyte derived dendritic cells DC was established. This system was designed for the detection of substances that induce a tolerogenic profile in DC by the suppression of activation and costimulatory surface markers. The same supernatants that had already been pre-identified as immune modulatory in the CCL17-based screen, also significantly decreased the percentages of CD83-, CD80-, CD86- and CD40-expressing-mature DC.

In the first application of the screening systems, 3/12 *Lactobacillus* spp., 2/4 *Bifidobacterium* spp., 0/1 *Enterococcus* sp., 1/3 *Lactococcus* sp. and 0/1 *Streptococcus* spp. had a positive result and could be newly characterized as immunomodulatory strains with a tolerogenic and anti-Th2 activity.

The supernatants of LGG and W56 were selected for further chemical enrichment and characterization. During the stepwise chemical fractionation all obtained samples were tested

for bioactivity in both systems. After an initial separation by polarity, a higher immune modulatory activity was found concordantly in both screening systems in the 20% along with slightly lower activity in the 40% and 50% MeOH fractions. Since the 20% MeOH fractions elicited the strongest effects, all the other successive chemical methods such as UPLC and NMR were focused on this fraction resulting in D-tryptophan as an identified specific immunomodulatory bacterial substance. The yet uncharacterized bioactivity in 40% and 50% holds the potential for the discovery of further small immunoactive compounds.

A preliminary analysis of possible underlying mechanisms in the DC-system revealed the suppression of IL-5, IL-12 and IFN- γ , as well as the induction of IL-10 in LPS-matured DC by the probiotic supernatants and D-tryptophan.

The finding of D-tryptophan as a secreted bacterial compound with functional immune modulatory properties might provide the basis for the future development of suitable substances for treatment and/or prevention of chronic immune disorders, such as allergic diseases.

6. ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

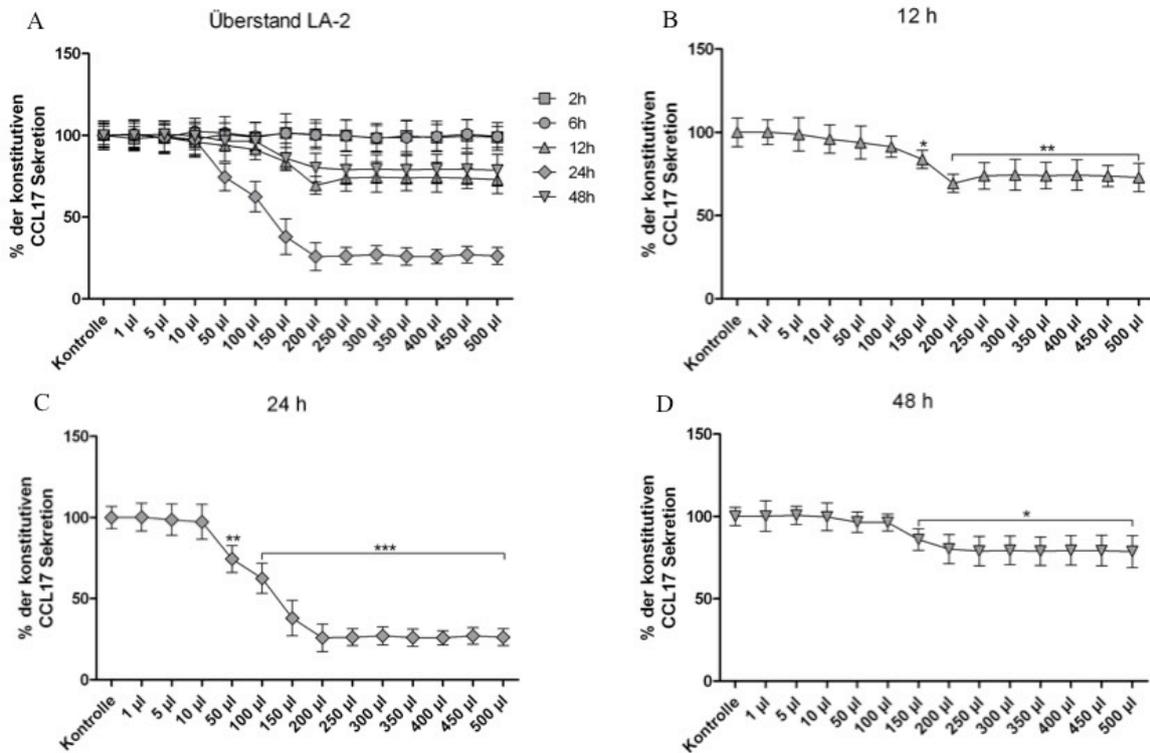


Abbildung 6-1: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-2.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur jeweils die Inkubationsdauern 12 h, 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

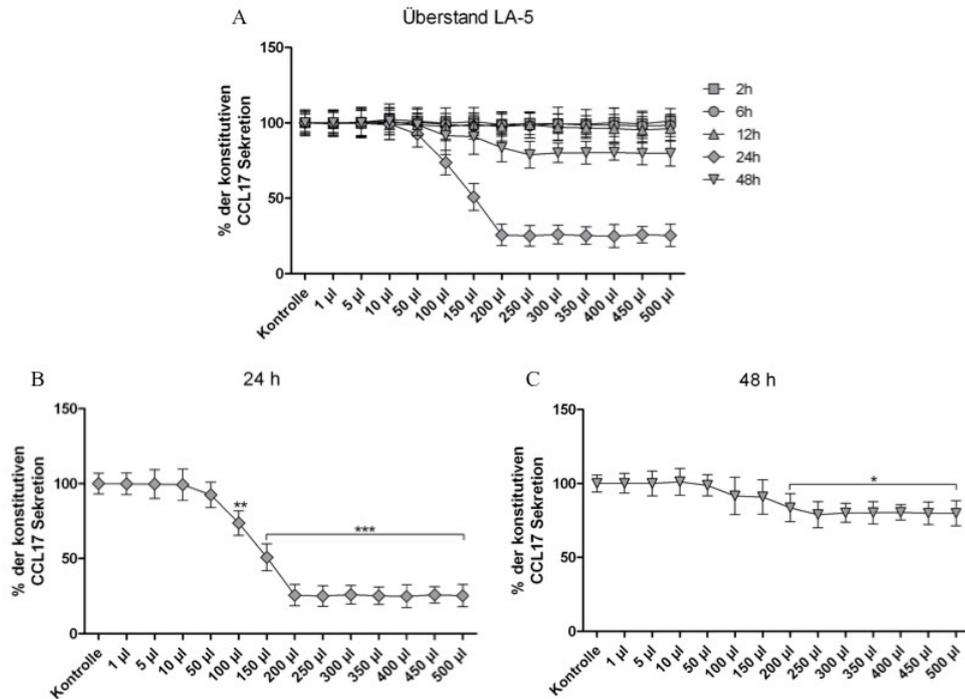


Abbildung 6-2: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur jeweils die Inkubationsdauern 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

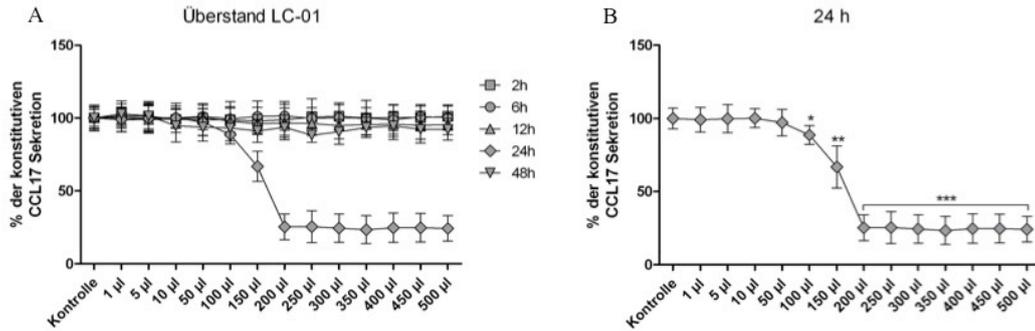


Abbildung 6-3: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus paracasei* LC-01.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstums-phase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) nur die Inkubationsdauer 24 h herausgegriffen ist, bei der eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

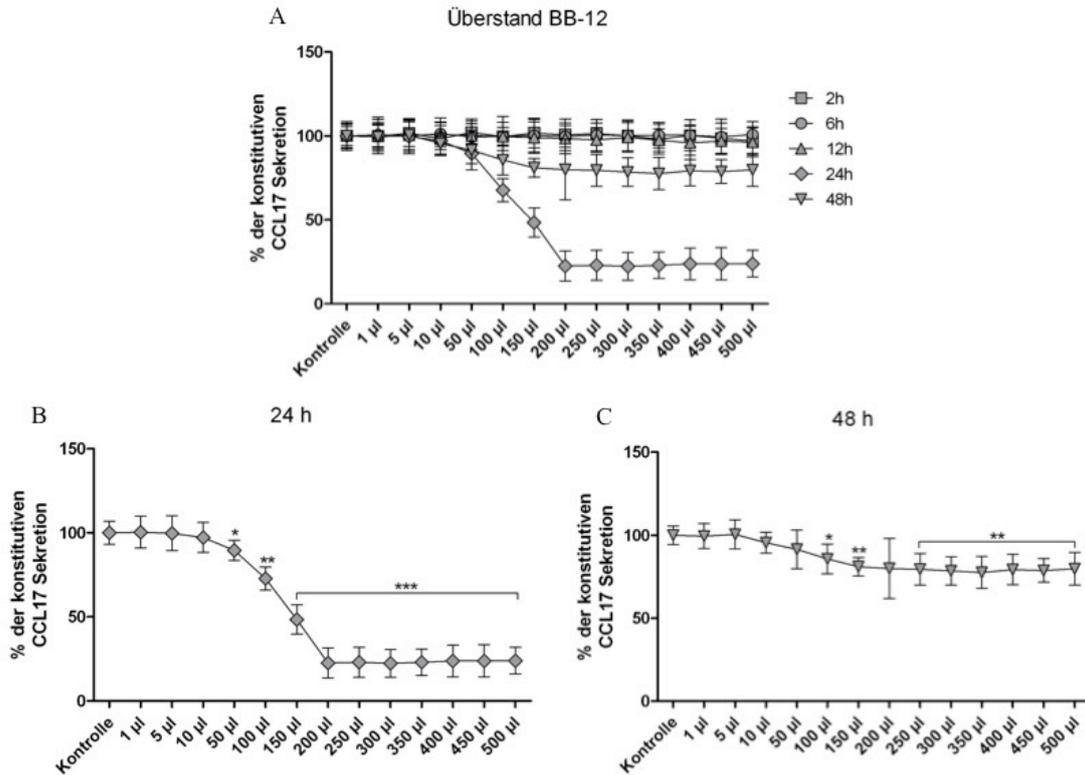


Abbildung 6-4: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstums-phase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur die Inkubationsdauern 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

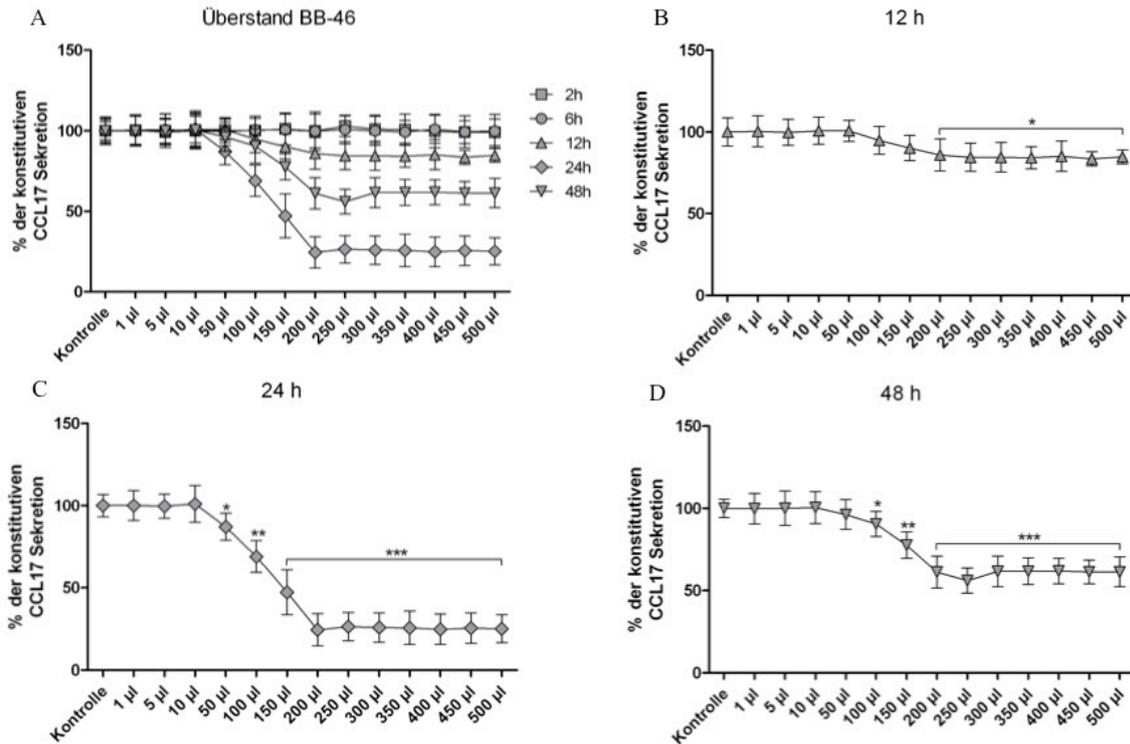


Abbildung 6-5: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium longum* BB-46.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstums-phase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur die Inkubationsdauern 12 h, 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

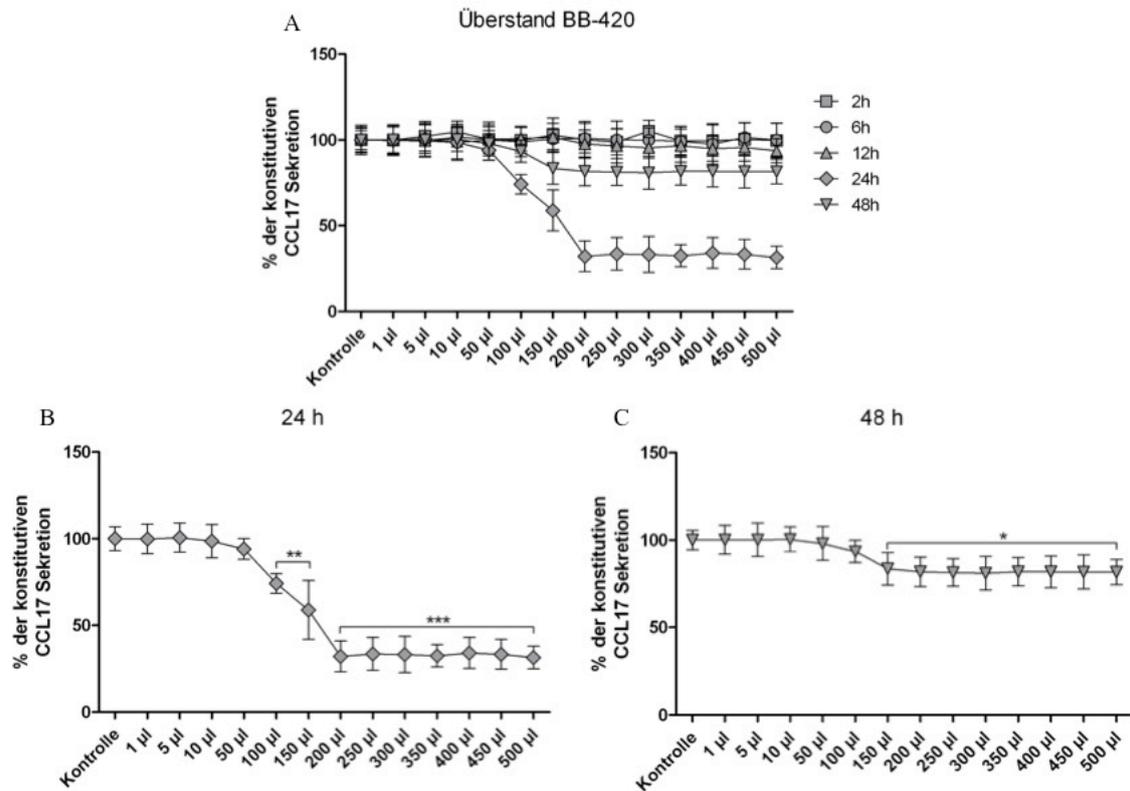


Abbildung 6-6: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium lactis* BB-420.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstums-phase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur die Inkubationsdauern 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

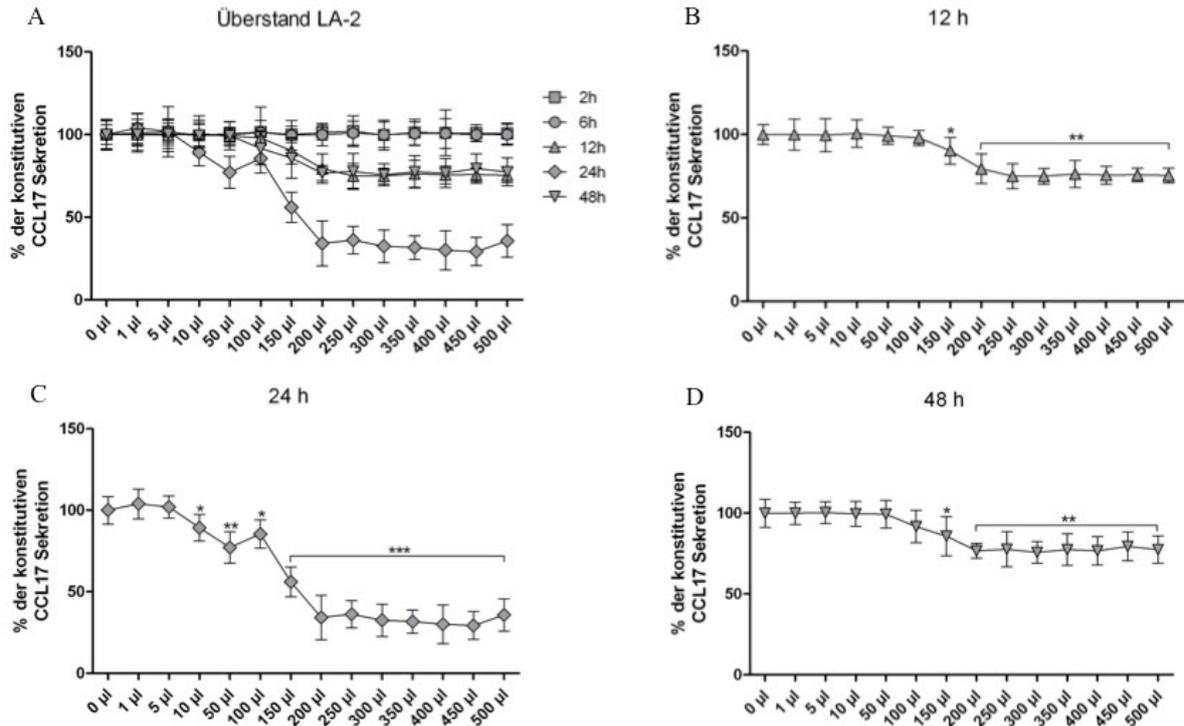


Abbildung 6-7: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-2.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur jeweils die Inkubationsdauern herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

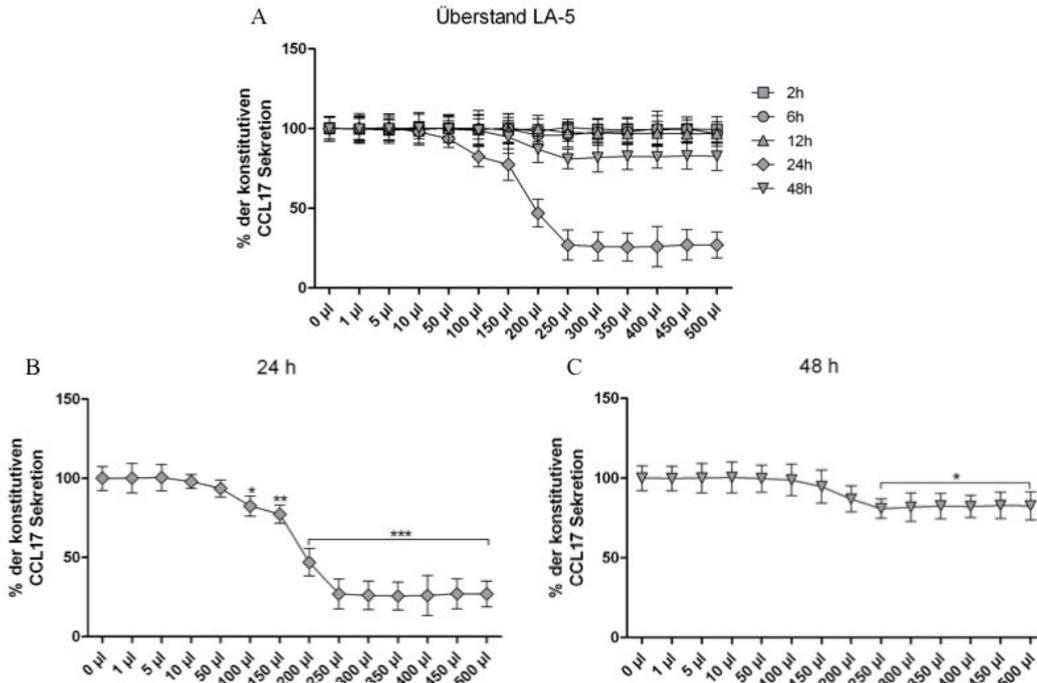


Abbildung 6-8: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur jeweils die Inkubationsdauern herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

