

**Einfluss prebiotischer Oligosaccharide
und probiotischer Bakterien
auf den Phänotyp und die Funktion
dendritischer Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anette Krämer
geborene Urbanczyk
geboren am 26. April 1979 in Laurahütte

Mainz, am 14. Januar 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2010

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Nieder-Hilbersheim, am 14. Januar 2010

Anette Krämer

A Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	I
B	Danksagung	VII
C	Veröffentlichungen	VIII

1. Einleitung 1

1.1	Das Ökosystem Darm	2
1.2	Der Darm und seine Mikroflora	3
1.3	Immunfunktionen des GALT („gut-associated-lymphoid-tissue“)	5
1.4	Entwicklung von Allergien	5
1.5	Probiotika	8
1.5.1	Wirkmechanismen der Probiotika	9
1.5.2	Einsatz von Probiotika bei Kindern und Erwachsenen	9
1.6	Prebiotika	12
1.6.1	Prebiotika in der Säuglingsnahrung	13
1.6.2	Humane-Milch-Oligosaccharide (HMOS).....	14
1.6.3	Wirkung der Prebiotika	15
1.7	Dendritische Zellen	16
1.8	Tolerogene dendritische Zellen	19
1.9	Regulatorische T-Zellen	20
1.10	Zielsetzung der Arbeit	22

2. Material und Methoden 24

2.1	Materialien	24
2.1.1	Laborgeräte	24
2.1.2	Labor- und Verbrauchsmaterialien	26

2.1.3	Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.4	Puffer und Lösungen	30
2.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	33
2.1.5.1	Zusätze für Zellkulturmedien	33
2.1.5.2	Zellkulturmedien	34
2.1.6	Antikörper	36
2.1.6.1	Antikörper für die FACS-Analyse.....	36
2.1.6.2	Antikörper für Zytokin-ELISA	39
2.1.6.3	MicroBeads für die magnetische Zellseparation	41
2.1.7	Zytokine	41
2.1.7.1	Zytokine für die Zellkultur	41
2.1.7.2	Zytokine für den ELISA (Standard)	42
2.1.8	Peptide	43
2.1.9	Prebiotische Oligosaccharide	43
2.1.10	Probiotische Bakterien	43
2.2	Zellkultur und zellbiologische Methoden	44
2.2.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	44
2.2.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	45
2.2.1.2	Bestrahlung von Zellen	45
2.2.1.3	Auftauen von Zellen	46
2.2.2	Haltung von Zelllinien	46
2.2.2.1	Haltung der Zelllinie 7TD1	46
2.2.2.2	Haltung der Zelllinie CTLL-2	47
2.2.2.3	Haltung der Zelllinie P388/GM-CSF	47
2.2.2.4	Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-IL-2	47
2.2.2.5	Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-IL6	48
2.2.2.6	Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-GM-CSF	48
2.2.3	Präparation von Zellen aus lymphoiden Organen der Maus	49
2.2.3.1	Mäuse	49
2.2.3.2	Gewinnung von Knochenmarkszellen	49
2.2.3.3	Gewinnung von Milzzellen	50
2.2.3.4	Gewinnung von Lymphknotenzellen	50
2.2.4	Kultivierung (Differenzierung und Stimulation) von BM-DCs	51

2.2.4.1	Generierung von DCs aus Knochenmarksvorläuferzellen unter serumhaltigen Bedingungen	51
2.2.4.2	Stimulation von BM-DCs unter serumhaltigen Bedingungen	51
2.2.4.3	Generierung von DCs aus Knochenmarksvorläuferzellen unter serumfreien Bedingungen	52
2.2.4.4	Stimulation von BM-DCs unter serumfreien Bedingungen	53
2.2.4.5	Ernten der BM-DC-Kulturen	53
2.2.4.6	Kultivierung von BM-DCs mit prebiotischen Oligosacchariden	53
2.2.4.7	Kultivierung von BM-DCs mit probiotischen Bakterien	54
2.3	Funktionelle Untersuchungen zur T-Zell-stimulatorischen Kapazität von DCs <i>in vitro</i>	54
2.3.1	Aufreinigung von T-Zellen	54
2.3.1.1	Aufreinigung von T-Zellen über Nylonwolle-Säulen	54
2.3.1.2	Aufreinigung von CD90 ⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation	55
2.3.2	T-Zell-Stimulationsassays	56
2.3.2.1	Allogene Stimulation von T-Zellen	56
2.3.2.1.1	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	56
2.3.2.1.2	Restimulation der T-Zellen aus der MLR	57
2.3.2.1.3	Suppressions-Test	58
2.3.2.2	Stimulation von T-Zellen	59
2.3.2.2.1	Beladung von BM-DC mit OVA ₃₂₃₋₃₃₉	59
2.3.2.2.2	Stimulation von OT-II-T-Zellen	59
2.3.2.2.3	CFSE-Proliferationstest	60
2.4	Bestimmung der allogenen T-Zell-stimulatorischen Kapazität von BM-DCs <i>in vivo</i> (<i>In-vivo</i>-MLR)	61
2.5	FACS-Analyse	62
2.5.1	Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen	63
2.5.2	Nachweis von IFN- γ und IL-4 produzierenden T-Zellen in Kokulturen durch intrazelluläre FACS-Färbung	64