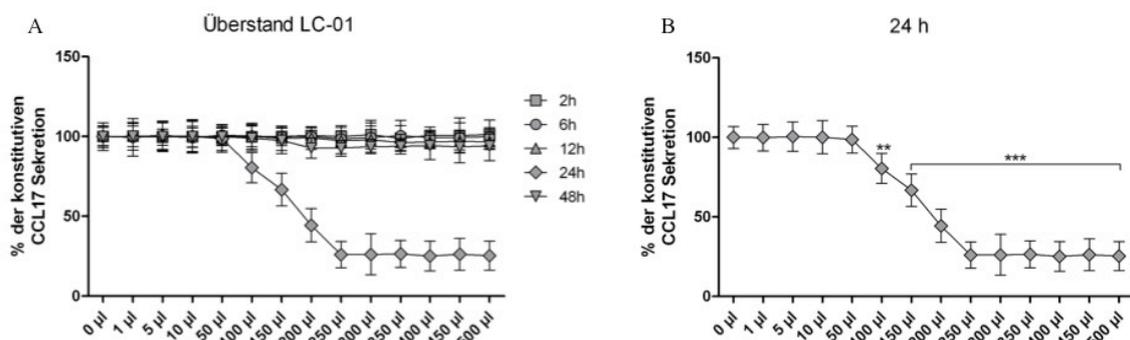


Abbildung 6-9: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus paracasei* LC-01.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) nur die Inkubationsdauer 24 h herausgegriffen ist, bei der eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit ** $p \leq 0.005$ und *** $p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

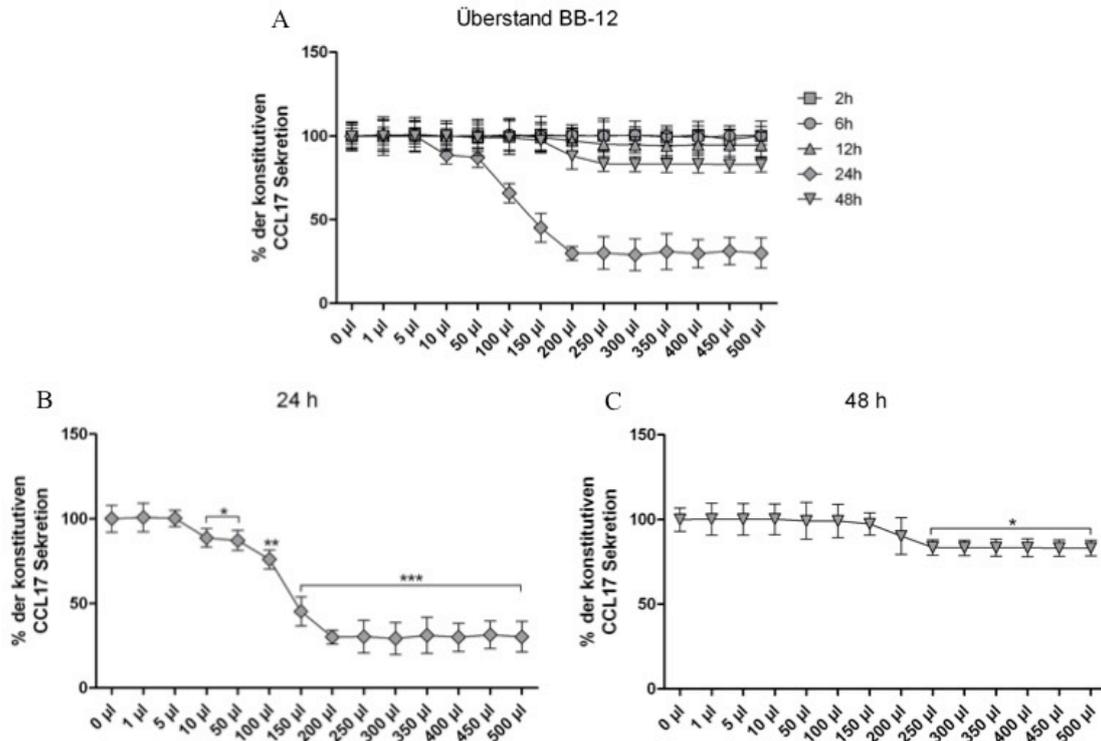


Abbildung 6-10: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur die Inkubationsdauern 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

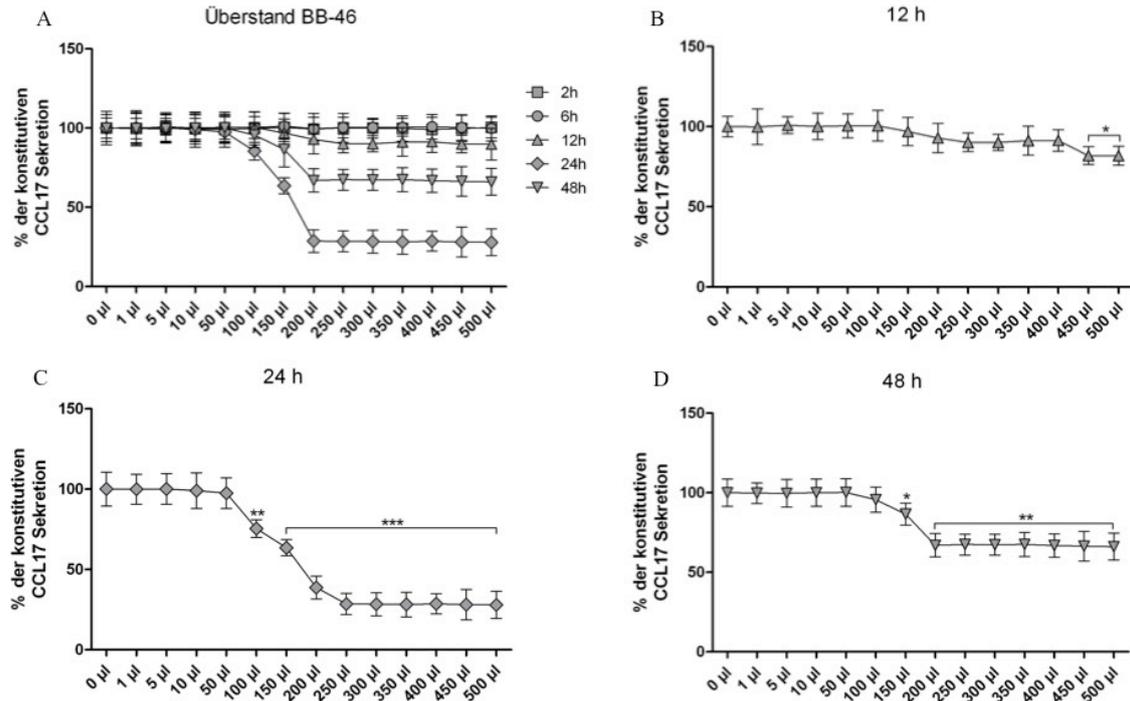


Abbildung 6-11: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium longum* BB-46.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B), (C) und (D) nur die Inkubationsdauern 12 h, 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

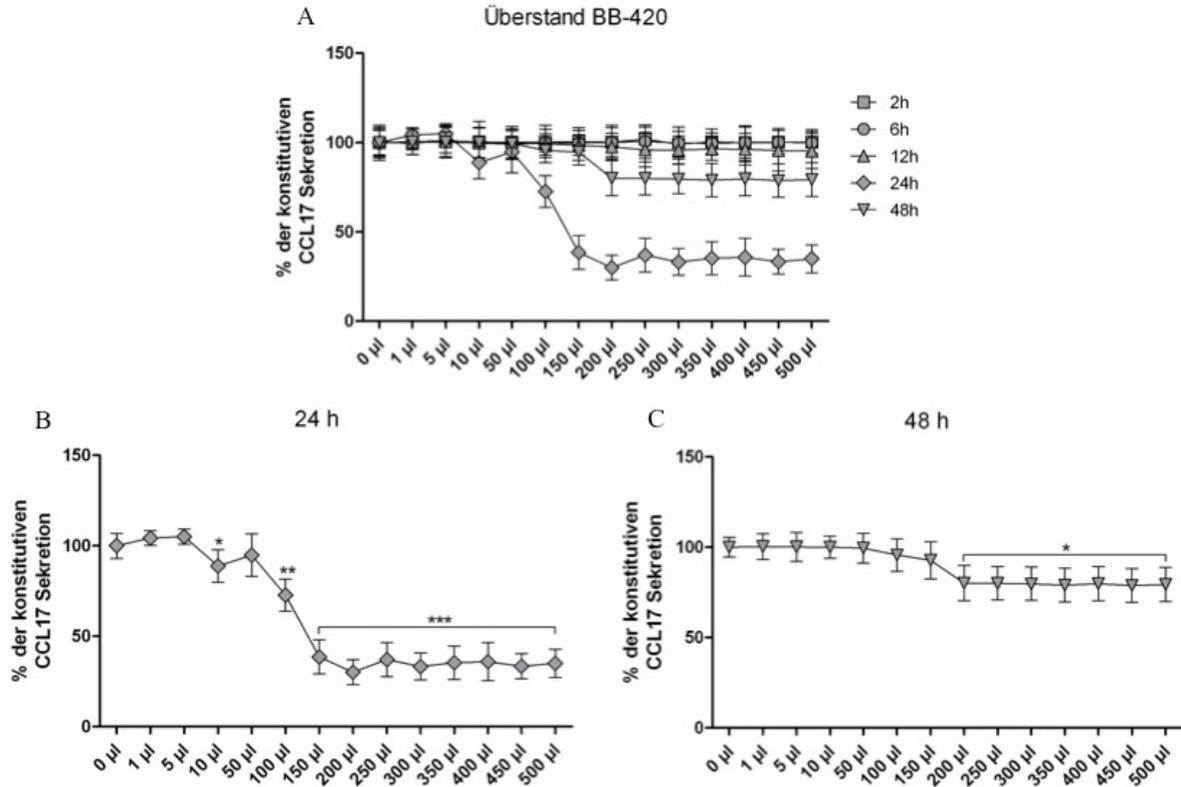


Abbildung 6-12: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium lactis* BB-420.

KM-H2 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mit unterschiedlichen Mengen des Bakterienüberstandes inkubiert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer wurden die zellfreien KM-H2 Überstände gewonnen und mittels ELISA auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. In (A) ist eine Übersicht aller Inkubationsdauern gezeigt, während in (B) und (C) nur die Inkubationsdauern 24 h und 48 h herausgegriffen sind, bei denen eine signifikante Herabregulation der CCL17 Sekretion zu beobachten war. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Student-t-Verteilung mit $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$ und $***p \leq 0.0005$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die Kontrolle mit der konstitutiven CCL17-Sekretion.

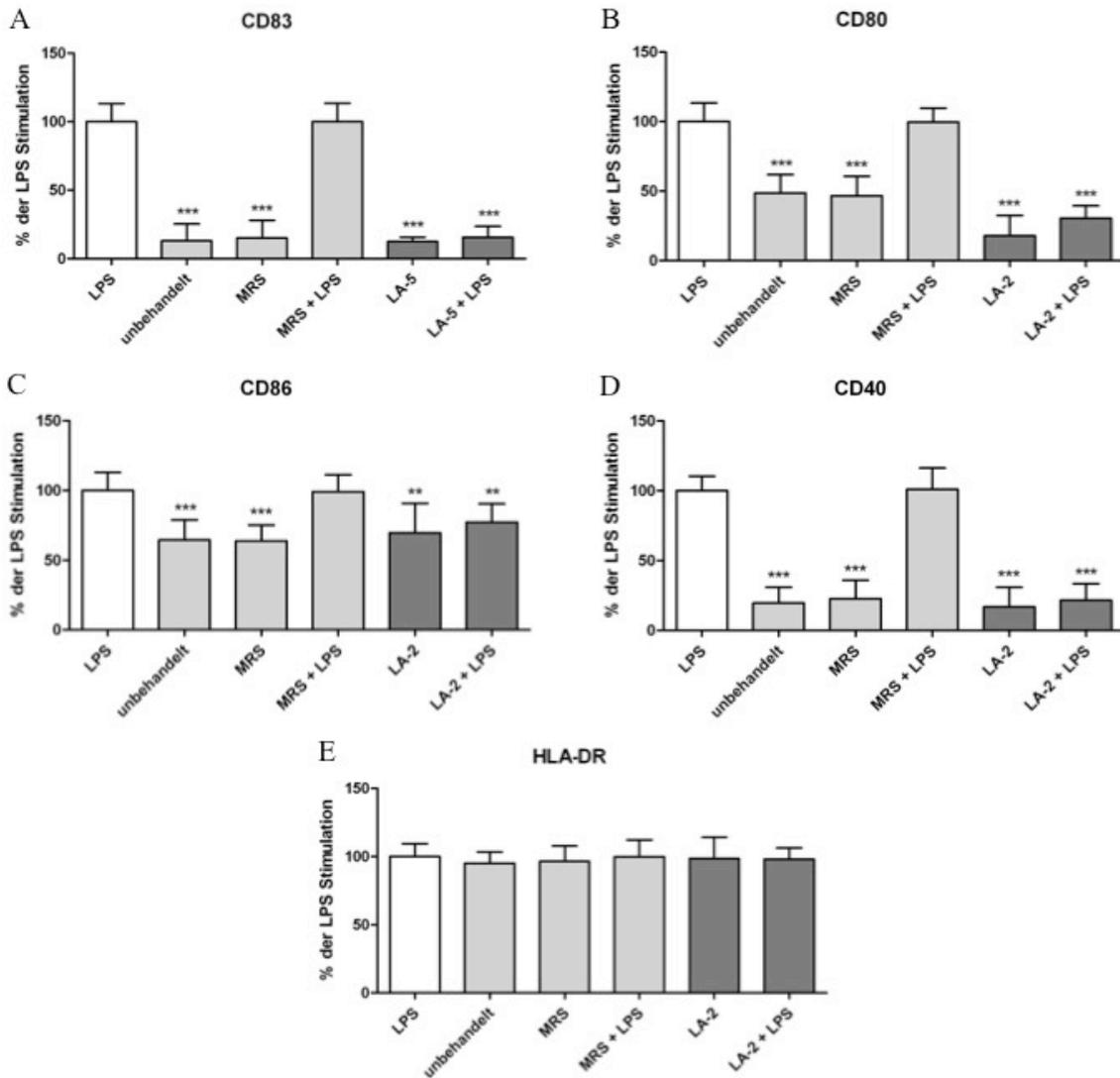


Abbildung 6-13: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-2.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DC dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

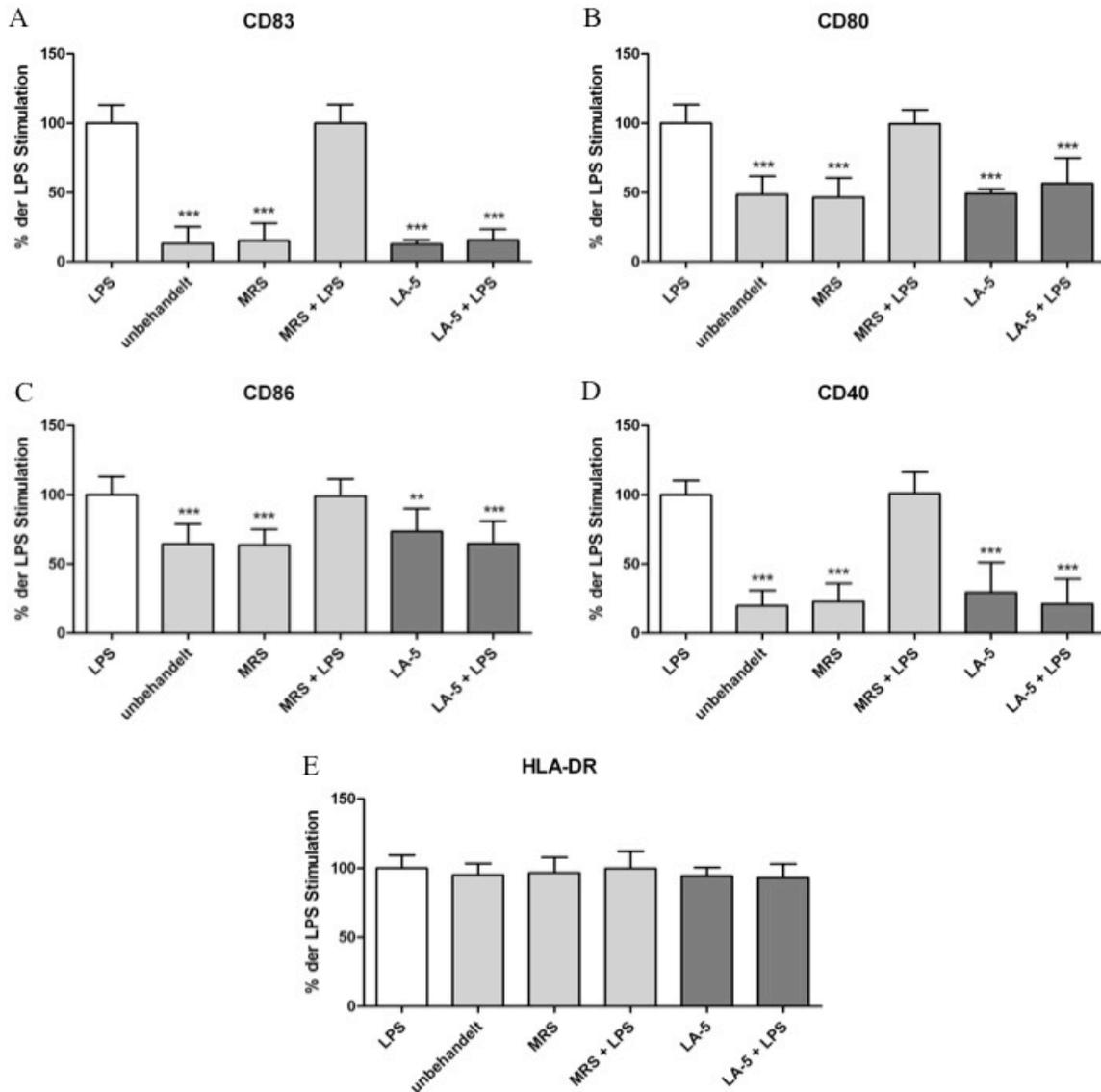


Abbildung 6-14: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl unreife als auch reife DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

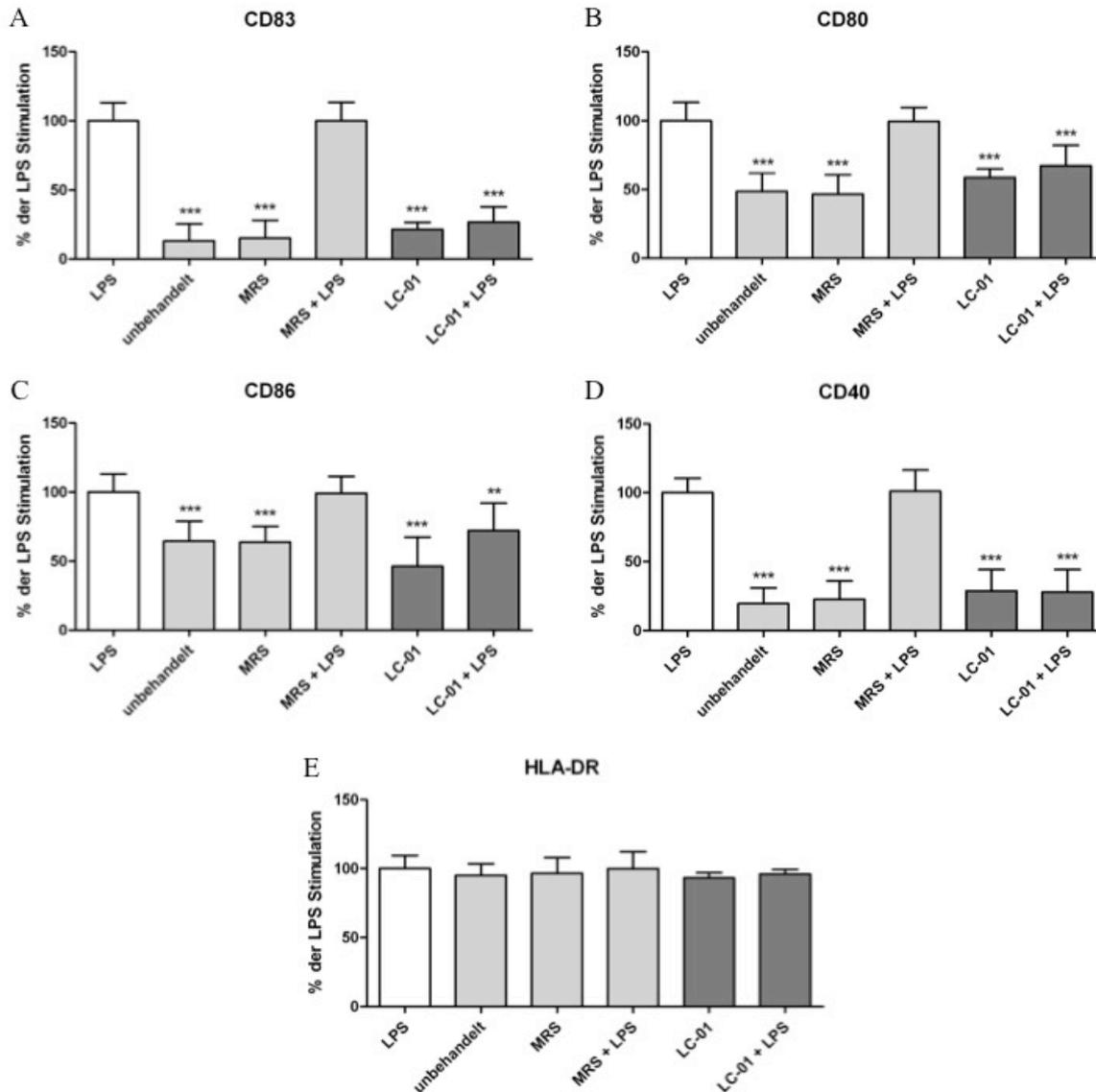


Abbildung 6-15: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus paracasei* LC-01.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