2.6	Zytokin-Bestimmung in Zellkulturüberständen	66
2.6.1	Zytokin-Bestimmung mittels ELISA	66
2.6.2	IL-2-Bestimmung mittels Bioassay	67
2.6.3	IL-6-Bestimmung mittels Bioassay	68
2.7	Molekularbiologische Methoden	69
2.7.1	Spezielle Reagenzien für die Molekularbiologie	69
2.7.1.1	Fertigsysteme	69
2.7.1.2	Primer	69
2.7.2	RNA-Isolierung	70
2.7.3	Aufreinigung der RNA mit dem „RNA Isolation Kit“	71
2.7.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	71
2.7.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung der cDNA	72
2.7.6	Quantitative (Realtime) Polymerase-Kettenreaktion (QPCR)	72
2.8	Graphische Darstellung und Statistik	75
3.	Ergebnisse	76
3.1	Einfluss der Stimulation von BM-DCs mit Lipopolysaccharid (LPS) auf deren Phänotyp und Funktion.....	76
3.2	Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosacchride auf den Phänotyp und die Funktion von BM-DCs	80
3.2.1	Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosaccharide auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs	80
3.2.2	Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen verändert das Genexpressionsprofil der Zellen nach deren Stimulation mit LPS	86
3.2.3	Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen auf deren Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS	88

3.2.4	Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosaccharide auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs <i>in vitro</i>	90
3.2.5	Einfluss von NOS-Präparationen auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs <i>in vivo</i>	97
3.2.6	Die Stimulation naiver T-Zellen durch BM-DCs, die unter dem Einfluß von NOS-Präparationen differenziert wurden, induziert Anergie in den T-Zellen	102
3.2.7	Auf funktioneller Ebene ist eine Treg-Induktion nach Stimulation von naiven T-Zellen mit NOS-behandelten BM-DCs nicht zu sehen	103
3.2.8	T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor FoxP3	105
3.2.9	Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen verändert das Zytokinprofil der Zellen nach deren Stimulation mit LPS	107
3.2.10	Verschiedene NOS-Präparationen zeigen unterschiedliche Aktivität bei der Differenzierung der BM-DCs	111
3.3	Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Differenzierung von BM-DCs	115
3.3.1	Einfluss von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG auf die Differenzierung von BM-DCs	115
3.3.1.1	Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs	116
3.3.1.2	Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG verändert das Genexpressionprofil der Zellen	120
3.3.1.3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG moduliert die Zytokinproduktion nach Zusatz zu unstimulierten bzw. LPS-stimulierten BM-DC-Kulturen ...	122
3.3.1.4	Einfluss von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR)	128

3.3.1.5	Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG resultiert in einem veränderten Zytokinprofil kokultivierter naiver T-Zellen	134
3.3.2	Einfluss von <i>Lactobacillus fermentum</i> auf die Differenzierung von BM-DCs	137
3.3.2.1	Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss von <i>Lactobacillus fermentum</i> auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs	137
3.3.2.2	Einfluss von <i>Lactobacillus fermentum</i> auf die Zytokinproduktion von BM-DCs	139
3.3.2.3	Einfluss von <i>Lactobacillus fermentum</i> auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR)	141
3.3.2.4	Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von <i>Lactobacillus fermentum</i> verändert das Zytokinprofil kokultivierter naiver T-Zellen	143
4.	Diskussion	145
5.	Zusammenfassung	157
6.	Literaturverzeichnis	160
D	Abkürzungsverzeichnis	IX
E	Lebenslauf	XIII

C Veröffentlichungen

Tagungsberichte

S. Sudowe, A. Urbanczyk, B. Stahl, J. Schmitt, E. Samain, G. Boehm, J. Knop and AB. Reske-Kunz. *Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by dietary prebiotics*. **19. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 10. - 11. März 2006, Mainz. *Allergo-Journal* 15: 40 (Abstract V26).**

A. Urbanczyk, B. Stahl, J. Schmitt, E. Samain, G. Boehm, J. Knop, AB. Reske-Kunz and S. Sudowe. *Modulation of dendritic cell phenotype and function by dietary prebiotics*. **1st Joint Meeting of the European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, 06. - 09. September 2006, Paris, Frankreich. *Kongressabstract*.**

A. Urbanczyk, B. Stahl, J. Schmitt, E. Samain, G. Boehm, J. Knop, S. Sudowe and AB. Reske-Kunz. *Dietary prebiotics interfere with dendritic cell maturation*. **34. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 08. - 10. März 2007, Freiburg. *Kongressabstract*.**

A. Urbanczyk, B. Stahl, J. Schmitt, E. Samain, G. Boehm, J. Knop, AB. Reske-Kunz and S. Sudowe. *Prebiotic oligosaccharides modulate dendritic cell phenotype and function*. **5th EAACI GA2LEN Davos meeting: Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology, 01. - 04. Februar 2007, Davos, Schweiz. *Kongressabstract*.**

A. Krämer, B. Stahl, J. Schmitt, E. Samain, G. Boehm, AB. Reske-Kunz and S. Sudowe. *Modulation of murine dendritic cell phenotype and function by dietary prebiotics*. **XXVII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), 07. - 11. Juni 2008, Barcelona, Spanien. *Kongressabstract*.**

1. Einleitung

Die Zusammensetzung der Darmflora spielt eine Schlüsselrolle für die Gesundheit und das Wohlbefinden des Menschen. Dies erkannte als erster der russische Bakteriologe und spätere Medizin-Nobelpreisträger Elie Metchnikoff, der am Louis Pasteur Institut in Paris arbeitete und lehrte. Bereits 1907 wies er auf die Bedeutung der Darmflora hin und begründete das Konzept der Probiotika [Björkstén, 2004; Broussard *et al.*, 2004]. Metchnikoff studierte um 1900 das Phänomen der hohen Lebenserwartung bestimmter Volksgruppen im Kaukasus und in Bulgarien und führte das überdurchschnittlich hohe Alter dieser Völker auf ihren übermäßigen Konsum von fermentierten Milchprodukten zurück [Metchnikoff, 1907]. Den für die Fermentation verantwortlichen Mikroorganismus nannte er *Bacillus bulgaricus*, später *Lactobacillus bulgaricus*. Im selben Zeitraum hat Henry Tissier [1900], der ebenfalls als Bakteriologe am Louis Pasteur Institut in Paris gearbeitet hat, nachgewiesen, dass bei gestillten Säuglingen Bifidobakterien die im Stuhl dominierende Bakterienspezies sind, und daraus abgeleitet, dass Diarrhoe bei Säuglingen durch die Verabreichung von Bifidobakterien behandelt werden könnte. Diese Überlegungen waren der Beginn der Erforschung der Wirkmechanismen der menschlichen Darmflora auf das Immunsystem. Trotz dieser wichtigen Grundsteinlegung entwickelte sich in den darauf folgenden Jahren nur ein geringes Interesse für dieses wissenschaftliche Themengebiet, welches erst in den letzten Jahren wieder neu auflebte. Dabei hat der Einsatz von Bakterien in Lebensmitteln, insbesondere von Milchsäurebakterien, eine lange Tradition, deren Grundprinzip darin besteht, mittels Milchsäurebakterien Lebensmittel haltbarer bzw. schmackhafter zu machen. Beweis hierfür ist der Verzehr und die Verträglichkeit solcher Bakterien in Lebensmitteln seit mehreren hundert Jahren.

In den vergangenen Jahren haben unsere Kenntnisse über die Einflüsse der Lebensmittel auf die Gesundheit große Fortschritte gemacht. Gestützt auf dieses neue Wissen, sind wir nunmehr in der Lage, neue, gesündere Lebensmittel zu entwickeln und so das Risiko für eine Reihe chronischer und infektiöser Krankheiten einzuschränken. Die dafür entworfenen Lebensmittel werden oft mit dem vor einiger Zeit in Japan geprägten Begriff „functional food“ (funktionelle Lebensmittel) bezeichnet [Mattila-Sandholm *et al.*, 2002, Grajek *et al.*, 2005]. Hierbei handelt es sich um herkömmliche Lebensmittel, die so verändert worden sind, dass sie eine gesundheitsfördernde Wirkung ausüben, welche die unveränderten Produkte

nicht besitzen. Die wichtigsten Gruppen funktioneller Lebensmittel, gerade auch im Segment der Kinderlebensmittel, sind probiotische und prebiotische Produkte mit denen man insbesondere im Bereich des Magen-Darm-Trakts gezielt bestimmte Funktionen beeinflussen möchte [Young, 1998]. Hierzu zählen Keimbesiedlung und Fermentationsprozesse im Darm oder die Entwicklung von Infektionen und Allergien. Davon ist direkt oder indirekt vor allem auch das Immunsystem betroffen. Aktuellen Studienergebnissen zufolge spielt der Kontakt mit Mikroorganismen in Umwelt und Darmflora eine wesentliche Rolle für die Ausbildung des Immunsystems und die Entwicklung der immunologischen Toleranz [Björkstén, 2005].