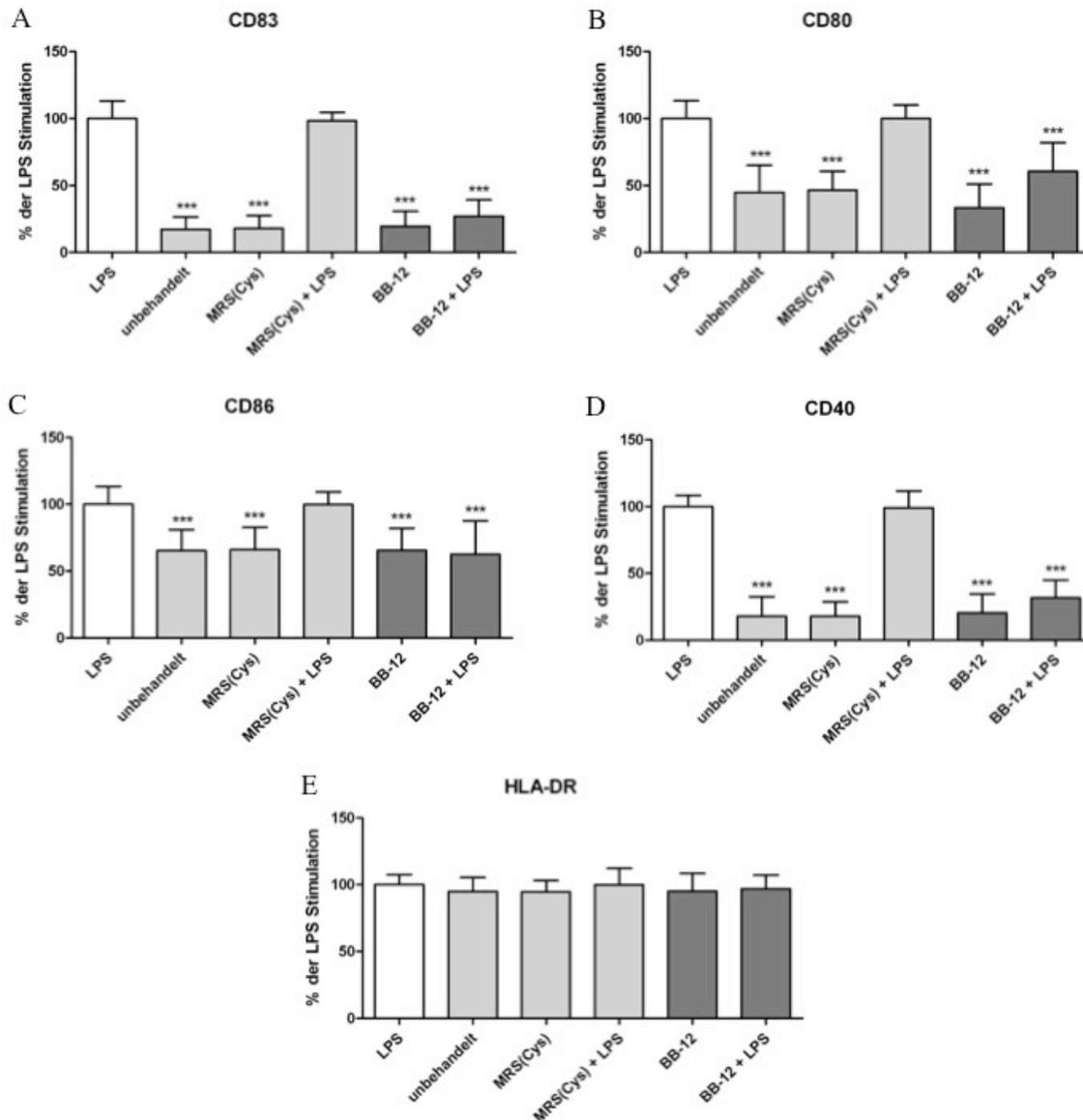


Abbildung 6-16: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS plus Cystein Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

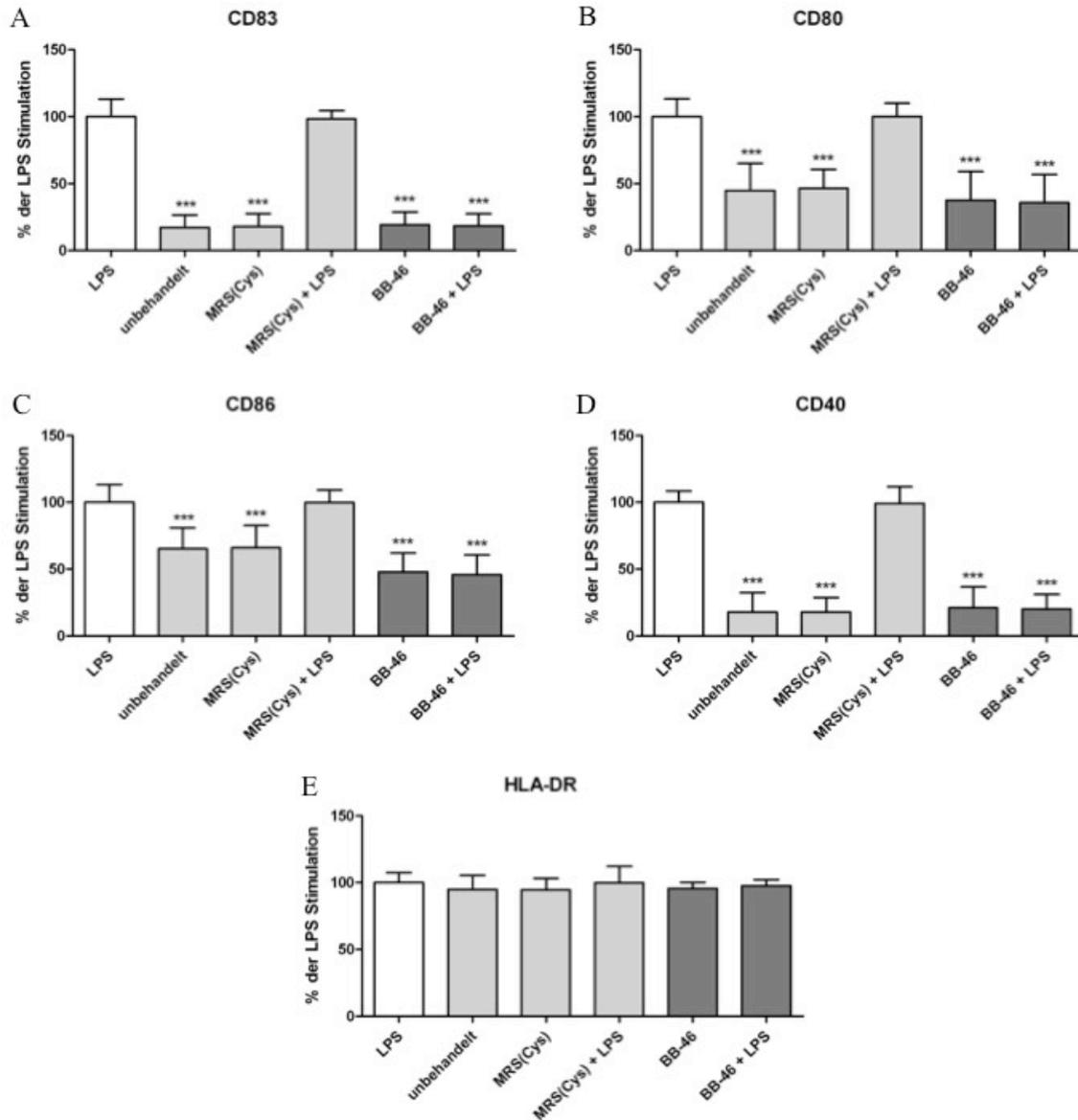


Abbildung 6-17: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium longum* BB-46.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS plus Cystein Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

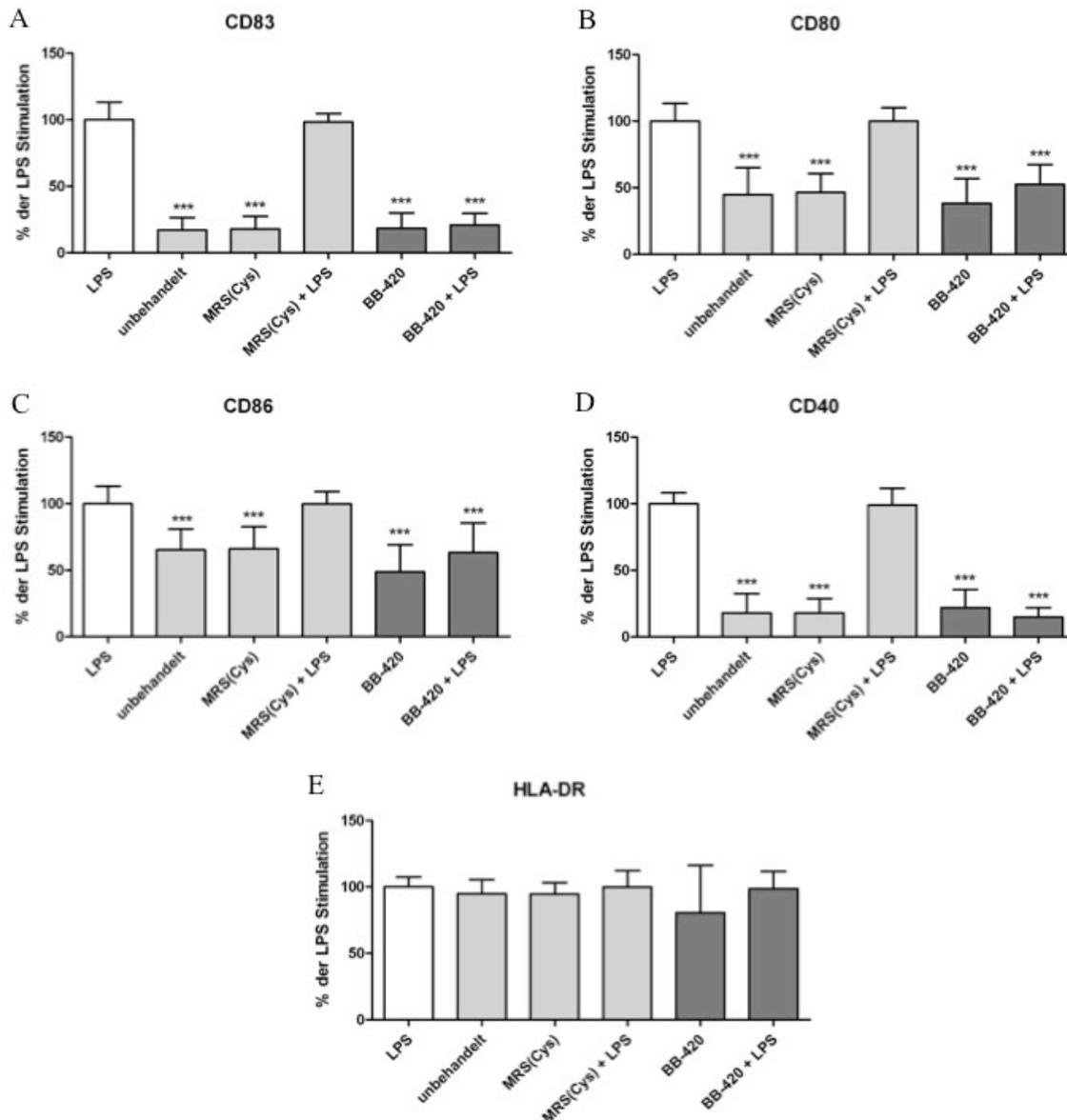


Abbildung 6-18: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium lactis* BB-420.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in MRS plus Cystein Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

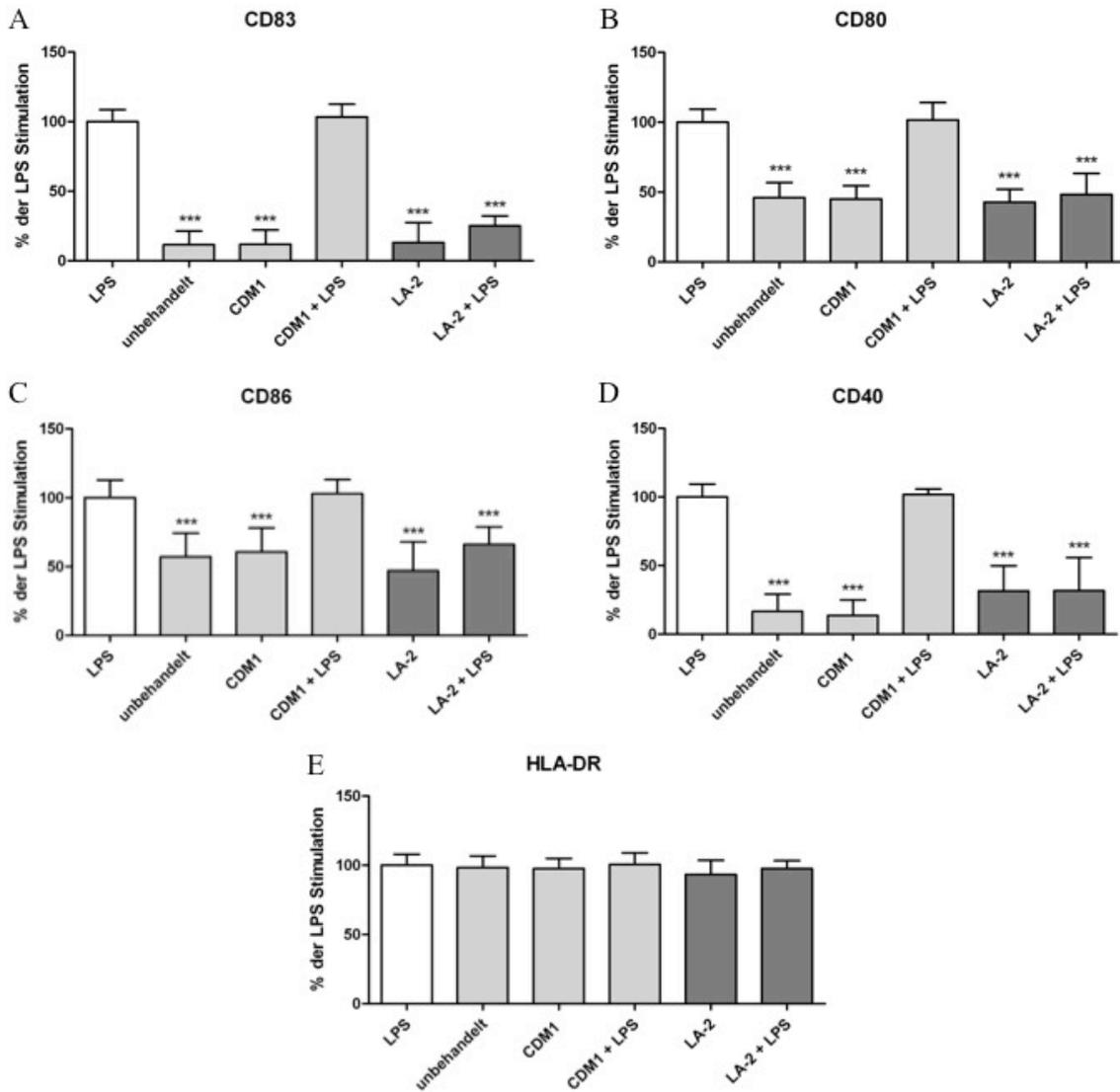


Abbildung 6-19: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-2.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

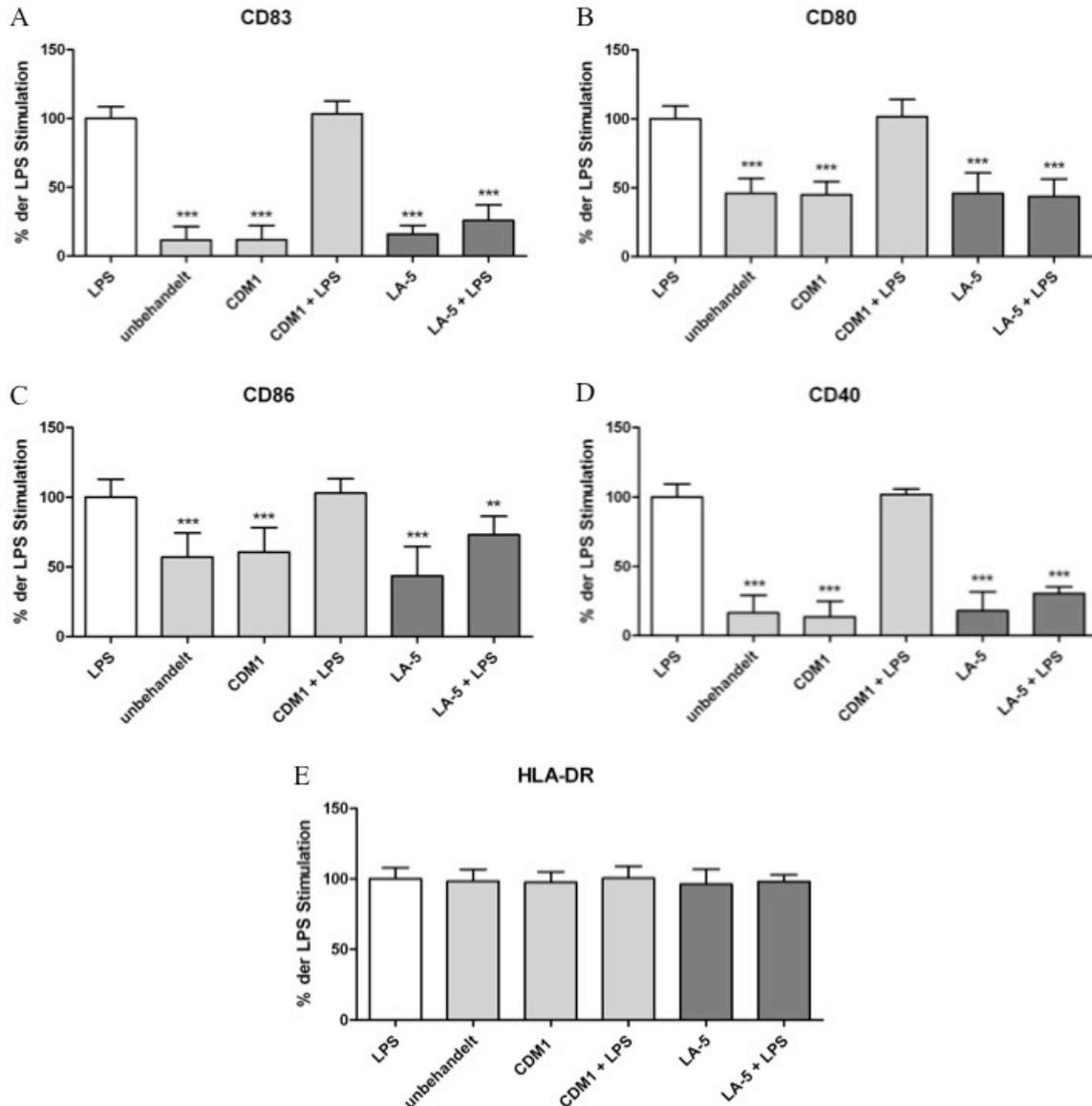


Abbildung 6-20: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

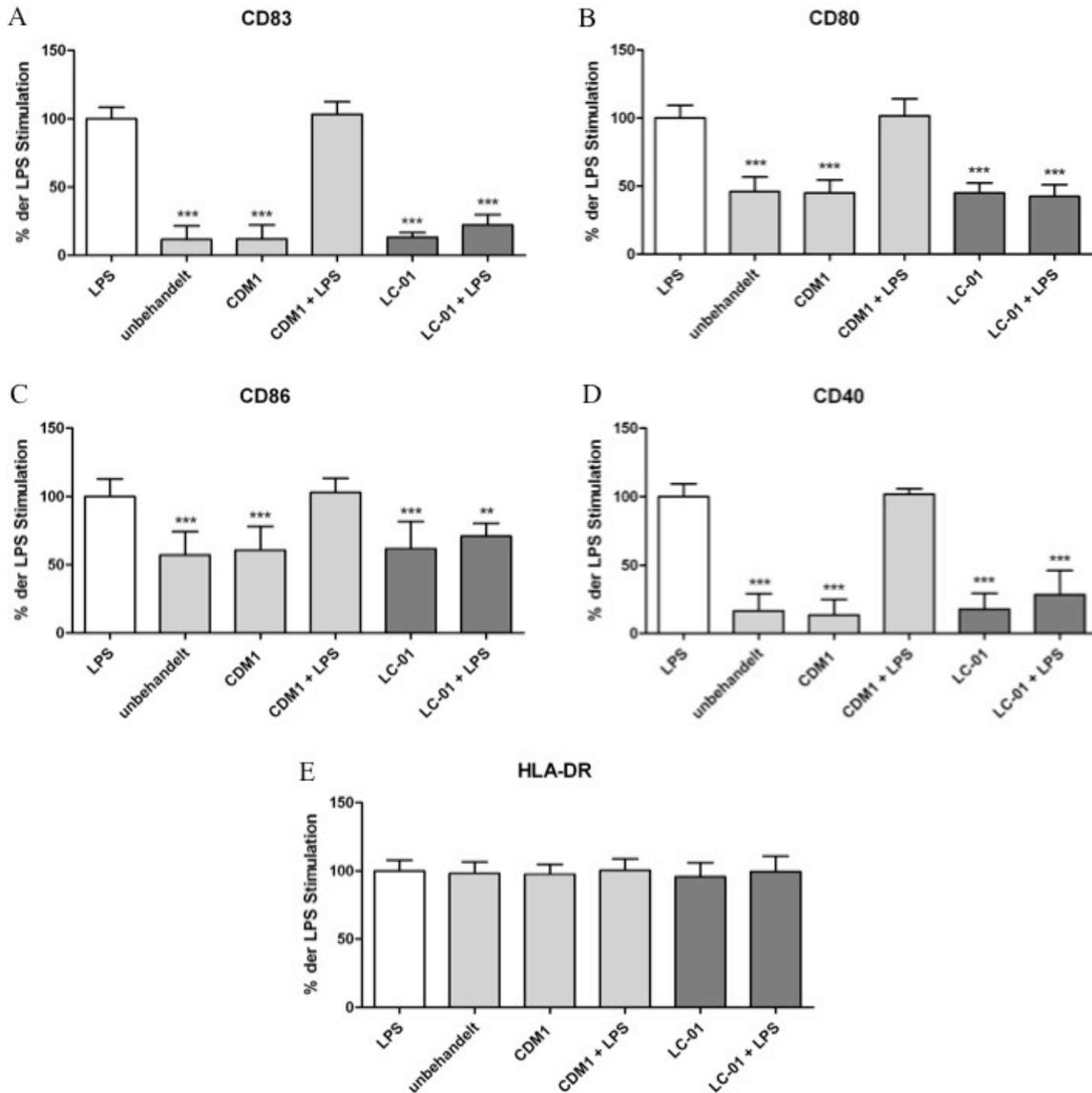


Abbildung 6-21: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus paracasei* LC-01.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

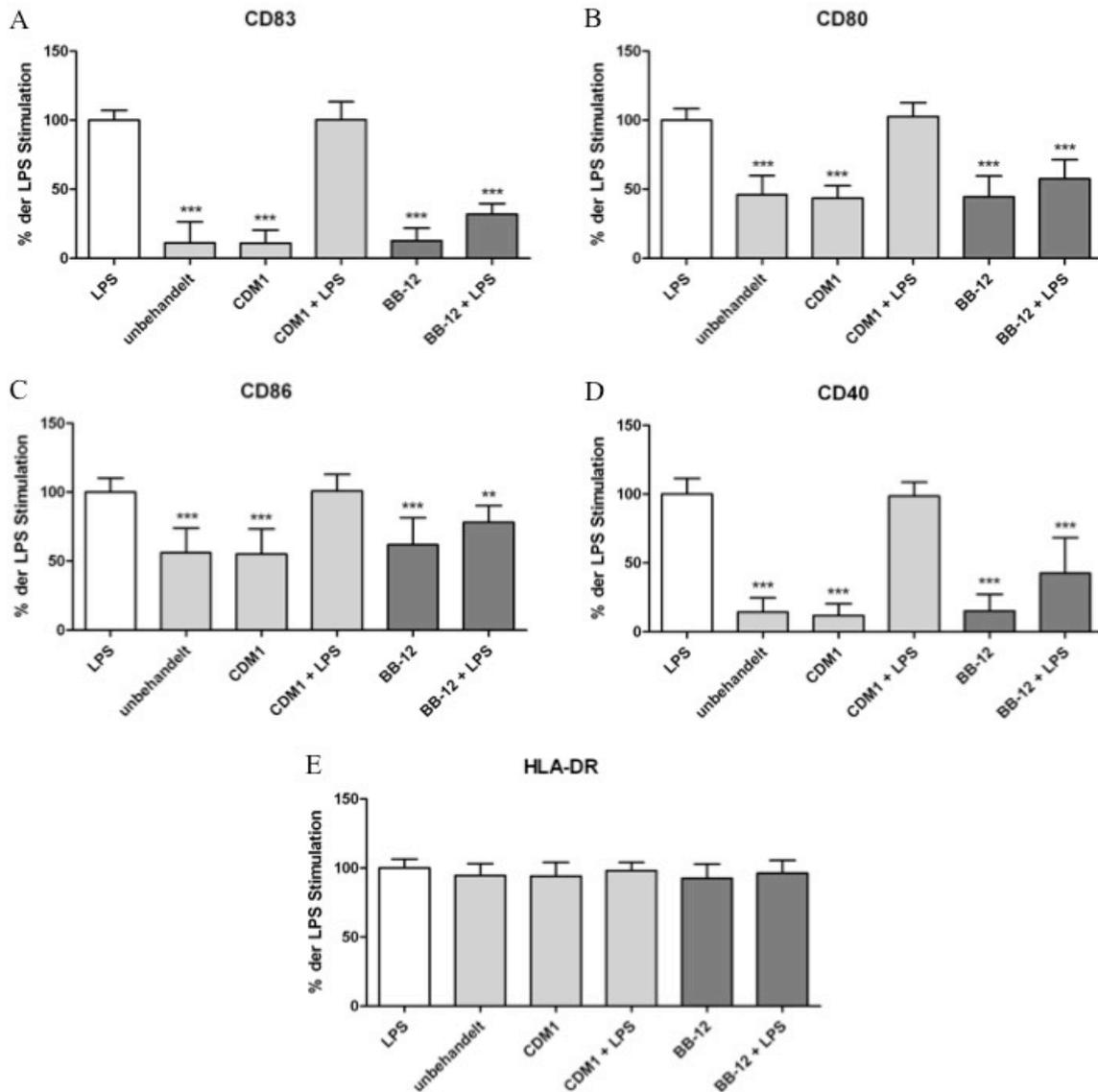


Abbildung 6-22: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

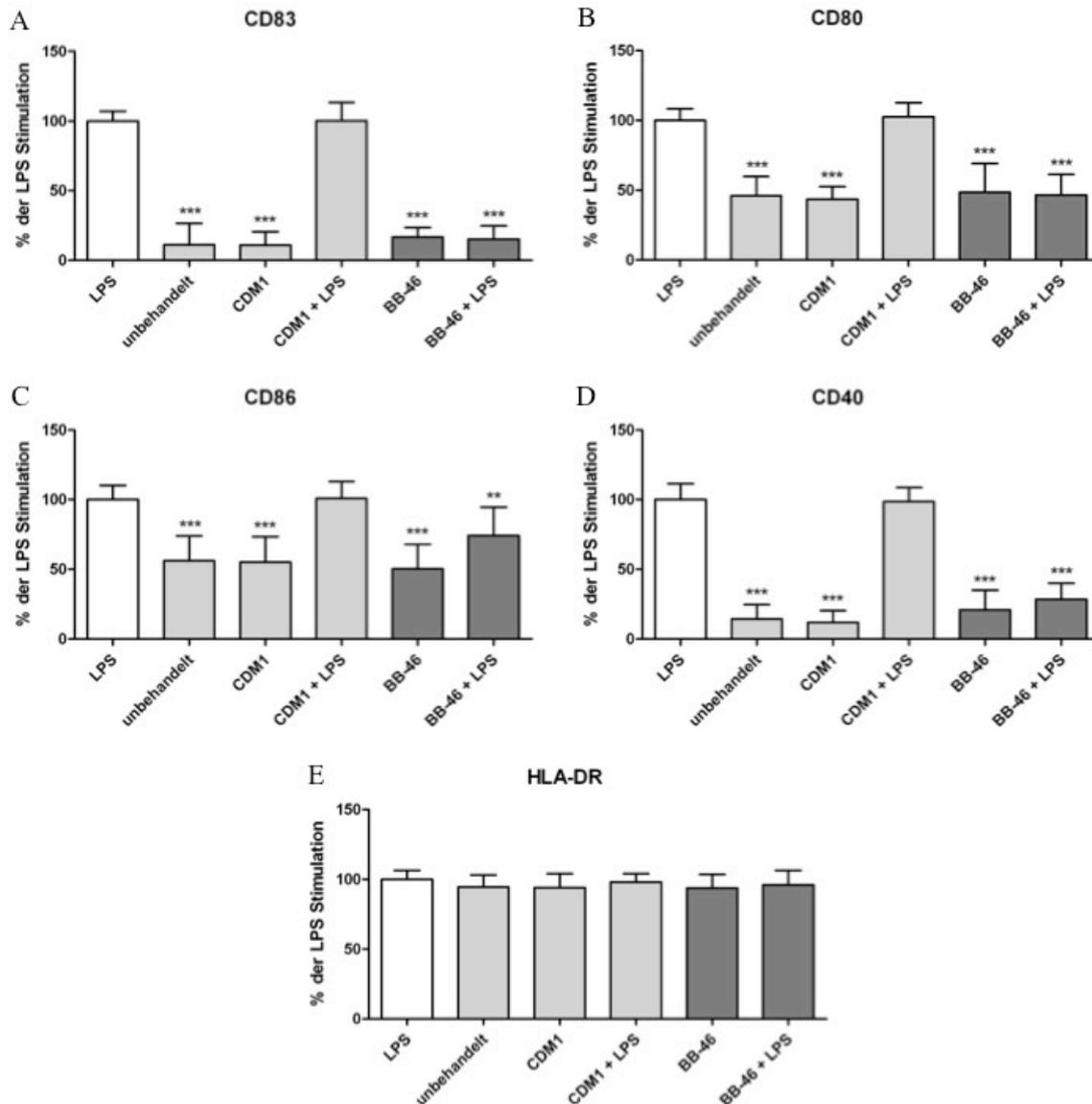


Abbildung 6-23: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium longum* BB-46.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

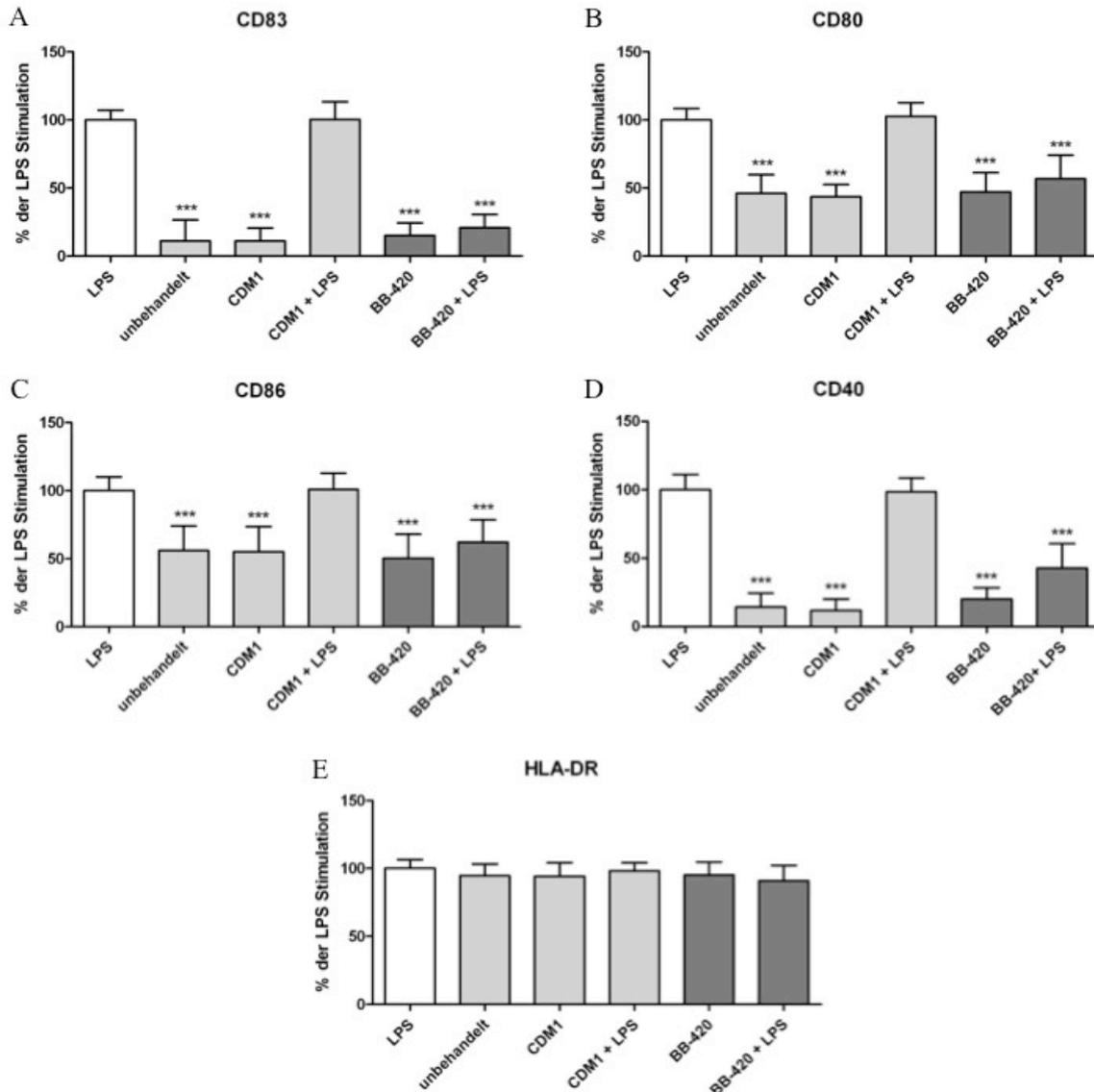


Abbildung 6-24: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium lactis* BB-420.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Expression der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR durchflußzytometrisch analysiert. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

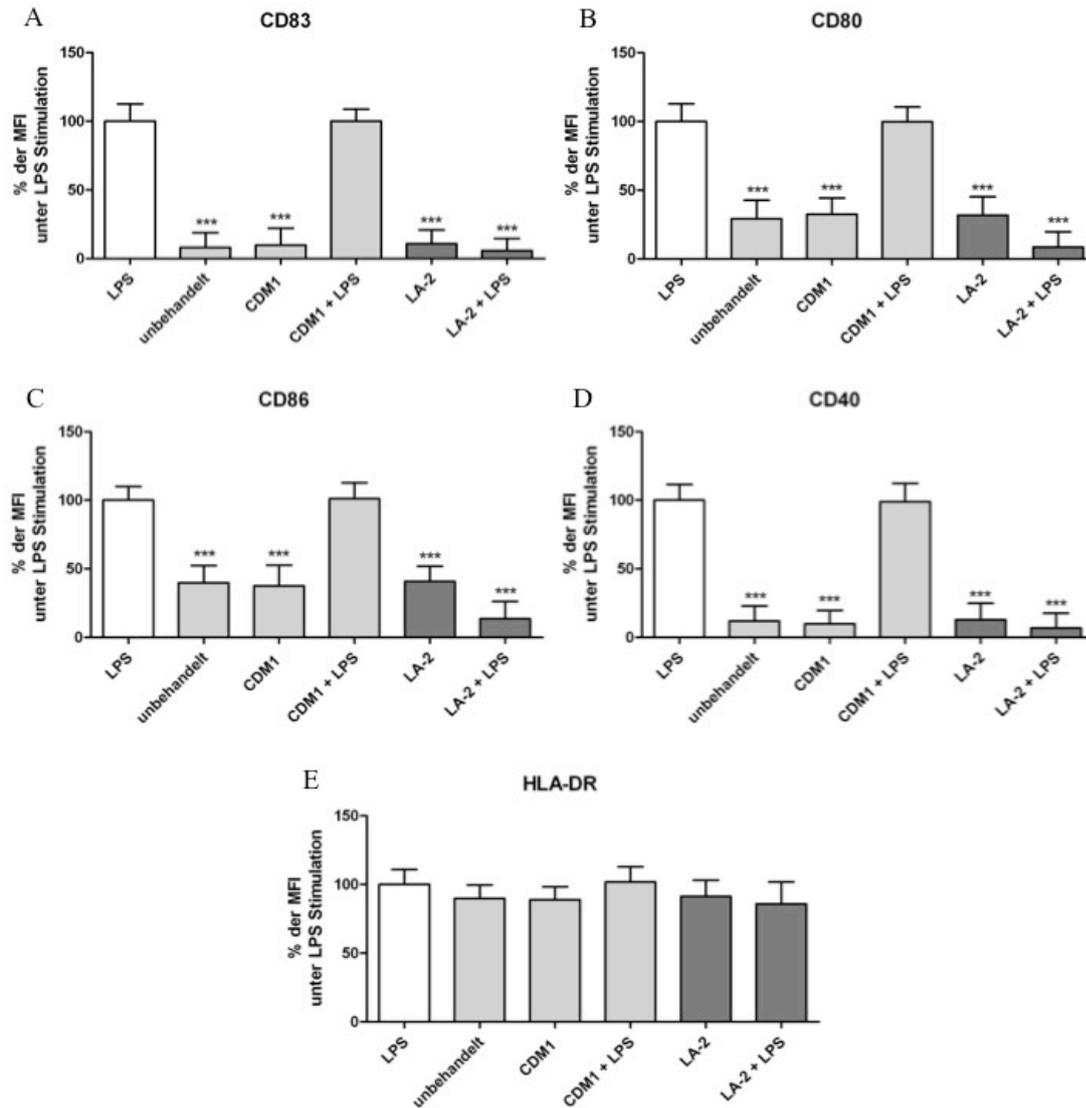


Abbildung 6-25: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-2.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

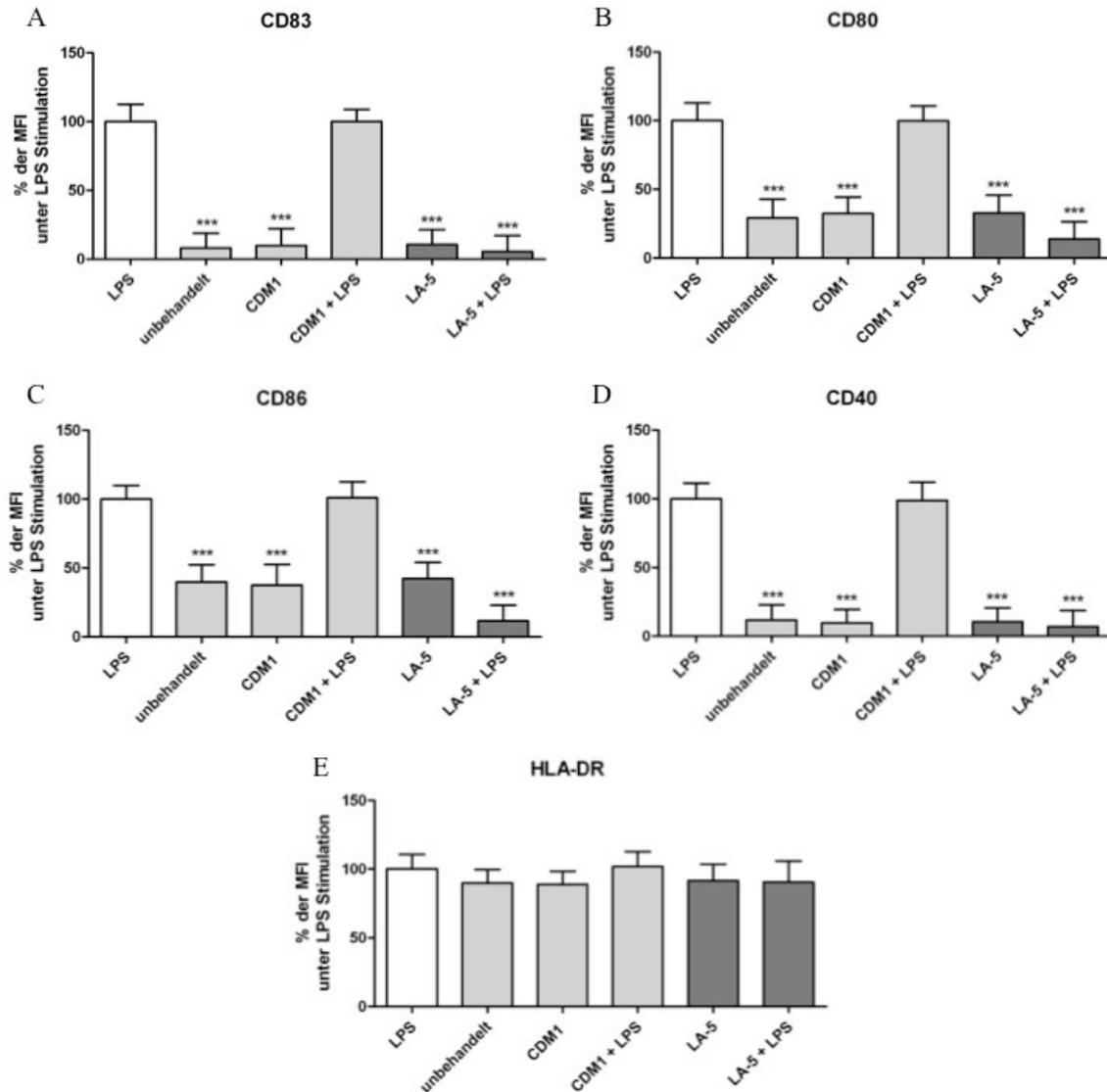


Abbildung 6-26: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

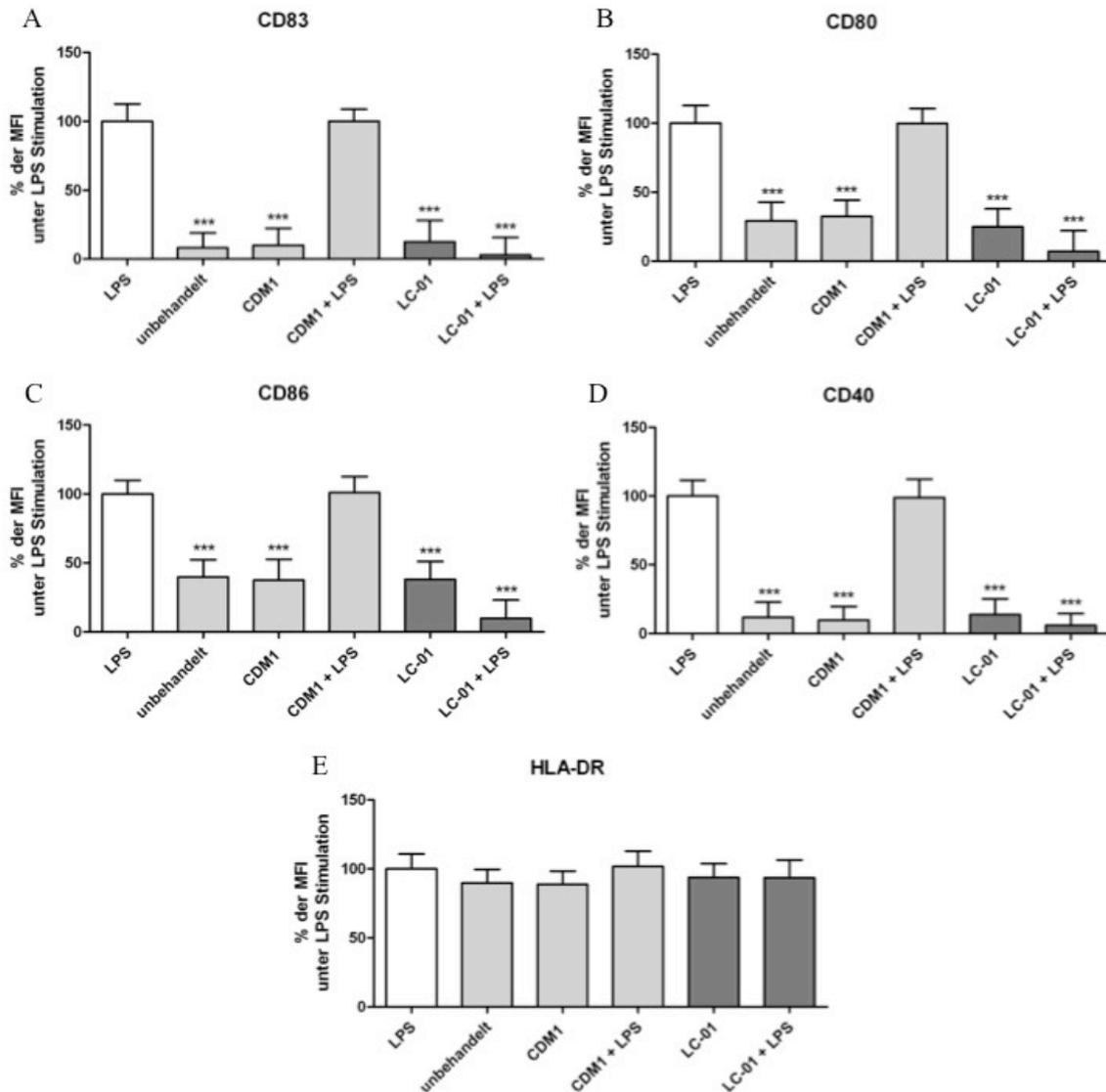


Abbildung 6-27: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Lactobacillus paracasei* LC-01.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