1.1 Das Ökosystem Darm

Der Mensch ist von einer Umwelt umgeben, die mit Mikroorganismen besiedelt ist. Dazu zählen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Einige dieser Mikroorganismen sind Krankheitserreger, andere wiederum besiedeln als Symbionten die menschliche Darmflora. Eine solche symbiontische Mikroflora ist unerlässlich für die Verdauung und den Schutz vor Krankheiten. Dazu beherbergt der Mensch entlang seiner Darmschleimhaut eine gigantische Menge von Darmbakterien; er bewirbt über 100 Billionen Bakterien, was zahlenmäßig etwa dem Zehnfachen sämtlicher Zellen des menschlichen Körpers entspricht.

Im distalen Ileum und im Kolon finden sich mehr als 500 verschiedene aerobe- und anaerobe Bakterienarten. Je nach Milieubedingungen dominieren in den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes unterschiedliche Bakterienarten; im Dünndarm wird die Besiedlung mit aeroben und im Kolon mit streng anaeroben Mikroorganismen begünstigt [Groeneveld, 2009]. Auch die Anzahl der Mikroorganismen variiert in den unterschiedlichen Abschnitten; aufgrund des sauren Milieus im Magen und Dünndarm können nur wenige Bakterien überleben, während im Kolon die Keimdichte mit 10^{10} bis 10^{12} Mikroorganismen pro Gramm Faeces am höchsten ist (siehe Abbildung 1).

Einige dieser Keime haben protektive, andere wiederum pathogene Eigenschaften [Sartor, 2004]. Im Darm findet eine konstante und komplexe Interaktion zwischen diesen Bakterien, den Epithelzellen und dem intestinalen Immunsystem statt. Bei einem gesunden Individuum besteht eine Homöostase zwischen potenziell pathogenen Keimen und apathogenen Keimen. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu einer Veränderung der intestinalen Barriere kommen, welche die Entstehung bestimmter Krankheiten im Magen-Darm-Trakt begünstigt. Daraus resultierende Störungen im Darm könnten von pathophysiologischer Relevanz und

damit ein therapeutisches Ziel für bestimmte Substanzen sein, welche die Zusammensetzung oder Funktion der Darmflora modulieren. Derzeit werden drei Prinzipien, welche die Darmflora modulieren können unterschieden. Hierbei handelt es sich um Probiotika, Prebiotika und Synbiotika [Fuller, 1989; Gibson und Roberfroid, 1995; Salminen *et al.*, 1998]; die größte klinische Bedeutung weisen derzeit die Probiotika sowie die Prebiotika auf; durch die Kombination beider Prinzipien in Form von Synbiotika werden synergistische Effekte erhofft.

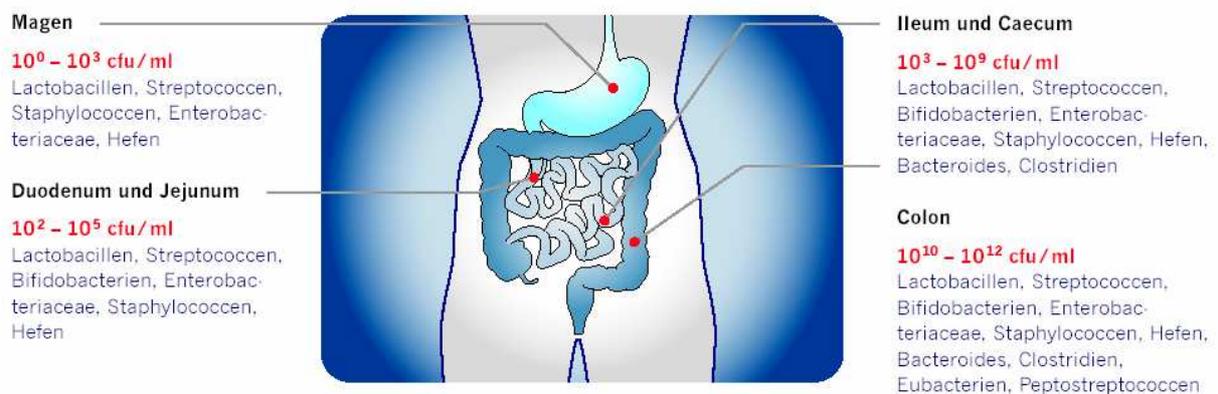


Abb. 1: Mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltraktes

(nach Simon und Gorbach 1984, *Gastroenterology*)

1.2 Der Darm und seine Mikroflora

Die Entwicklung und Regulation der lokalen und systemischen Immunität hängt wesentlich von der Zusammensetzung der mikrobiellen Flora ab, welche vorwiegend aus Bakterien besteht. Pilze haben nur eine untergeordnete Funktion.