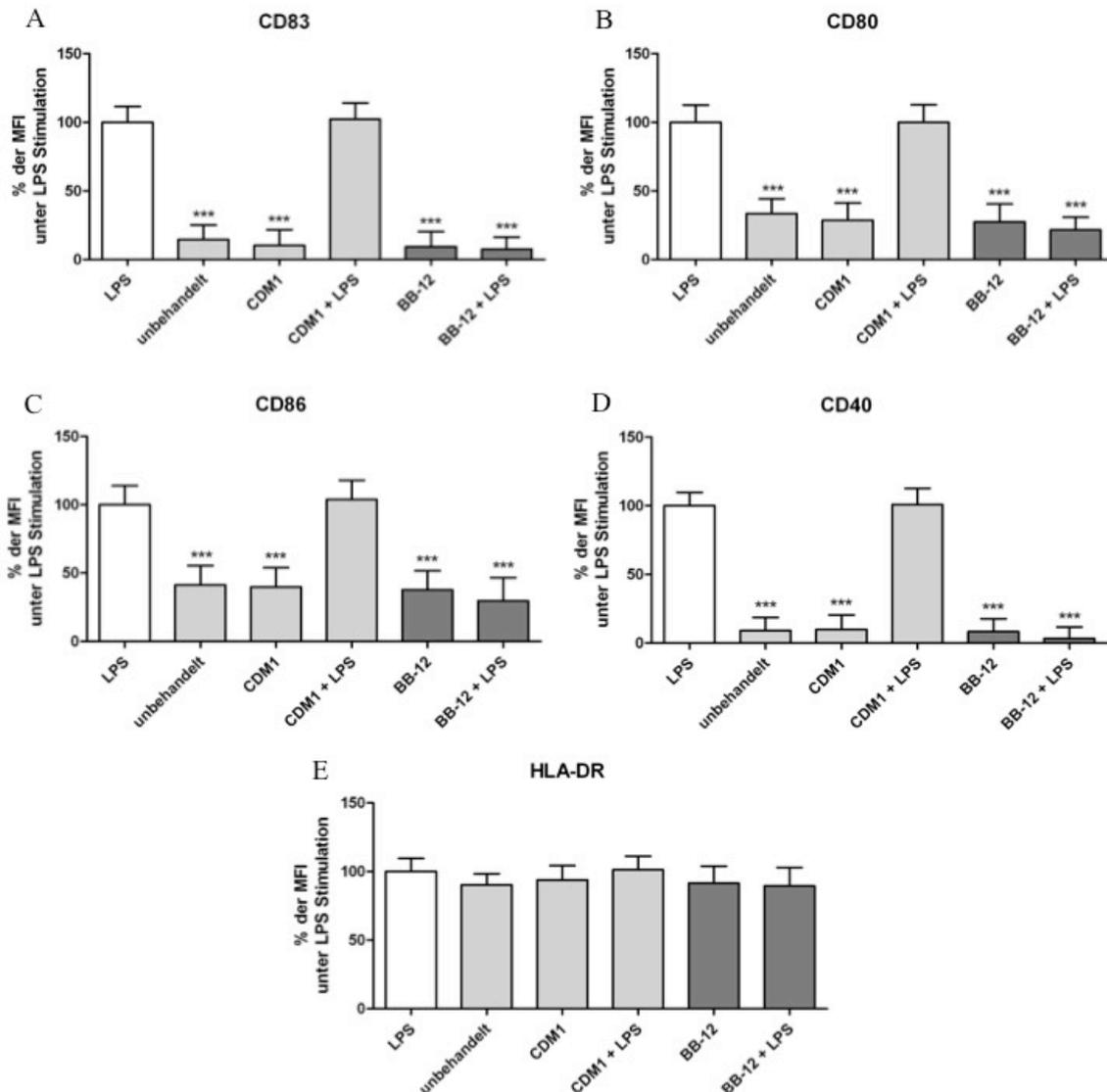


Abbildung 6-28: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium animalis* BB-12.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

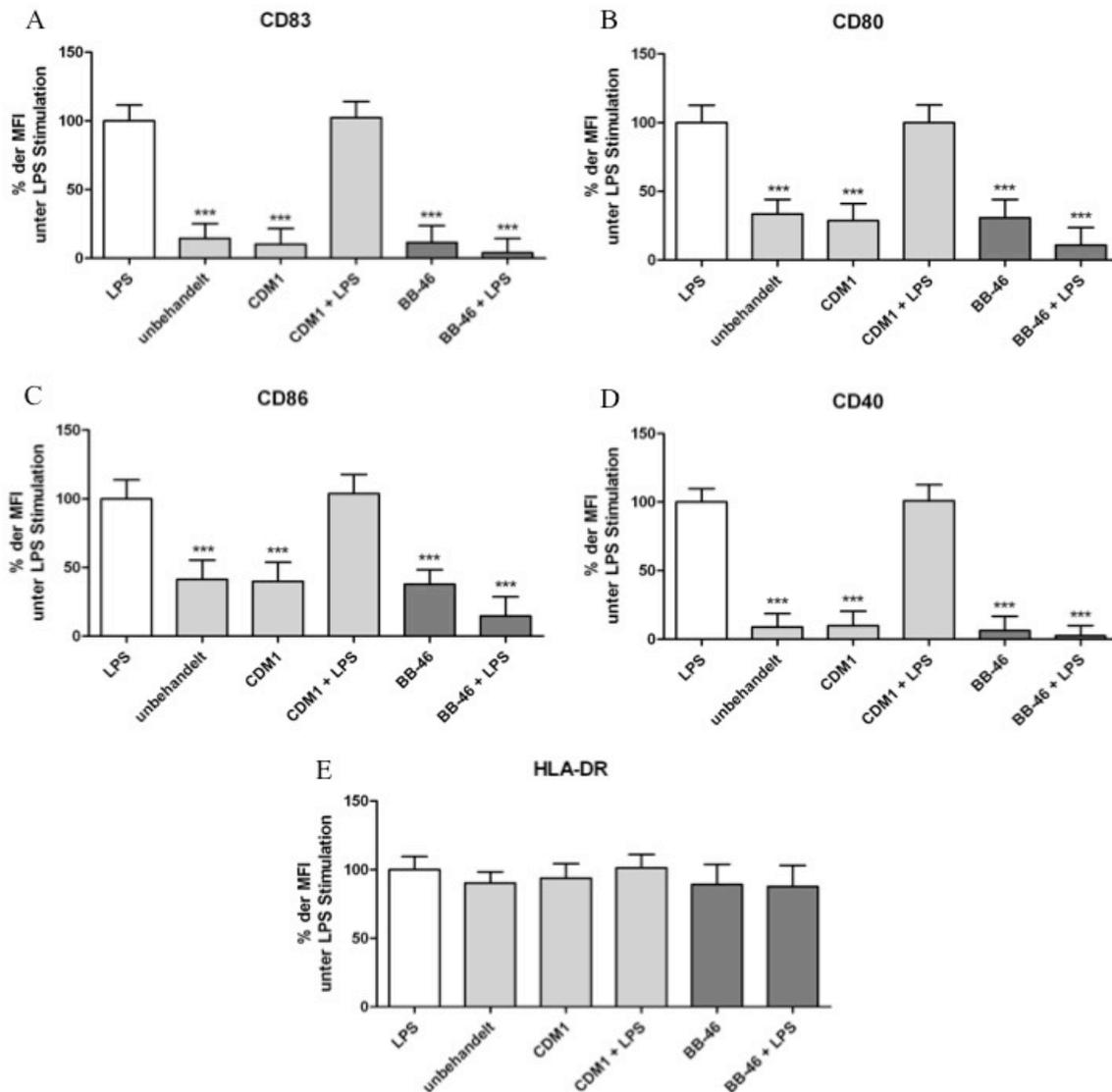


Abbildung 6-29: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium longum* BB-46.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienten als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

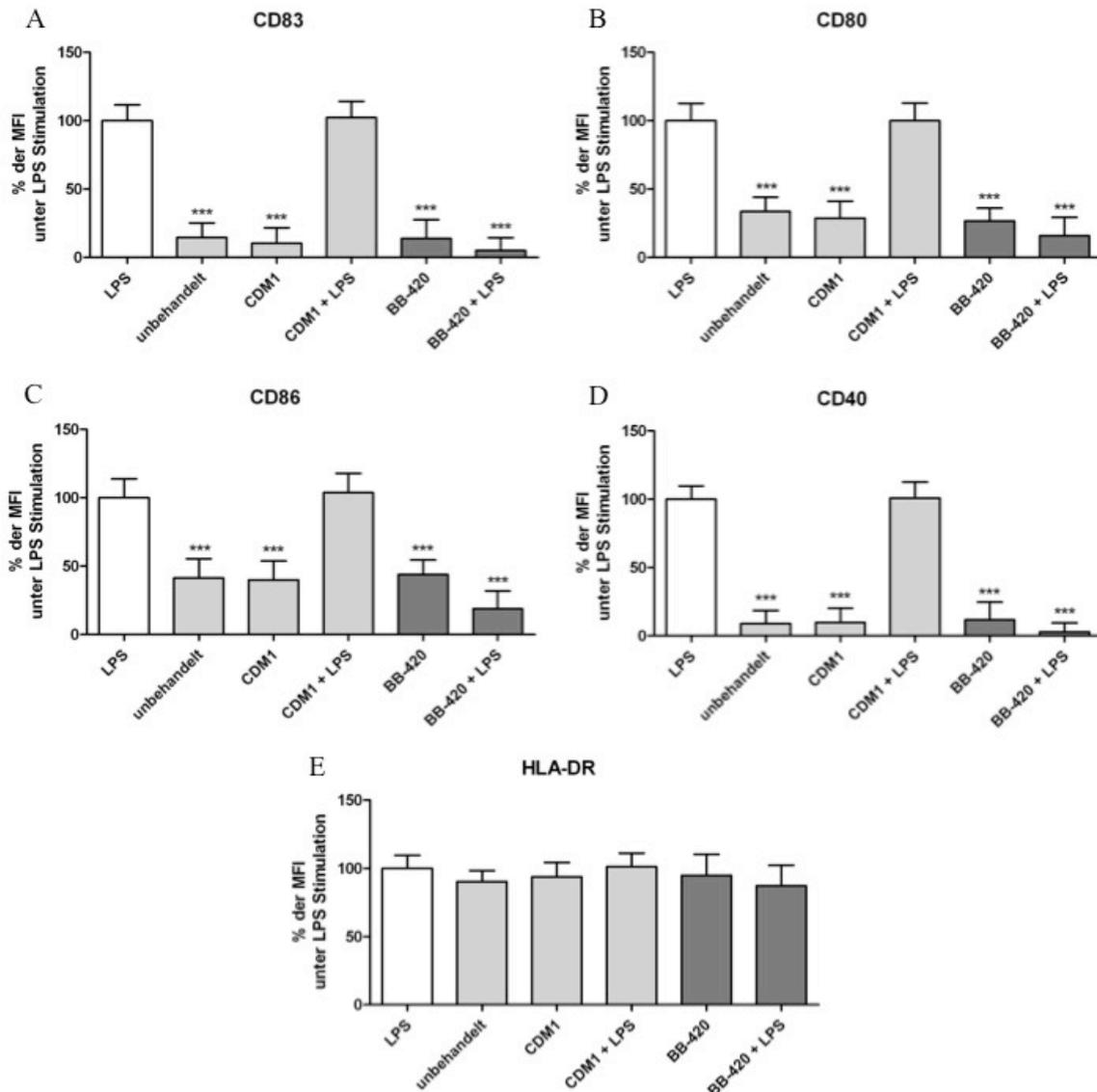


Abbildung 6-30: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von *Bifidobacterium lactis* BB-420.

Humane unreife DZ wurden in An- oder Abwesenheit von LPS mit 200 μ l Bakterienüberstand stimuliert. Die Bakterien wurden in CDM1 Medium angezogen und der probiotische Überstand wurde nach Erreichen der stationären Bakterienwachstumsphase gewonnen. Nach 24 h Stimulationsdauer wurden die DZ geerntet und die Dichte der Oberflächenmarker (A) CD83, (B) CD80, (C) CD86, (D) CD40 und (E) HLA-DR anhand der MFI durchflußzytometrisch ermittelt. Unbehandelte, unreife DZ dienen als Negativkontrolle für den Aktivierungsgrad, als Mediumkontrolle wurden sowohl immature als auch mature DZ nur mit dem Bakterienmedium behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten dar. Dunn's Multiple Comparison Test mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Signifikante Veränderung jeweils bezogen auf die LPS-Kontrolle.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ishizaka, K., T. Ishizaka, and M.M. Hornbrook, *Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody*. J Immunol, 1966. **97**(6): p. 840-53.
2. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M., *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 5.Auflage, 2002.
3. Johansson, C., et al., *Atopy patch test reactions to Malassezia allergens differentiate subgroups of atopic dermatitis patients*. Br J Dermatol, 2003. **148**(3): p. 479-88.
4. ISAAC, *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. The international Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. Lancet, 1998. **351**(9111): p. 1225-32.
5. Park, E.S., et al., *Preschool wheezing and prognosis at 10*. Arch Dis Child, 1986. **61**(7): p. 642-6.
6. Hess, J. and J.C. De Jongste, *Epidemiological aspects of paediatric asthma*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(5): p. 680-5.
7. Leyva-Castillo, J.M., et al., *TSLP Produced by Keratinocytes Promotes Allergen Sensitization through Skin and Thereby Triggers Atopic March in Mice*. J Invest Dermatol, 2012.
8. von Kobyletzki, L.B., et al., *Eczema in early childhood is strongly associated with the development of asthma and rhinitis in a prospective cohort*. BMC Dermatol, 2012. **12**(1): p. 11.
9. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 969-77; quiz 978.
10. Grammatikos, A.P., *The genetic and environmental basis of atopic diseases*. Ann Med, 2008. **40**(7): p. 482-95.
11. Maimaiti, G., A. Abduhaer, and P.R. Xu, *[Evaluation of efficacy and safety of loratadine in the treatment of childhood asthma]*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2011. **13**(11): p. 873-7.
12. Scott, M., et al., *Multifaceted allergen avoidance during infancy reduces asthma during childhood with the effect persisting until age 18 years*. Thorax, 2012.
13. Burke, H., et al., *Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis*. Pediatrics, 2012. **129**(4): p. 735-44.
14. Szajewska, H., *Early nutritional strategies for preventing allergic disease*. Isr Med Assoc J, 2012. **14**(1): p. 58-62.
15. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
16. Downs, S.H., et al., *Continued increase in the prevalence of asthma and atopy*. Arch Dis Child, 2001. **84**(1): p. 20-23.
17. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 911-20.
18. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
19. Shaheen, S.O., et al., *Measles and atopy in Guinea-Bissau*. Lancet, 1996. **347**(9018): p. 1792-6.
20. Matricardi, P.M., et al., *Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus*. BMJ, 1997. **314**(7086): p. 999-1003.
21. Shirakawa, T., et al., *The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science, 1997. **275**(5296): p. 77-9.

22. Obihara, C.C., et al., *Mycobacterium tuberculosis infection may protect against allergy in a tuberculosis endemic area*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(1): p. 70-6.
23. Yazdanbakhsh, M., A. van den Biggelaar, and R.M. Maizels, *Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease*. Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 372-7.
24. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. Science, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
25. Blaser, M.J., Y. Chen, and J. Reibman, *Does Helicobacter pylori protect against asthma and allergy?* Gut, 2008. **57**(5): p. 561-567.
26. Strachan, D.P., E.M. Taylor, and R.G. Carpenter, *Family structure, neonatal infection, and hay fever in adolescence*. Archives of Disease in Childhood, 1996. **74**(5): p. 422-426.
27. Ball, T.M., et al., *Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(8): p. 538-543.
28. Haby, M.M., et al., *Daycare attendance before the age of two protects against atopy in preschool age children*. Pediatr Pulmonol, 2000. **30**(5): p. 377-84.
29. Illi, S., et al., *Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study*. BMJ, 2001. **322**(7283): p. 390-5.
30. Alfven, T., et al., *Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study*. Allergy, 2006. **61**(4): p. 414-21.
31. Loss, G., et al., *The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(4): p. 766-773 e4.
32. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
33. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
34. Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C.L. Karp, *The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 69-75.
35. Borchers, A.T., et al., *Probiotics and immunity*. J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 26-46.
36. Zoetendal, E.G., E.E. Vaughan, and W.M. de Vos, *A microbial world within us*. Mol Microbiol, 2006. **59**(6): p. 1639-50.
37. Bengmark, S., *Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora*. Gut, 1998. **42**(1): p. 2-7.
38. Savage, D.C., *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol, 1977. **31**: p. 107-33.
39. Conway, P.L., *Development of intestinal microbiota*. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E., editors. Gastrointestinal Microbiology. New York, Chapman & Hall., 1996. **2**: p. 3-38.
40. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
41. Fanaro, S., et al., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatr Suppl, 2003. **91**(441): p. 48-55.
42. Penders, J., et al., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. 511-21.
43. Yoshioka, H., K. Iseki, and K. Fujita, *Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants*. Pediatrics, 1983. **72**(3): p. 317-21.
44. Orrhage, K. and C.E. Nord, *Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants*. Acta Paediatr Suppl, 1999. **88**(430): p. 47-57.

45. Bennet, R. and C.E. Nord, *Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants*. Infection, 1987. **15**(5): p. 332-6.
46. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
47. Kandler, O., Weiss, N., *Regular, non-sporing gram-positive rods*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, William & Wilkins Baltimore, 1986. **2**: p. 1208-1234.
48. Poupard, J.A., I. Husain, and R.F. Norris, *Biology of the bifidobacteria*. Bacteriol Rev, 1973. **37**(2): p. 136-65.
49. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
50. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
51. Ducluzeau, R., *[Development, equilibrium and role of microbial flora in the newborn]*. Ann Pediatr (Paris), 1993. **40**(1): p. 13-22.
52. Candela, M., et al., *Unbalance of intestinal microbiota in atopic children*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 95.
53. Vipperla, K. and S.J. O'Keefe, *The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk*. Nutr Clin Pract, 2012. **27**(5): p. 624-35.
54. Gigante, G., et al., *Role of gut microbiota in food tolerance and allergies*. Dig Dis, 2011. **29**(6): p. 540-9.
55. Kalliomaki, M. and E. Isolauri, *Role of intestinal flora in the development of allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2003. **3**(1): p. 15-20.
56. Bjorksten, B., et al., *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 516-20.
57. Kalliomaki, M., et al., *Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(1): p. 129-34.
58. Ouwehand, A.C., et al., *Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(1): p. 144-5.
59. Gore, C., et al., *Bifidobacterium pseudocatenulatum is associated with atopic eczema: a nested case-control study investigating the fecal microbiota of infants*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(1): p. 135-40.
60. Wang, M., et al., *Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(1): p. 129-34.
61. Penders, J., et al., *Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(12): p. 1602-8.
62. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
63. Hooper, L.V., *Bacterial contributions to mammalian gut development*. Trends Microbiol, 2004. **12**(3): p. 129-34.
64. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *A nutritive view on the host-pathogen interplay*. Trends Microbiol, 2005. **13**(8): p. 373-80.
65. Hill, M.J., *Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis*. Eur J Cancer Prev, 1997. **6 Suppl 1**: p. S43-5.
66. Gibson, G.R. and R.A. Rastall, *When we eat, which bacteria should we be feeding?* Asm News, 2004. **70**(5): p. 224-+.
67. Saavedra, J.M. and A. Tschernia, *Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications*. Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 2**: p. S241-6.

68. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annual Review of Nutrition, 2002. **22**: p. 283-307.
69. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-20.
70. van der Waaij, D., J.M. Berghuis-de Vries, and W. Lekkerkerk-van der, *Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice*. J Hyg (Lond), 1972. **70**(2): p. 335-42.
71. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 165-99.
72. Sperandio, V., et al., *Bacteria-host communication: the language of hormones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8951-6.
73. Hooper, L.V., et al., *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 269-73.
74. Gordon, J.I., T.S. Stappenbeck, and L.V. Hooper, *Response from Jeffrey I. Gordon et al.: Commensal bacteria make a difference*. Trends Microbiol, 2003. **11**(4): p. 150-1.
75. Hooper, L.V., et al., *A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9833-8.
76. Bry, L., et al., *A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1380-3.
77. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
78. Gewirtz, A.T. and J.L. Madara, *Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 288-90.
79. Brummel, T., et al., *Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12974-9.
80. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
81. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
82. Kelly, D., et al., *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 104-12.
83. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
84. Noverr, M.C. and G.B. Huffnagle, *Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?* Trends Microbiol, 2004. **12**(12): p. 562-8.
85. Sudo, N., et al., *The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1739-45.
86. Ishikawa, H., et al., *Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(1): p. 127-35.
87. Ostman, S., et al., *Impaired regulatory T cell function in germ-free mice*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2336-46.
88. Kelly, D., S. Conway, and R. Aminov, *Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 326-33.
89. Rook, G.A. and L.R. Brunet, *Microbes, immunoregulation, and the gut*. Gut, 2005. **54**(3): p. 317-20.
90. Mayer, L. and L. Shao, *Therapeutic potential of oral tolerance*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 407-19.

91. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 271-83.
92. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
93. Lanning, D.K., K.J. Rhee, and K.L. Knight, *Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire*. Trends Immunol, 2005. **26**(8): p. 419-25.
94. Ngoc, P.L., et al., *Cytokines, allergy, and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(2): p. 161-6.
95. van der Velden, V.H., et al., *Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(7): p. 997-1006.
96. Neaville, W.A., et al., *Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(4): p. 740-6.
97. Prescott, S.L., et al., *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children*. Lancet, 1999. **353**(9148): p. 196-200.
98. Prescott, S.L., et al., *The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age*. Allergy, 2003. **58**(11): p. 1187-94.
99. Stene, L.C. and P. Nafstad, *Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma*. Lancet, 2001. **357**(9256): p. 607-8.
100. Akbari, O., et al., *Role of regulatory T cells in allergy and asthma*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(6): p. 627-33.
101. Thunberg, S., et al., *Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(8): p. 1127-36.
102. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2006. **6**(6): p. 482-8.
103. Akdis, M., et al., *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1567-75.
104. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.
105. Smith, M., et al., *Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)/CD25(+)/CD127(lo/-) regulatory T cell function*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1460-6, 1466 e1-7.
106. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1679-88.
107. Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Nat Rev Immunol, 1999. **3**(12): p. 984-993.
108. O'Hagan, D.T. and N.M. Valiante, *Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(9): p. 727-735.
109. Niers, L., et al., *The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the Panda study)*. Allergy, 2009. **64**(9): p. 1349-58.
110. Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 361S-364S.
111. Metchnikoff, E., *The Prolongation of Life. Optimistic Studies*. William Heinemann, London, United Kingdom, 1907.

112. Lilly, D.M. and Stillwel.Rh, *Probiotics - Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms*. Science, 1965. **147**(3659): p. 747-&.
113. Parker, R.B., *Probiotics: the other half of the antibiotics story*. Anim. Nutr. Health, 1974. **29**: p. 4-8.
114. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 1989. **66**(5): p. 365-78.
115. Veld, J.H.J.H. and R. Havenaar, *Probiotics and Health in Man and Animal*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1991. **51**(4): p. 562-567.
116. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. Br J Nutr, 1998. **80 Suppl 1**: p. S147-71.
117. Salminen, S., et al., *Probiotics: how should they be defined?* Trends in Food Science & Technology, 1999. **10**(3): p. 107-110.
118. Isolauri, E., et al., *Role of probiotics in food hypersensitivity*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002. **2**(3): p. 263-71.
119. FAO/WHO, *Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria"*. Food and Agriculture Organization (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf), 2001.
120. van Santvoort, H.C., et al., *Probiotics in surgery*. Surgery, 2008. **143**(1): p. 1-7.
121. Klaenhammer, T.R., et al., *The impact of probiotics and prebiotics on the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(10): p. 728-34.
122. Foligne, B., et al., *Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(2): p. 236-43.
123. van Baarlen, P., et al., *Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2371-6.
124. van Baarlen, P., et al., *Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4562-9.
125. Teitelbaum, J.E. and W.A. Walker, *Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms*. Annual Review of Nutrition, 2002. **22**: p. 107-38.
126. Lodinova-Zadnikova, R., B. Cukrowska, and H. Tlaskalova-Hogenova, *Oral administration of probiotic Escherichia coli after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years)*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. **131**(3): p. 209-11.
127. Lodinova-Zadnikova, R. and U. Sonnenborn, *Effect of preventive administration of a nonpathogenic Escherichia coli strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants*. Biol Neonate, 1997. **71**(4): p. 224-32.
128. Lodinova-Zadnikova, R., et al., *The antibody response in infants after oral administration of inactivated and living E. coli vaccines and their protective effect against nosocomial infections*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371B**: p. 1431-8.
129. Lodinova-Zadnikova, R., H. Tlaskalova, and Z. Bartakova, *The antibody response in infants after colonization of the intestine with E. coli O83. Artificial colonization used as a prevention against nosocomial infections*. Adv Exp Med Biol, 1991. **310**: p. 329-35.
130. Liebrechts, T., et al., *Effect of E. coli Nissle 1917 on post-inflammatory visceral sensory function in a rat model*. Neurogastroenterol Motil, 2005. **17**(3): p. 410-4.
131. von Buenau, R., et al., *Escherichia coli strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea*. J Dairy Sci, 2005. **88**(1): p. 317-23.

132. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
133. Schultz, M., et al., *Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(2): p. 372-8.
134. Malago, J.J., et al., *Anti-inflammatory properties of heat shock protein 70 and butyrate on Salmonella-induced interleukin-8 secretion in enterocyte-like Caco-2 cells*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(1): p. 62-71.
135. Kanauchi, O., et al., *The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(8): p. 1047-53.
136. Araki, Y., et al., *Clostridium butyricum, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats*. Int J Mol Med, 2004. **13**(4): p. 577-80.
137. Seki, H., et al., *Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by Clostridium butyricum MIYAIRI*. Pediatr Int, 2003. **45**(1): p. 86-90.
138. Szajewska, H., Mrukowicz, J., *Meta-analysis: non-pathogenic yeast Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(5): p. 365-72.
139. Castagliuolo, I., et al., *Saccharomyces boulardii protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 302-7.
140. Castagliuolo, I., et al., *Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5225-32.
141. Vaughan, E.E., et al., *The intestinal LABs*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **82**(1-4): p. 341-52.
142. Picard, C., et al., *Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(6): p. 495-512.
143. Borriello, S.P., et al., *Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(6): p. 775-80.
144. Edelman, S., et al., *In vitro adhesion specificity of indigenous Lactobacilli within the avian intestinal tract*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(10): p. 5155-9.
145. Yuki, N., et al., *Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(11): p. 5030-4.
146. Henriksson, A. and P.L. Conway, *Adhesion to porcine squamous epithelium of saccharide and protein moieties of Lactobacillus fermentum strain 104-S*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(12): p. 2657-61.
147. Lorenz, A., et al., *A mechanism of association of lactobacilli with the rat stomach epithelium*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A, 1982. **252**(1): p. 9-16.
148. Fuller, R., P.A. Barrow, and B.E. Brooker, *Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs*. Appl Environ Microbiol, 1978. **35**(3): p. 582-91.
149. Fuller, R., *The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop*. Br Poult Sci, 1977. **18**(1): p. 85-94.
150. Fuller, R. and B.E. Brooker, *Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl*. Am J Clin Nutr, 1974. **27**(11): p. 1305-12.
151. Dunne, C., *Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(2): p. 136-45.

152. Konstantinov, S.R., Poznanski, E., Fuentes, S., Akkermans, A.D.L., Smidt, H., de Vos, W.M., *Lactobacillus sobrius* sp. nov., a novel isolate abundant in the intestine of weaning piglets. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005.
153. Montrose, D.C. and M.H. Floch, *Probiotics used in human studies*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2005. **39**(6): p. 469-484.
154. De Groot, M.A., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome*. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2005. **24**(3): p. 278-280.
155. Land, M.H., et al., *Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy*. *Pediatrics*, 2005. **115**(1): p. 178-81.
156. Salminen, M.K., et al., *Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG*. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(1): p. 62-9.
157. Salminen, M.K., et al., *Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland*. *Clin Infect Dis*, 2002. **35**(10): p. 1155-60.
158. Rautio, M., et al., *Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG*. *Clin Infect Dis*, 1999. **28**(5): p. 1159-60.
159. Schleifer, K.H., et al., *Transfer of Streptococcus-Lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus Gen-Nov*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985. **6**(2): p. 183-195.
160. Park, H.K., et al., *Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut*. *J Microbiol*, 2005. **43**(4): p. 345-53.
161. Ross, R.P., et al., *Developing applications for lactococcal bacteriocins*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999. **76**(1-4): p. 337-46.
162. Kleerebezem, M., *Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis*. *Peptides*, 2004. **25**(9): p. 1405-14.
163. de Vos, W.M. and J. Hugenholtz, *Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria*. *Trends Biotechnol*, 2004. **22**(2): p. 72-9.
164. Vandenbroucke, K., et al., *Active delivery of trefoil factors by genetically modified Lactococcus lactis prevents and heals acute colitis in mice*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(2): p. 502-13.
165. Steidler, L., *In situ delivery of cytokines by genetically engineered Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002. **82**(1-4): p. 323-31.
166. Schotte, L., et al., *Secretion of biologically active murine interleukin-10 by Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol*, 2000. **27**(10): p. 761-765.
167. Steidler, L., et al., *Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10*. *Science*, 2000. **289**(5483): p. 1352-5.
168. Kalliomaki, M., et al., *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2001. **357**(9262): p. 1076-9.
169. Kalliomaki, M., et al., *Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2003. **361**(9372): p. 1869-71.
170. Kopp, M.V., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation*. *Pediatrics*, 2008. **121**(4): p. e850-6.
171. Wickens, K., et al., *A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **122**(4): p. 788-94.
172. Taylor, A.L., J.A. Dunstan, and S.L. Prescott, *Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of*

- allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(1): p. 184-91.
173. Kukkonen, K., et al., *Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(1): p. 192-8.
174. Abrahamsson, T.R., et al., *Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1174-80.
175. Yan, F., et al., *Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism.* J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2242-53.
176. van den Berg, A., L. Visser, and S. Poppema, *High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma.* Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1685-91.
177. Buglio, D., et al., *Vorinostat inhibits STAT6-mediated TH2 cytokine and TARC production and induces cell death in Hodgkin lymphoma cell lines.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1424-33.
178. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
179. Ferrante, A. and Y.H. Thong, *Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method.* J Immunol Methods, 1980. **36**(2): p. 109-17.
180. Bennett, W.E. and Z.A. Cohn, *The isolation and selected properties of blood monocytes.* J Exp Med, 1966. **123**(1): p. 145-60.
181. Okada, M., et al., *Structure of the Bacillus subtilis quorum-sensing peptide pheromone ComX.* Nat Chem Biol, 2005. **1**(1): p. 23-4.
182. Lazazzera, B.A., et al., *An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in Bacillus subtilis.* J Bacteriol, 1999. **181**(17): p. 5193-200.
183. Mitsuma, T., et al., *Enhancement of gene expression by a peptide p(CHWPR) produced by Bifidobacterium lactis BB-12.* Microbiol Immunol, 2008. **52**(3): p. 144-55.
184. Stoeger, T., et al., *Deducing in vivo toxicity of combustion-derived nanoparticles from a cell-free oxidative potency assay and metabolic activation of organic compounds.* Environ Health Perspect, 2009. **117**(1): p. 54-60.
185. Borthakur, A., et al., *The probiotic Lactobacillus plantarum counteracts TNF- α -induced downregulation of SMCT1 expression and function.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(4): p. G928-34.
186. Heuvelin, E., et al., *A Bifidobacterium probiotic strain and its soluble factors alleviate chloride secretion by human intestinal epithelial cells.* J Nutr, 2010. **140**(1): p. 7-11.
187. Mileti, E., et al., *Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy.* PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7056.
188. Kwon, H.K., et al., *Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2159-64.
189. Fanning, S., et al., *Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(6): p. 2108-13.

190. Pfefferle, P.I., S.L. Prescott, and M. Kopp, *Microbial influence on tolerance and opportunities for intervention with prebiotics/probiotics and bacterial lysates*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(6): p. 1453-63; quiz 1464.
191. Thomas, C.M., et al., *Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31951.
192. Ditu, L.M., et al., *Modulation of virulence and antibiotic susceptibility of enteropathogenic Escherichia coli strains by Enterococcus faecium probiotic strain culture fractions*. Anaerobe, 2011. **17**(6): p. 448-51.
193. Allam, J.P., et al., *In search for predictive factors for atopy in human cord blood*. Allergy, 2005. **60**(6): p. 743-50.
194. Kaplan, A.P., *Chemokines, chemokine receptors and allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**(4): p. 423-31.
195. Saeki, H. and K. Tamaki, *Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases*. J Dermatol Sci, 2006. **43**(2): p. 75-84.
196. Kakinuma, T., et al., *Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis*. Clin Exp Immunol, 2002. **127**(2): p. 270-3.
197. Peh, S.C., L.H. Kim, and S. Poppema, *TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(7): p. 925-9.
198. Imai, T., et al., *The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 15036-42.
199. Hnatkova, M., et al., *The biological environment of Hodgkin's lymphoma and the role of the chemokine CCL17/TARC*. Prague Med Rep, 2009. **110**(1): p. 35-41.
200. Imai, T., et al., *Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine*. Int Immunol, 1999. **11**(1): p. 81-8.
201. Yoneyama, H., et al., *Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1933-41.
202. Sugawara, N., et al., *TARC in allergic disease*. Allergy, 2002. **57**(2): p. 180-1.
203. Takeuchi, H., et al., *Changes in thymus- and activation-regulated chemokine (TARC) associated with allergen immunotherapy in patients with perennial allergic rhinitis*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2005. **15**(3): p. 172-6.
204. Kakinuma, T., et al., *Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(3): p. 535-41.
205. Hijnen, D., et al., *Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 334-40.
206. Fujisawa, T., et al., *Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(1): p. 139-46.
207. Horikawa, T., et al., *IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis*. Int Immunol, 2002. **14**(7): p. 767-73.

208. Kawasaki, S., et al., *Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2055-62.
209. Abrahamsson, T.R., et al., *A Th1/Th2-associated chemokine imbalance during infancy in children developing eczema, wheeze and sensitization*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(12): p. 1729-39.
210. Zuercher, A.W., et al., *Lactococcus lactis NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 485750.
211. Xiao, J.Z., et al., *Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(11): p. 1425-35.
212. Xiao, J.Z., et al., *Changes in plasma TARC levels during Japanese cedar pollen season and relationships with symptom development*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. **144**(2): p. 123-7.
213. Drexler, H.G., *Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines*. Leuk Lymphoma, 1993. **9**(1-2): p. 1-25.
214. Kamesaki, H., et al., *Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease*. Blood, 1986. **68**(1): p. 285-92.
215. Biniaminov, M. and B. Ramot, *Letter: Possible T-lymphocyte origin of Reed-Sternberg cells*. Lancet, 1974. **1**(7853): p. 368.
216. Garvin, A.J., et al., *Immunohistochemical demonstration of IgG in Reed-Sternberg and other cells in Hodgkin's disease*. J Exp Med, 1974. **139**(5): p. 1077-83.
217. Taylor, C.R., *An immunohistological study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease*. Eur J Cancer, 1976. **12**(1): p. 61-75.
218. Kaplan, H.S. and S. Gartner, *"Sternberg-reed" giant cells of Hodgkin's Disease: cultivation in vitro, heterotransplantation, and characterization as neoplastic macrophages*. International Journal of Cancer, 1977. **19**(4): p. 511-25.
219. Stein, H., et al., *Identification of Hodgkin and Sternberg-reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population*. International Journal of Cancer, 1982. **30**(4): p. 445-59.
220. Curran, R.C. and E.L. Jones, *Dendritic cells and B lymphocytes in Hodgkin's disease*. Lancet, 1977. **2**(8033): p. 349.
221. Delabie, J., et al., *The B7/BB1 antigen is expressed by Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and contributes to the stimulating capacity of Hodgkin's disease-derived cell lines*. Blood, 1993. **82**(9): p. 2845-52.
222. Tanijiri, T., et al., *Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+ cytotoxic T lymphocytes from CD4+ naive T cells*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 576-84.
223. Poppema, S., *Immunology of Hodgkin's disease*. Baillieres Clin Haematol, 1996. **9**(3): p. 447-57.
224. Poppema, S., *Large-cell anaplastic lymphoma-specific translocation in Hodgkin's disease*. Lancet, 1995. **8**(345): p. 919.
225. Coombes, J.L. and F. Powrie, *Dendritic cells in intestinal immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 435-46.
226. Akbari, O. and D.T. Umetsu, *Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(6): p. 533-8.
227. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.

228. Romani, N., et al., *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability.* J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 137-51.
229. Zobywalski, A., et al., *Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70.* J Transl Med, 2007. **5**: p. 18.
230. Thurner, B., et al., *Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application.* J Immunol Methods, 1999. **223**(1): p. 1-15.
231. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes.* J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1525-34.
232. Meyer-Wentrup, F. and S. Burdach, *Efficacy of dendritic cell generation for clinical use: recovery and purity of monocytes and mature dendritic cells after immunomagnetic sorting or adherence selection of CD14+ starting populations.* J Hematother Stem Cell Res, 2003. **12**(3): p. 289-99.
233. de Almeida, M.C., et al., *A simple method for human peripheral blood monocyte isolation.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. **95**(2): p. 221-3.
234. Delcenserie, V., et al., *Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract.* Curr Issues Mol Biol, 2008. **10**(1-2): p. 37-54.
235. They, C. and S. Amigorena, *The cell biology of antigen presentation in dendritic cells.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 45-51.
236. Ueno, H., et al., *Harnessing human dendritic cell subsets for medicine.* Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 199-212.
237. Douillard, P., et al., *Mouse lymphoid tissue contains distinct subsets of langerin/CD207 dendritic cells, only one of which represents epidermal-derived Langerhans cells.* J Invest Dermatol, 2005. **125**(5): p. 983-94.
238. Christensen, H.R., H. Frokiaer, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells.* J Immunol, 2002. **168**(1): p. 171-8.
239. Drakes, M., T. Blanchard, and S. Czinn, *Bacterial probiotic modulation of dendritic cells.* Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3299-309.
240. Latvala, S., et al., *Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(36): p. 5570-83; discussion 5581-2.
241. Gillet-Hladky, S., et al., *Induction of high expression of CCR7 and high production of IL-12 in human monocyte-derived dendritic cells by a new bacterial component: LCOS 1013.* Int Immunopharmacol, 2008. **8**(9): p. 1151-63.
242. Thomas, S., et al., *Saccharomyces boulardii inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation.* Clin Exp Immunol, 2009. **156**(1): p. 78-87.
243. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria.* Gut, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
244. Dunlop, D.S., et al., *The presence of free D-aspartic acid in rodents and man.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141**(1): p. 27-32.
245. Hashimoto, A., et al., *Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex.* J Neurochem, 1993. **61**(1): p. 348-51.
246. Visser, W.F., et al., *A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids.* J Chromatogr A, 2011. **1218**(40): p. 7130-6.
247. Cava, F., et al., *Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids.* EMBO J, 2011. **30**(16): p. 3442-53.

248. Lam, H., et al., *D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria*. Science, 2009. **325**(5947): p. 1552-5.
249. Yanofsky, C., *RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria*. RNA, 2007. **13**(8): p. 1141-54.
250. Kolodkin-Gal, I., et al., *D-amino acids trigger biofilm disassembly*. Science, 2010. **328**(5978): p. 627-9.
251. Human-Microbiome-Project-C, *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012. **486**(7402): p. 207-214.
252. Friedman, M., *Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids*. Chem Biodivers, 2010. **7**(6): p. 1491-530.
253. Ritchie, A.J., et al., *The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1648-55.
254. Hooi, D.S., et al., *Differential immune modulatory activity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6463-70.
255. Chhabra, S.R., et al., *Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators*. J Med Chem, 2003. **46**(1): p. 97-104.
256. Ritchie, A.J., et al., *Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4421-31.
257. Smith, R.S., et al., *The Pseudomonas autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2636-42.
258. Smith, R.S., et al., *IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the Pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 366-74.
259. Telford, G., et al., *The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity*. Infection and Immunity, 1998. **66**(1): p. 36-42.
260. Altieri, C., A. Bevilacqua, and M. Sinigaglia, *Prolonging the viability of Lactobacillus plantarum through the addition of prebiotics into the medium*. J Food Sci, 2011. **76**(6): p. M336-45.
261. Niers, L.E., et al., *Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(11): p. 1481-9.
262. Vissers, Y.M., Snel, J., Zuurendonk, P.F., Kleerebezem, M., Wichers, H.J., Savelkoul, H.F., *Lactobacillus strains differentially modulate cytokine production by hPBMC from pollen-allergic patients*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. **61**(1): p. 28-40.
263. Bermudez-Brito, M., et al., *Human Intestinal Dendritic Cells Decrease Cytokine Release against Salmonella Infection in the Presence of Lactobacillus paracasei upon TLR Activation*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43197.
264. Yeganegi, M., et al., *Effect of Lactobacillus rhamnosus GR-1 supernatant and fetal sex on lipopolysaccharide-induced cytokine and prostaglandin-regulating enzymes in human placental trophoblast cells: implications for treatment of bacterial vaginosis and prevention of preterm labor*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(5): p. 532 e1-8.
265. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.