Während der Gastrointestinaltrakt des Foetus noch steril ist, wird er im Laufe der Passage durch den Geburtskanal und in den ersten Tagen nach der Geburt mit Bakterien besiedelt. Dabei wird die Zusammensetzung der Darmflora durch die Art der Geburt, die Bakterienflora der Mutter und der Umwelt sowie durch die Art der Ernährung stark geprägt [Favier *et al.*, 2002].

Die Ernährung mit Muttermilch ist für die Art der intestinalen Kolonisierung von großer Bedeutung. Zu den weiteren Faktoren zählen aber auch die kindliche Umgebung, die Nahrungszusammensetzung und gegebenenfalls die Zufuhr von Antibiotika und anderen

Medikamenten. Das Alter sollte dabei auch nicht vernachlässigt werden; bei Neugeborenen und Kleinkindern sind verhältnismäßig nur wenige Spezies vorhanden. Dies steht in Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für Nahrungsmittelallergien und für gastrointestinale Infektionen, z.B. durch das Rotavirus [Bourlioux *et al.*, 2003]. Das Vorkommen des in Stuhlproben von gestillten Säuglingen gut nachweisbaren Bifidobakteriums korreliert mit einer starken Stimulation der IgA-Immunantwort, die im Vergleich zu, mit Formelnahrung gefütterten Kindern, feststellbar ist.

Pro Stillvorgang werden etwa 10^5 bis 10^7 natürliche Keime vom Säugling aufgenommen [Groeneveld, 2009]. Im Darm gestillter Säuglinge überwiegen zunächst Bifidobakterien, deren Wachstum durch die in Muttermilch enthaltene Kohlenhydrate (Oligosaccharide) gefördert wird. Mit Einführung der Beikost wird die Mikroflora auch mit anderen Bakterienstämmen, wie z.B. Bacteroides-Arten und Enterokokken besiedelt. Während im Erwachsenenalter die Anzahl der Bifidobakterien deutlich abnimmt [Kasper, 2001], vermehren sich *Escherichia coli*, Clostridien und Enterokokken (siehe Abbildung 2).

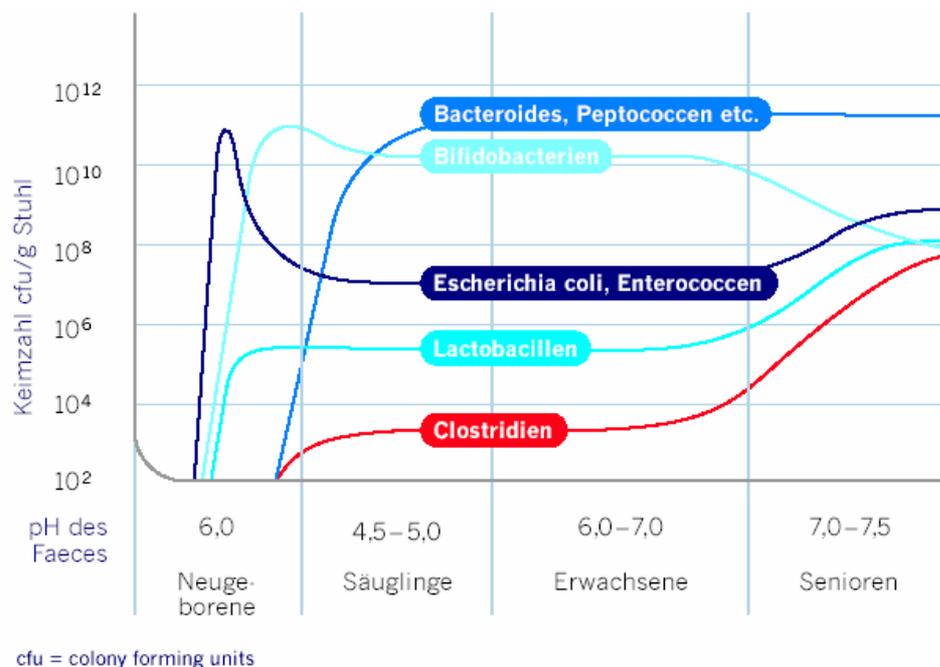


Abb. 2: Altersabhängige Besiedlung der Darmflora (Mitsuoka, 1992; *Nutr. Rev.*)

1.3 Immunfunktionen des GALT („gut-associated-lymphoid-tissue“)

Die intestinale Mukosa steht im permanenten Kontakt mit der Darmflora. Um schädliche Einflüsse abwehren zu können, befinden sich in der Mukosa immunologisch aktive Zellen; die Gesamtheit dieser Immunzellen wird als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (gut-associated-lymphoid-tissue, GALT) bezeichnet [Saavedra und Tschernia, 2002]. Hierzu zählen die Rachenmandeln, die Gaumenmandeln, der Blinddarm sowie spezialisierte Strukturen im Dünndarm, die sogenannten Peyerschen Plaques. Letztere zählen zu den wichtigsten und am höchsten organisierten Geweben unter den genannten. Mit ihren kuppelförmigen Strukturen, die in das Darmlumen hineinragen, verfügen sie über einen charakteristischen Aufbau. Ein weiteres Charakteristikum des GALT sind hochspezialisierte Epithelzellen, die sogenannten Mikrofaltenzellen oder M-Zellen, welche einen ständigen Kontakt des lymphatischen Gewebes mit dem Darminhalt und so das Zustandekommen spezifischer Immunantworten ermöglichen. Die M-Zellen nehmen über Endo-, bzw. Phagozytose Moleküle und Partikel aus dem Darmlumen auf und reichen diese an antigenpräsentierende Zellen (APCs) weiter [Nagler-Anderson, 2001]. Weiterhin können dendritische Zellen (DCs), die ihre Dendriten durch die Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) ausstrecken, pathogene Bakterien direkt aufnehmen [Rescigno *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005]. Zusätzlich gibt es aber auch noch Antikörper-vermittelte Mechanismen, wie die Transzytose von IgA-Antikörpern durch die Epithelien. IgA ist auf die Abwehr von Bakterien und Viren an der Oberfläche der Darmschleimhaut ausgerichtet und verhindert, dass sich Bakterien, Toxine sowie fremde Substanzen an Epithelzellen anlagern. IgA-Antikörper bilden somit die erste Verteidigungslinie gegen ein breites Spektrum an Erregern [Rey *et al.*, 2004]. Interaktionen zwischen probiotischen Bakterien und dem lymphatischen Gewebe können Immunantworten stimulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung spezifischer IgA-Antikörper gegen einen oral verabreichten Salmonellenstamm dann um ein Mehrfaches gesteigert wird, wenn gleichzeitig probiotische Milchsäurebakterien oral verabreicht werden [Link-Amster *et al.*, 1994].

1.4 Entwicklung von Allergien

Epidemiologisch ist es in den letzten Jahrzehnten in vielen Ländern, vor allem der hochtechnisierten westlichen Welt, zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz von T_{H2}-

vermittelten Allergien wie allergischem Asthma, atopischer Dermatitis oder Rhinokonjunktivitis gekommen [Warner *et al.*, 2000]. Mittlerweile sind ca. 20-30% der Bevölkerung von allergischen Erkrankungen betroffen.

Der Begriff Allergie wurde 1906 von dem Wiener Kinderarzt Freiherr Clemens von Pirquet geprägt; dieser erkannte als erster, dass Antikörper nicht nur schützende Immunantworten vermitteln, sondern auch Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen können. Heute beschreibt der Begriff Allergie die Überempfindlichkeitsreaktionen, die durch eine Immunantwort gegen ansonsten harmlose Stoffe oder Allergene ausgelöst wird. Zu den Allergenen gehören unter anderem Pollen, Nahrungsmittel, Tierhaare, Hausstaub oder Insektengifte, welche über die Schleimhäute der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes oder an der Haut mit dem Körper in Kontakt treten und allergische Reaktionen auslösen können.

Coombs und Gell [1968] haben die hypersensiblen Reaktionen anhand von Merkmalen wie dem zeitlichen Ablauf, der Art des Antigens oder den Krankheitsbildern in vier Typen eingeteilt. Häufig wird die Allergie mit der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I bzw. durch die IgE-vermittelte Überempfindlichkeit vom Soforttyp gleichgesetzt [Janeway *et al.*, 2002]. Bei einer Sensibilisierung, dem allerersten Kontakt mit einem Allergen, kommt es zur Bildung antigenspezifischer IgE-Antikörper. Dieses IgE unterscheidet sich von anderen Antikörperisotypen darin, dass es über seinen hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI fest an die Oberfläche von Mastzellen, aber auch von Basophilen und aktivierten Eosinophilen binden kann. Zuvor aber nehmen antigenpräsentierende Zellen, wie DCs, das Allergen auf, prozessieren es und präsentieren die entstandenen Peptide zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. T-Helfer-Zellen können die so präsentierten Antigenfragmente erkennen, werden aktiviert und sekretieren eine Reihe von Zytokinen, wie das IL-4, IL-5 und das IL-13. Diese Zytokine führen in B-Zellen zu einem Antikörperklassenwechsel von IgM nach IgE; die IgE-Antikörper können dann an den IgE-Rezeptor der Mastzellen binden. Bei einem erneuten Kontakt mit demselben Allergen wird eine allergische Reaktion eingeleitet. Hierbei wird der zellgebundene IgE-Antikörper durch die Bindung des spezifischen Antigens vernetzt und die Mastzelle aktiviert. Die Folge ist eine Ausschüttung von Histamin, Leukotrienen sowie diversen Zytokinen und Chemokinen. Je nach Menge des Antigens und seinem Eintrittsweg können die Konsequenzen einer IgE-vermittelten Mastzellaktivierung unterschiedlich ausfallen. Die Symptome reichen von lästigen Heuschnupfanfällen bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock. Auf die durch Mastzelldegranulierung hervorgerufene Sofortreaktion folgt eine länger anhaltende