266. Irukayama-Tomobe, Y., et al., *Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3930-4.
267. Wise, A., et al., *Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9869-74.
268. Soga, T., et al., *Molecular identification of nicotinic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 364-9.
269. Hatanaka, T., et al., *Transport of D-serine via the amino acid transporter ATB(0,+) expressed in the colon*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(2): p. 291-5.
270. Su, A.I., et al., *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6062-7.
271. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 309-34.
272. Nguyen, N.T., et al., *Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 19961-6.
273. Quintana, F.J., et al., *An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(48): p. 20768-73.
274. Platzer, B., et al., *Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 66-74.
275. Stockinger, B., *Beyond toxicity: aryl hydrocarbon receptor-mediated functions in the immune system*. J Biol, 2009. **8**(7): p. 61.
276. Ma, Q., *Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles*. Curr Drug Metab, 2001. **2**(2): p. 149-64.
277. Whitlock, J.P., Jr., *Induction of cytochrome P4501A1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 103-25.
278. Denison, M.S., et al., *Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor*. Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **152**(2): p. 406-14.
279. Schmidt, J.V. and C.A. Bradfield, *Ah receptor signaling pathways*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 55-89.
280. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 307-40.
281. Lawrence, B.P., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1158-65.
282. Ettmayer, P., et al., *A novel low molecular weight inhibitor of dendritic cells and B cells blocks allergic inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(6): p. 599-606.
283. Jeong, K.T., et al., *FICZ, a tryptophan photoproduct, suppresses pulmonary eosinophilia and Th2-type cytokine production in a mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma*. Int Immunopharmacol, 2012. **13**(4): p. 377-85.

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca	Calcium
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	engl.: cluster of differentiation
CDM	engl.: chemically defined medium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	engl.: colony forming unit
ComX	ComX Pheromon
CSF	engl.: competence and sporulation factor
CYP1A1	Cytochrom P450-1A1
Da	Dalton
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
eGFP	engl.: enhanced green fluorescence protein
Em	Emission
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting

FCS	engl: fetal calf serum
FeSO ₄	Eisensulfat
FI	engl.: fluorescence intensitiy
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FLR	engl.: Fluorescent Lamp Recyclers
FSC	engl.: forward scatter
FT-ICR	engl.: Fourier transform ion cyclotron resonance
g	Gramm
g	engl.: gravitation
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl.: green fluorescence protein
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	engl.: hour
HCl	Chlorwasserstoff
hi	hitzeinaktiviert
HLA	engl.: human Leukocyte Antigen
H ₂ O _{dem.}	einfach entionisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	entsalztes und filtriertes Wasser
HS	Humanserum
iDZ	immature dendritische Zelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LB Medium	Luria-Bertani Medium
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
m	Massenzahl
Max	Maximum

MFI	engl.: mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MnSO ₄	Mangansalz
MS	Massenspektrometrie
MRS Medium	von de Man, Rogosa und Sharpe entwickeltes Medium
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	engl.: nuclear factor-κB
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
OPA	ortho-Phthalaldehyd
p.a.	pro analysi
PBMZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline Lösung
PDA	engl.: photo diode array
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
PFP	Pentafluorphenyl
PG	Prostaglandin
pH	potentia Hydrogenii
P.I.	Propidiumjodid
PMN.	polymorphnukleärer Leukozyt

pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
ppm	engl.: parts per million
Qs	engl.: quorum sensing
rhu	engl.: recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: rounds per minute
RPMI Medium	am Roswell Park Memorial Institute entwickeltes Medium
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
S	Schwefel
SCFA	engl.; short chain fatty acid
SPE	engl.: solid phase extraction
T	Tyrosin
TGF	engl.: transformation growth factor
Th	T-Helfer-Zelle
TIC	engl.: total ion current
TLR	engl.: toll-like receptor
TNF	engl.: tumor-necrosis factor
TOF	engl.: time-of-flight
t _R	Retentionszeit
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
UPLC	engl.: ultra performance liquid chromatography
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w-o	engl.: without
z	Ladungszahl

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Mikroorganismen.....	29
Tabelle 2-2: Verwendete bakterielle Peptid-Signalmoleküle.....	30
Tabelle 2-3: Zur Generierung der DZ verwendete Zytokine.....	35
Tabelle 2-4: Zur Reifung der DZ eingesetztes LPS	36
Tabelle 2-5: Verwendete primäre Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse von DZ	36
Tabelle 2-6: Für Stimulationsversuche verwendete Aminosäuren mit eingesetzter Konzentration und Bezugsquelle.....	43
Tabelle 2-7: Auflistung der 3 Antikörper-Ansätze für die 4-Farben Färbung ausgewählter Oberflächenmoleküle der stimulierten DZ.....	47
Tabelle 2-8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe mit Anregungslaser, Absorptions- und Emmissionsmaximum	47
Tabelle 2-9: Auflistung der ausgewählten Oberflächenmarker mit Expression bei reifen und unreifen DZ zusammen mit der jeweiligen Funktion.....	48
Tabelle 2-10: Anregungslaser, Absorptions- und Emmissionsmaximum von 7-AAD.....	48
Tabelle 2-11: Verwendete Oligonukleotide mit Sequenz und Schmelztemperatur	50
Tabelle 2-12: Optimierte Reaktionsbedingungen für die real-time qPCR Versuch.....	52
Tabelle 2-13: Thermische Reaktionsbedingungen für die real-time qPCR Versuche	52
Tabelle 2-14: Signifikanzgrenzen der Student-t-Verteilung	53
Tabelle 2-15: Signifikanzgrenzen des Dunn´s Multiple Comparison Test	53
Tabelle 3-1: Übersicht über alle getesteten Stämme mit den zusammengefassten immunmodulatorischen Effekten.	85
Tabelle 3-2: Prozentsatz von Marker ⁺ - DZ nach Behandlung mit D-Aminosäuren	104

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Ökologie des sich entwickelnden Intestinums.	13
Abbildung 1-2: Mehrstufiger Überblick über mögliche bakterielle Interaktionen mit dem Wirt.....	15
Abbildung 1-3: Differenzierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen.	19
Abbildung 1-4: Konzept der praktischen Durchführung.....	28
Abbildung 2-1: Phasenkontrastaufnahmen von humanen Zellen.....	40
Abbildung 2-2: Repräsentative Punktwolkendarstellung von Zellpopulationen (x-Achse: FSC, y-Achse: SSC)	45
Abbildung 2-3: Repräsentative Punktwolkendarstellung des P2 Gates mit der DZ-Population (x-Achse: CD83, y-Achse: CD3).	46
Abbildung 3-1: CCL17-Quantifizierung in den Überständen unbehandelter humaner Hodgkin Lymphom Zellen.	55
Abbildung 3-2: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG.....	58
Abbildung 3-3: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021.	59
Abbildung 3-4: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Bakterienvollmedium MRS.	59
Abbildung 3-5: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG.....	60
Abbildung 3-6: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021.	61
Abbildung 3-7: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem definierten Bakterienmedium CDM1.	61
Abbildung 3-8: Vitalität der KM-H2 Zellen nach Behandlung mit probiotischen Überständen.	62
Abbildung 3-9: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	64
Abbildung 3-10: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM20021.	65

Abbildung 3-11: Punktwolken-Darstellung (Dotplot) der Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86 und CD40 durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	66
Abbildung 3-12: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	68
Abbildung 3-13: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021.	69
Abbildung 3-14: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	71
Abbildung 3-15: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD86 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021.	72
Abbildung 3-16: Vitalität von DZ nach Ko-Stimulation mit LPS und probiotischen Überständen.	73
Abbildung 3-17: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch LPS-gereifte DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter <i>Lactobacillus</i> spp.	75
Abbildung 3-18: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch LPS-gereifte DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter <i>Bifidobacterium</i> spp.	76
Abbildung 3-19: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter <i>Lactobacillus</i> spp.	78
Abbildung 3-20: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit den Überständen ausgewählter <i>Bifidobacterium</i> spp.	79
Abbildung 3-21: Vitalität der LPS-gereiften DZ nach Behandlung mit probiotischen Überständen.	80
Abbildung 3-22: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit <i>Lactobacillus</i> spp. Überständen von Winlove Bioindustries.	82
Abbildung 3-23: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit <i>Bifidobacterium</i> spp. Überständen von Winlove Bioindustries.	83
Abbildung 3-24: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactococcus</i> spp. und <i>Streptococcus</i> spp. Überständen von Winlove Bioindustries.	84

Abbildung 3-25: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Quorum sensing Peptiden CSF und ComX.....	87
Abbildung 3-26: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid CSF.	88
Abbildung 3-27: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid ComX.....	89
Abbildung 3-28: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid p(CHWPR).	90
Abbildung 3-29: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Quorum sensing Peptid p(CHWPR).....	91
Abbildung 3-30: Vitalität der KM-H2 Zellen nach Stimulation mit den Quorum sensing Molekülen CSF, ComX und p(CHWPR).	93
Abbildung 3-31: Strategie zur Identifizierung bioaktiver Verbindungen in ausgewählten Überständen probiotischer Bakterien.	94
Abbildung 3-32: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den MeOH-Fractionen ausgewählter immunaktiver Überstände.	96
Abbildung 3-33: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 20% MeOH-Fractionen von LGG, W56 und W102.	98
Abbildung 3-34: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 40% MeOH-Fractionen von LGG und W56.	99
Abbildung 3-35: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit den Subfraktionen der 50% MeOH-Fractionen von LGG und W56.	100
Abbildung 3-36: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit der isolierten Kandidatenverbindung.....	102
Abbildung 3-37: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit D- und L-Tryptophan.....	103
Abbildung 3-38: Zytokin-Quantifizierung in den Überständen humaner DZ nach Behandlung mit ausgewählten probiotischen Überständen.	106
Abbildung 3-39: Zytokin-Quantifizierung in den Überständen humaner DZ nach Behandlung mit L- und D-Tryptophan.	107
Abbildung 3-40: Cyp1a1-mRNA-Expression in murinen LA-4 Zellen nach Behandlung mit D- oder L-Tryptophan.	108
Abbildung 3-41: Bild der Agarose-Gelelektrophorese der <i>GPR109b</i> -RT PCR.....	109

Abbildung 3-42: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem GPR109B-Agonisten 1-(Isopropyl)-1H-Benzotriazol-5-Carbonsäure (C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₂).....	110
Abbildung 4-1: Umwandlung von Tryptophan in AhR-Liganden.	120
Abbildung 6-1: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2.....	127
Abbildung 6-2: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	128
Abbildung 6-3: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01.....	129
Abbildung 6-4: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12.....	130
Abbildung 6-5: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46.....	131
Abbildung 6-6: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420.....	132
Abbildung 6-7: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2.....	133
Abbildung 6-8: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	134
Abbildung 6-9: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01.....	134
Abbildung 6-10: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12.....	135
Abbildung 6-11: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46.....	136
Abbildung 6-12: CCL17-Quantifizierung in den Überständen humaner KM-H2 Zellen nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420.....	137
Abbildung 6-13: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2. .	138
Abbildung 6-14: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5. .	139
Abbildung 6-15: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01....	140

Abbildung 6-16: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12.	141
Abbildung 6-17: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46...	142
Abbildung 6-18: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420. ...	143
Abbildung 6-19: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2. .	144
Abbildung 6-20: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5. .	145
Abbildung 6-21: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01....	146
Abbildung 6-22: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12.	147
Abbildung 6-23: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46...	148
Abbildung 6-24: Expression der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR durch DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420. ...	149
Abbildung 6-25: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-2.	150
Abbildung 6-26: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.	151
Abbildung 6-27: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Lactobacillus paracasei</i> LC-01.	152
Abbildung 6-28: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12.....	153
Abbildung 6-29: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46.....	154
Abbildung 6-30: Dichte der Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR auf DZ nach Behandlung mit dem Überstand von <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-420.....	155
Abbildung 8-1: UPLC-PDA Chromatogramme der 20% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG, W56 und W102.	181
Abbildung 8-2: UPLC-PDA Chromatogramme der 40% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG und W56.	182

Abbildung 8-3: UPLC-PDA Chromatogramme der 50% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG und W56.	183
Abbildung 8-4: UPLC-URH-TOF-MS Analyse der bioaktiven Subfraktionen und ihren unmittelbaren Nachbarsubfraktionen von LGG und W56.	184
Abbildung 8-5: 800MHz ¹ H-NMR Spektren.	185
Abbildung 8-6: Enantiomeren-Separation.....	186

8.4. Kooperationsdaten

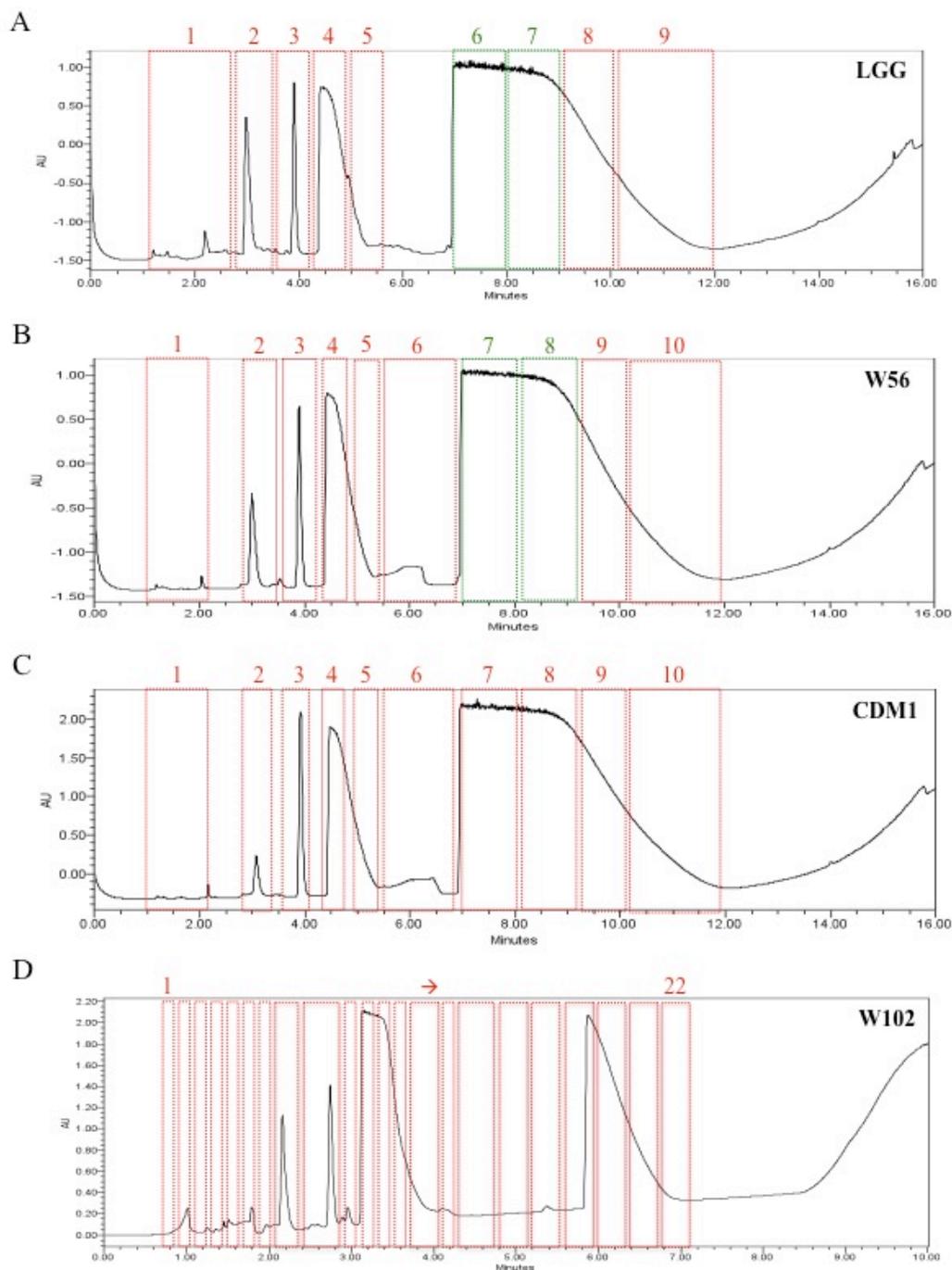


Abbildung 8-1: UPLC-PDA Chromatogramme der 20% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG, W56 und W102.

Farblich angedeutet sind die definierten Subfraktionen der 20% MeOH-Fractionen der Überstände von (A) LGG: Segmente 1-9 und (B) W56: Segmente 1-10. In (C) ist das Chromatogramm der 20% MeOH-Fraktion der Mediumkontrolle gezeigt mit den Segmenten 1-10 und in (D) das der Negativkontrolle W102 mit den Segmenten 1-22. Die Definition der Segmente erfolgte individuell dem jeweiligen Chromatogramm angepasst. Die einzelnen Subfraktionen wurden für Bioaktivitätstest in beiden Screening Systemen automatisch gesammelt. Die grünen Subfraktionen zeigten dabei immunmodulatorische Effekte. Chromatographische Parameter: Wellenlänge 200 nm, Kinetex PFP Säule mit 1,7 μm Partikelgröße, 2,1 x 150 mm; nichtlinearer Gradient in 10 min von 5 bis 25% B, 14 min bis 100% B bei 40°C mit 0,180 ml/min Flußrate (A: 10% MeOH/Wasser. B 100% MeOH).

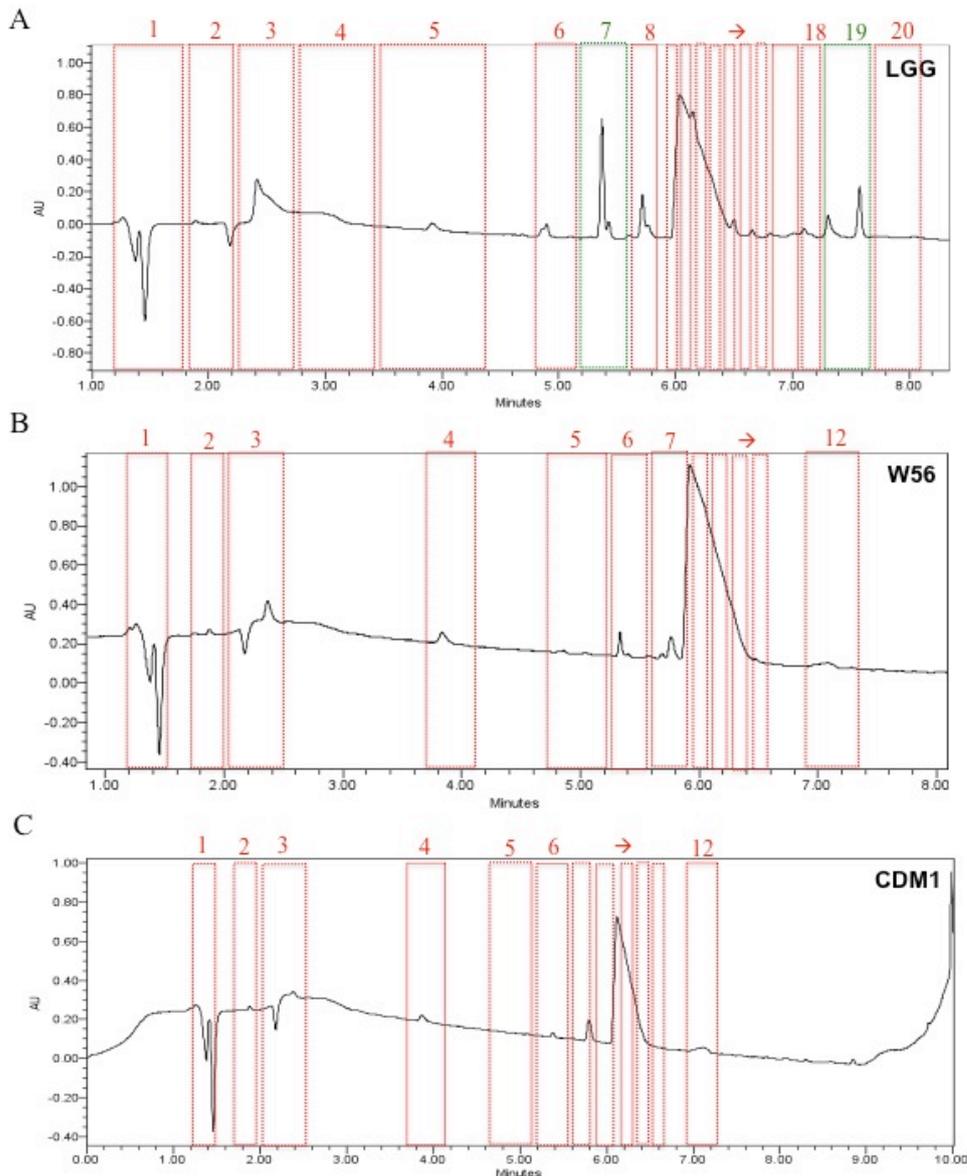


Abbildung 8-2: UPLC-PDA Chromatogramme der 40% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG und W56.

Farblich angedeutet sind die definierten Subfraktionen der 40% MeOH-Fractionen der Überstände von (A) LGG: Segmente 1-20 und (B) W56: Segmente 1-12. In (C) ist das Chromatogramm der 40% MeOH-Fraktion der Mediumkontrolle gezeigt mit den Segmenten 1-12. Die Definition der Segmente erfolgte individuell dem jeweiligen Chromatogramm angepasst. Die einzelnen Subfraktionen wurden für Boaktivitätstest in beiden Screening Systemen automatisch gesammelt. Die grünen Subfraktionen zeigten dabei immunmodulatorische Effekte. Chromatographische Parameter: Wellenlänge 200 nm, Kinetex PFP Säule mit 1,7 μm Partikelgröße, 2,1 x 150 mm; nichtlinearer Gradient in 10 min von 5 bis 25% B, 14 min bis 100% B bei 40°C mit 0,180 ml/min Flußrate (A: 10% MeOH/Wasser. B 100% MeOH).