Entzündung, die so genannte Spätreaktion, an welcher Th2-Lymphozyten, Eosinophile sowie Basophile beteiligt sind und zur Aufrechterhaltung der allergischen Reaktion führen [Janeway *et al.*, 2002].

Der Grund für den rasanten Anstieg der Häufigkeiten für allergische Erkrankungen ist nicht geklärt, aber neuere epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass der hohe Hygiene-Standard, insbesondere der der städtischen Bevölkerung, eine zentrale Rolle spielen könnte [Nicolai *et al.*, 1997; Björkstén, 2001; Braun-Fahrländer *et al.*, 2002; Kalliomäki *et al.*, 2003a]. Alle diese Erkenntnisse begründen das Konzept der „Hygiene-Hypothese“, welche 1989 von dem englischen Epidemiologen und Pneumologen David Strachan formuliert wurde. Diese Hypothese besagt, dass eine eingeschränkte Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch Bakterien oder ihre Produkte die Entwicklung atopischer Erkrankungen begünstigt [Strachan, 1989; Yazdanbakhsh *et al.*, 2002; Braun-Fahrländer, 2003].

Die Hygiene-Hypothese ist auch auf dem Hintergrund des Th1/Th2-Konzeptes plausibel. Demnach sind allergische Erkrankungen mit einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts in Richtung einer Th2-Immunantwort assoziiert. Zytokine, welche solch eine Immunantwort charakterisieren, sind IL-4, IL-5 und IL-13. Fehlen spezifische Stimuli, wie Mikroorganismen, in der frühen Kindheit, bleibt das bei Geburt bestehende Th2-Muster dominierend. Sind hingegen immunmodulatorische Stimuli anwesend, kommt es zu einer Verschiebung in Richtung einer Th1-Immunantwort. Auf diesem Hintergrund basiert die Gabe von Pre- und Probiotika, nämlich durch den Einsatz von apathogenen Mikroorganismen das Immunsystem prophylaktisch in Richtung einer Th1-Immunantwort zu beeinflussen.

Ein zentrales Thema vieler aktueller Publikationen ist der Zusammenhang zwischen Mikrobenexposition und Immunsystem und die daraus resultierende Frage, wie es zu einem protektiven Effekt im Hinblick auf die Entstehung allergischer Erkrankungen kommen kann. In diesem Zusammenhang kommt der Darmflora, als quantitativ größter Quelle mikrobieller Stimulation, im Hinblick auf die Entstehung von Allergien, eine entscheidende Bedeutung zu. Denn wie in einer Studie von Björkstén gezeigt werden konnte, weisen Kinder mit atopischen Erkrankungen und Lebensmittelallergien einen höheren Anteil an aeroben Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus* und geringere Anteile an Lactobacillen und Bifidobakterien in ihrer Darmflora auf als Nicht-Atopiker [Björkstén *et al.*, 1999].

Ein paar Jahre später wurde von Riedler und Braun-Fahrländer der Begriff des „Bauernhofeffektes“ geprägt; in ihren Studien konnte die möglicherweise entscheidende Rolle

der Exposition gegenüber bakteriellen Antigenen zur Verringerung des Risikos einer Allergieentstehung aufgezeigt werden. Kinder, die auf traditionellen Bauernhöfen in der Alpenregion aufwuchsen und gleichzeitig in ihrem ersten Lebensjahr häufigen Kontakt zu Stalltieren hatten und unbehandelte Kuhmilch tranken [Riedler *et al.*, 2001], unterschieden sich von der Gruppe der Kinder aus nicht-ländlichem Milieu durch ein deutlich geringeres Risiko, eine atopische Erkrankung zu entwickeln. Das Leben auf dem Land und der Kontakt zu erhöhten Endotoxinkonzentrationen scheinen protektive Faktoren hinsichtlich der Ausbildung allergischer Erkrankungen zu sein [Braun-Fahländer *et al.*, 2002; von Mutius *et al.*, 2000]. Somit wird deutlich, dass anscheinend gewisse Strukturen von Bakterien in der Lage sind, das Immunsystem auf eine spezielle Art und Weise zu modulieren, so dass allergische Reaktionen weniger stark ausfallen oder erst gar nicht entstehen können. Vor diesem Hintergrund scheint der Einsatz von Pro- und Prebiotika vielversprechend zu sein.