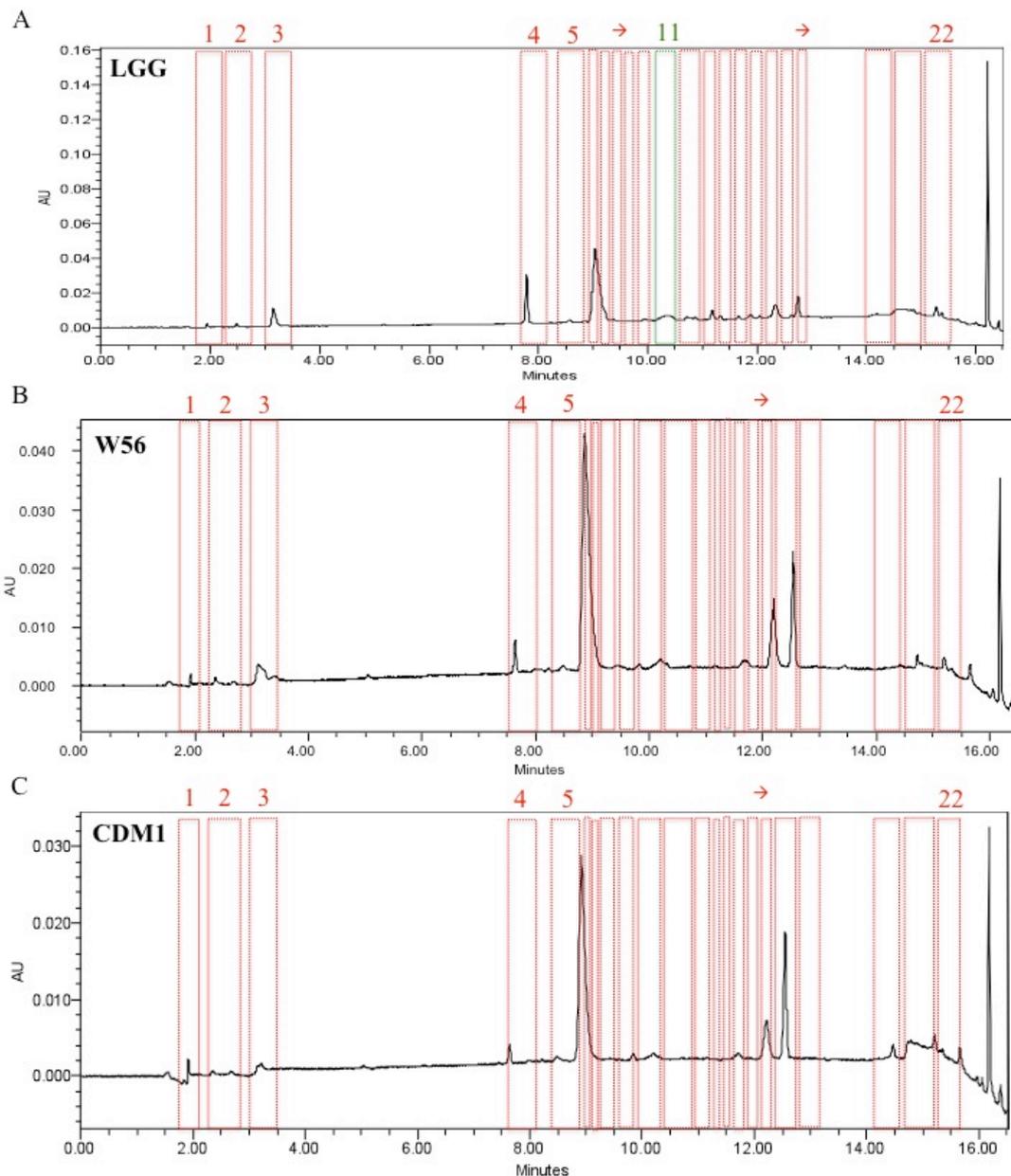


Abbildung 8-3: UPLC-PDA Chromatogramme der 50% MeOH-Fractionen der Überstände von LGG und W56.

Farblich angedeutet sind die definierten Subfraktionen der 40% MeOH-Fractionen der Überstände von (A) LGG: Segmente 1-22 und (B) W56: Segmente 1-12. In (C) ist das Chromatogramm der 40% MeOH-Fraktion der Mediumkontrolle gezeigt mit den Segmenten 1-12. Die Definition der Segmente erfolgte individuell dem jeweiligen Chromatogramm angepasst. Die einzelnen Subfraktionen wurden für Bioaktivitätstest in beiden Screening Systemen automatisch gesammelt. Die grünen Subfraktionen zeigten dabei immunmodulatorische Effekte. Chromatographische Parameter: Wellenlänge 284 nm, Kinetex PFP Säule mit 1,7 μm Partikelgröße, 2,1 x 150 mm; nichtlinearer Gradient in 10 min von 5 bis 25% B, 14 min bis 100% B bei 40°C mit 0,190 ml/min Flußrate (A: 10% MeOH/Wasser. B 100% MeOH).

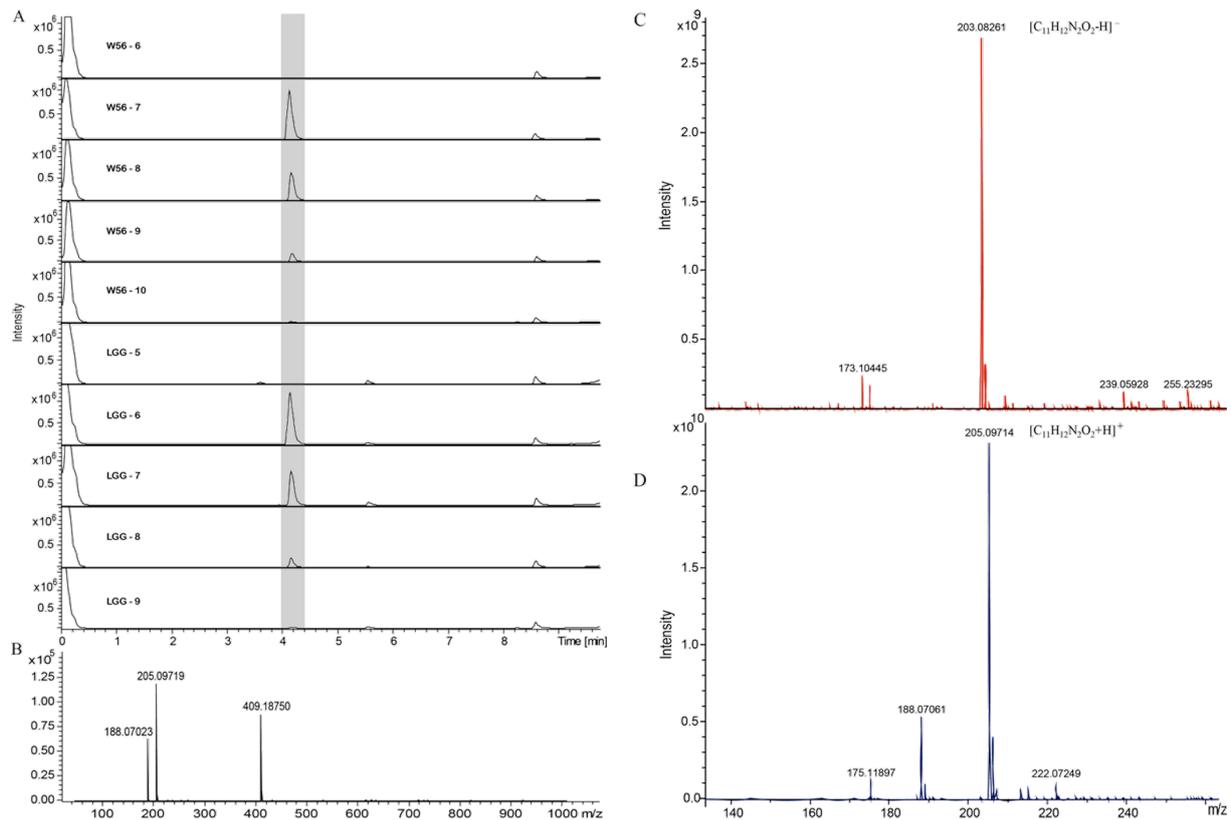


Abbildung 8-4: UPLC-URH-TOF-MS Analyse der bioaktiven Subfraktionen und ihren unmittelbaren Nachbarsubfraktionen von LGG und W56.

In **(A)** ist das Total Ion Chromatogram in ESI positivem Zustand mittels reverser Phase Chromatographie dargestellt (C_{18} Säule: $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 150 \text{ mm}$). Es zeigt einen klaren Peak nach einer Retentionszeit von $t_R = 4,2$ min bei allen bioaktiven Subfraktionen. In **(B)** ist das extrahierte Massenspektrum gezeigt, welches mit der chromatographischen Zeitspanne von 4,1–4,3 min korrespondiert. Das identische Profil wurde für alle bioaktiven Subfraktionen beobachtet, wobei m/z 409.1875, 205.0971 und 188.0702 deutlich auf die Tryptophan-Ionen $[2M+H]^+$, $[M+H]^+$ und auf das Fragment $[M+H-NH_3]^+$ hinweisen. In **(C)** und **(D)** sind die FT-ICR-MS Spektren der aufgereinigten bioaktiven Subfraktion 6 von LGG in ESI negativem und ESI positivem Zustand dargestellt. Die zugewiesene molekulare Formel ist $C_{11}H_{12}N_2O_2$ mit einem Fehler von < 0.01 ppm.

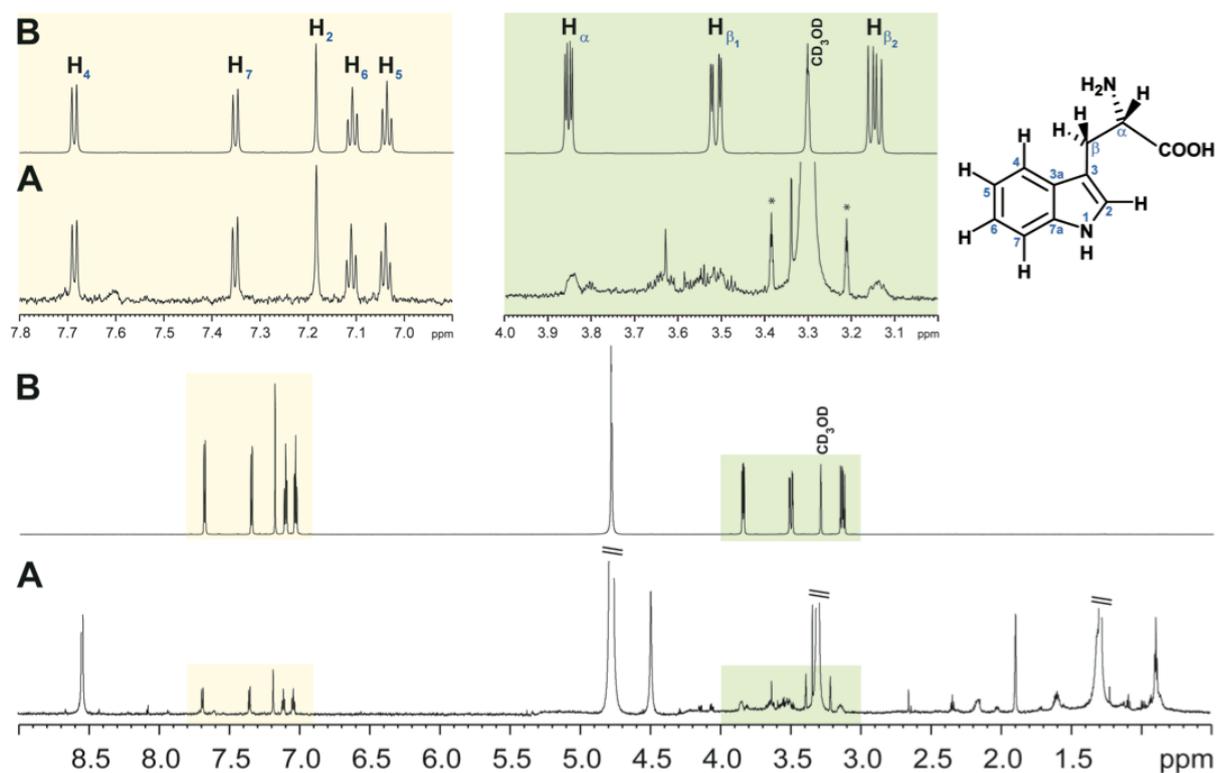
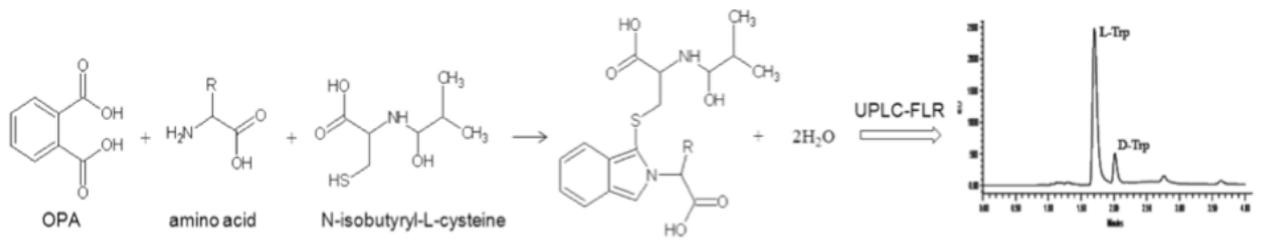


Abbildung 8-5: 800MHz $^1\text{H-NMR}$ Spektren.

In (A) sind jeweils die Spektren der isolierten Kandidatenverbindung dargestellt. (Sterne: ^{13}C -Satelliten bei 0.5% Intensität von HCD_2OD mit 99.95% ^2H). J-Kupplungen und Aromatische Ringysteme werden gut erkannt, während aliphatische teilweise aufbrechen aufgrund eines niedrigen S/N-Verhältnisses. In (B) sind jeweils die Spektren von L-Tryptophan in CD_3OD dargestellt, die aromatischen Ringe sind gelb und die aliphatischen grün angedeutet. (Anmerkung: D- und L-Tryptophan produzieren identische NMR Spektren in achiralen Lösungsmitteln).

A



B

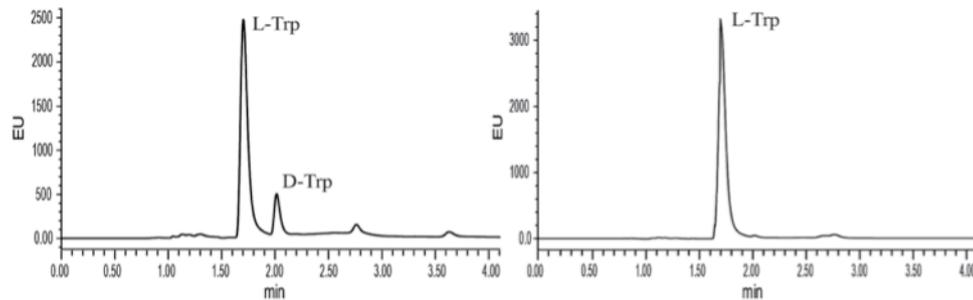


Abbildung 8-6: Enantiomeren-Separation.

In (A) ist die Derivatisierungsreaktion von Aminosäuren mit O-Phthaldialdehyd (OPA) und N-Isobutyl-L-Cystein (IBLC) für die Enantiomeren-Separation schematisch dargestellt. Unter den angewandten chromatographischen Bedingungen eluiert die L-Form vor der D-Form. In (B) sind die vergleichenden UPLC-FLR Chromatogramme der aufgereinigten bioaktiven LGG-Subfraktion 6 links und der entsprechenden CDM1-Subfraktion rechts gezeigt ($\lambda = 300$ nm Anregung und $\lambda = 445$ nm Emission).

8.5. Publikation

Inge Kepert, Juliano Fonseca, Constanze Müller, Katrin Milger, Kerstin Hochwind, Matea Kostric, Stefan Dehmel, Petra Nathan, Oliver Eickelberg, Michael Schloter, Anton Hartmann, Philippe Schmitt-Kopplin and Susanne Krauss-Etschmann: D-tryptophan is a probiotic compound that ameliorates allergic airway disease and maintains the gut microbiome. (Eingereicht bei Journal of Allergy and Clinical Immunology, JACI)

8.6. Vorträge

Hartmann, A., Kepert, I., Fonseca, J., Hochwind, K., Schmid, M., van Hemert, S., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2012): Identification of D-tryptophan as immunologically active compound excreted by probiotic bacteria using highly resolving metabolite analysis and immunological *in vitro*-test systems. “7th International Symbiosis Society Congress”, 22.-28.Juli, Jagiellonian University, Kraków, Polen.

Kepert, I., Hochwind, K., Fonseca, J., Schmitt-Kopplin, P., Hartmann, A., Krauss-Etschmann, S. (2011): IMMUNE MODULATORY ACTIVITY IN SUPERNATANTS FROM PROBIOTIC BACTERIAL STRAINS. “International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics”, 14.-16.Juni 2011, Kosice, Slowakei.

Hartmann, A., Kepert, I., Hochwind, K., Fonseca, J., Schmid, M., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2010): Characterization of secreted soluble compounds from probiotic bacteria using different immunological test systems. “Gut Microecology Meeting”, 9.-11.November 2010, Kosice, Slowakei.

8.7. Poster

Kepert, I., Fonseca, J., Hochwind, K., Schmid, M., van Hemert, , Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2012): Identification of D-tryptophan as immunologically active compound excreted by probiotic bacteria using immunological *in vitro*-test systems. “5th Seeon Conference“, 15.-17.Juni, Kloster Seeon, Deutschland.

Kepert, I., Fonseca, J., Hochwind, K., Schmid, M., van Hemert, S., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2012): Identification of D-tryptophan as immunologically active compound excreted by probiotic bacteria using immunological *in vitro*-test systems. VAAM-Jahrestagung 2012, 18.–21. März, Tübingen, Deutschland.

Hochwind, K., Kepert, I., Fonseca, J., van Hemert, S., Schmid, M., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S., Hartmann, A. (2011): Characterization of bioactive molecules of Gram-positive, probiotic bacteria. “10th Symposium on Lactic Acid Bacteria”, 28.August-1.September 2011, Egmond aan Zee, Niederlande.

Kepert, I., Fonseca, J., Hochwind, K., Eickelberg, O., Schmid, M., Schmitt-Kopplin, P., Hartmann, A., Krauss-Etschmann, S. (2011): IMMUNE MODULATORY ACTIVITY IN PROBIOTIC SUPERNATANTS. “European Respiratory Society Annual Congress“, 24.-28.September 2011, Amsterdam, Niederlande.

Fonseca, J., Kepert, I., Hochwind, K., Hartmann, A., Krauss-Etschmann, S., van Hemert, S., Schmid, M., Schmitt-Kopplin, P. (2011): METABOLOMIC PROFILING OF DIFFERENT PROBIOTIC STRAINS BY (ULTRA) HIGH MASS SPECTROMETRY. "International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics", 14.-16.Juni 2011, Kosice, Slowakei.

Kepert, I., Hochwind, K., Fonseca, J., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2011): Detection of Th2-counteracting activity in supernatants from probiotic bacteria. "American Thoracic Society International Conference", 13.-18.Mai 2011, Denver, USA.

Kepert, I., Fonseca, J., Hochwind, K., Schmid, M., van Hemert, S., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2011): Identification of D-tryptophan as immunologically active compound excreted by probiotic bacteria using immunological *in vitro*-test systems. "Second TNO Beneficial Microbes Conference", Noordwijkerhout, Niederlande.

Kepert, I., Hochwind, K., Fonseca, J., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S. (2010): PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF SECRETED SOLUBLE COMPOUNDS FROM SELECTED PROBIOTICS WITH IMMUNE MODULATORY FUNCTIONS. „4th International Symposium on Molecular Allergology", 29.-31.Oktober 2010, München, Deutschland.

Hochwind, K., Müller, I., Fonseca, J., Schmitt-Kopplin, P., Krauss-Etschmann, S., Hartmann, A. (2010): Production and characterization of signal molecules of the "quorum sensing" system in Gram-positive, probiotic bacteria. „3rd Seeon Conference: Microbiota, Probiota and Host“, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 18.-20.Juni 2010, Kloster Seeon, Deutschland.

8.8. Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann für die Überlassung des interessanten Themas, für die Möglichkeit, diese Arbeit im Kubus Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchführen zu können und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bei meinem Erstgutachter Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann bedanke ich mich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der LMU München, für die Koordinierung des Projektverbundes „Immunmodulatorische Substanzen von Probiotika und für die wertvollen und hilfreichen Hinweise zu meinem Projekt. Die gemeinsamen Kongressreisen werden mir in schöner Erinnerung bleiben.

Ein Dankeschön an die Zweitgutachterin Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß und an die gesamte Prüfungskommission, für die Beurteilung und Prüfung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Adelbert Roscher, Leiter des Kubus Forschungszentrums des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, vielen Dank für sein Engagement und die konstruktiven Gedanken zum Projekt.

Ein ganz herzliches Dankeschön an meine Kooperationspartner im Helmholtz Zentrum München, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre:

Kerstin aus der Abteilung „Mikroben-Pflanzen Interaktionen“, Arbeitsgruppe Schmid/Hartmann, danke ich für den hilfsbereiten und unermüdlichen Einsatz in der Bakterienkultivierung und der Überstandsgewinnung. Unsere stets hoch wissenschaftlichen Gespräche haben mich immer sehr aufgemuntert!

Juliano aus der Abteilung „Analytische Biogeochemie“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin sei ebenfalls für seinen theoretischen und praktischen Beitrag vielfach gedankt.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an die komplette AG Krauss-Etschmann für das nette Arbeitsklima.

Tatl, Nikl, Reserl, Gaby, Conny und Rodl sei herzlich für die moralische und praktische Unterstützung, für die vielen lustigen Stunden und für alle sonstigen Ablenkungen ☺ gedankt. Ich nehme einen Touchdown...

Spezieller Dank geht nochmals an Tatl für die praktische Einarbeitung in die Geheimnisse der DZ-Generierung und die Bedienung eines korrupten FACS. Unsere Freundschaft, die darüber entstanden ist, möchte ich nicht mehr missen!!!

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinem Mann Felix, und bei meinen weiteren Freunden Sabine, Stephe und Markus, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben!

8.9. Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich erkläre desweiteren, dass die Dissertation erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt worden ist und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe. Diese Arbeit wurde von Frau PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann am Comprehensive Pneumology Center des Helmholtz Zentrum München betreut und wird von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Anton Hartmann vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vertreten.

München, den 23.12.2014

.....

(Ingeborg Kepert)