1.5 Probiotika

Das Ernährungskonzept „Probiotika“ und deren positiver Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Begriff Probiotika wurde bereits 1965 von Lilly und Stillwell [1965] begründet, aber erst fast 25 Jahre später von Fuller [1989] populär gemacht. Gemäß Definition sind Probiotika apathogene Mikroorganismen, die nach ihrer Einnahme eine gesundheitsfördernde Wirkung zeigen, die über das Maß der grundgegebenen ernährungsphysiologischen Effekte hinausgeht [Meier, 2007]. Um als Probiotika klassifiziert zu werden, müssen Bakterien folgende Anforderungen erfüllen: sie müssen apathogene Keime der intestinalen Flora sein, dürfen bei der Passage des Magen-Darm-Traktes nicht verändert werden und müssen eine hohe Anhaftungsfähigkeit an das Darmepithel aufweisen [Goldin, 1998]. Diese Eigenschaften erhöhen die Verweildauer von lebenden, stoffwechselaktiven probiotischen Keimen im Darm und können zur Verbesserung der intestinalen Barriere-Funktion beitragen. Zusätzlich reduzieren Lactobacillen und Bifidobakterien die Kolonisierung durch enteropathogene Keime [Bernet *et al.*, 1994].

Die am meisten verwendeten und erforschten Probiotika-Spezien sind diverse Laktobacillen, Bifidobakterien, Enterokokken, *Escherichia coli* Nissle 1917, Streptokokken sowie der Hefepilz *Saccharomyces boulardii*. Letzterer wirkt probiotisch, ist als Hefepilz aber gemäss Definition kein wirkliches Probiotikum.

1.5.1 Wirkmechanismen der Probiotika

Probiotika entfalten einen protektiven Effekt unter Bedingungen, in welchen die vorhandene Mikroflora ungenügend oder unausgewogen ausgebildet ist. Voraussetzung für ihre besondere Wirkung ist, dass die Bakterien im sauren Milieu von Magen und Duodenum überleben und unbeschadet in die weiteren Darmabschnitte bis in das Kolon gelangen. Weitere Voraussetzung ist, dass die Bakterien in hohen Keimdichten, mit mindestens 10^8 Zellen/g Darm vorhanden sind. Um eine solche Keimdichte zu erreichen bzw. aufrechtzuerhalten, müssen Probiotika wiederholt verabreicht werden.

Probiotika entfalten ihre Effekte durch eine Senkung des intestinalen pH-Wertes sowie durch eine Reduktion der Anhaftung pathogener Bakterien wie *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* und *Salmonella thyphimurium* an das Darmepithel [Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005]. Sie stimulieren die Phagozytose-Aktivität von Darmzellen und die Bildung von sIgA [Link-Amster *et al.*, 1994; Schiffrin *et al.*, 1995]. Weiterhin beeinflussen sie die Darmbarriere und verhindern die Translokation von Bakterien und Toxinen in das Darmepithel. Ferner können sie die durch pathogene Keime zerstörten intrazellulären Bindungsstellen (tight junctions) reparieren [Resta-Lenert und Barrett, 2003] und modulieren die intestinale Immunantwort.

1.5.2 Einsatz von Probiotika bei Kindern und Erwachsenen

Zur Prophylaxe und Therapie zahlreicher Erkrankungen werden Probiotika heutzutage in großer Zahl zum generellen Verzehr, meist in Form von Milchprodukten, wie Joghurt und Milchdrinks, angeboten.

Die Liste der intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen, die möglicherweise mit Probiotika behandelt oder verhindert werden können, ist in den letzten Jahren kontinuierlich länger geworden. Für ausgewählte Bakterienstämme ist deren Effektivität von Probiotika zur Behandlung bestimmter Krankheitsbilder genau untersucht worden. Bei den klinisch getesteten probiotischen Bakterienstämmen handelt es sich hauptsächlich um Lactobacillen und Bifidobakterien, wie z.B. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* oder *Bifidobacterium breve*. Sie eignen sich besonders gut für den Einsatz als Probiotika bei Säuglingen und Kleinkindern, stammen bevorzugt aus dem menschlichen Darm und haben die Fähigkeit, die Magen-Darm-Passage zu überleben. Außerdem eignen sie sich besonders

gut für die industrielle Verarbeitung, weil sie während des Produktionsprozesses stabil bleiben und sich durch eine gute Lagerbeständigkeit auszeichnen.

Die Anfälligkeit für Nahrungsmittelallergien ist im Kindesalter bis zu zwei Jahren am größten, wobei ein Zusammenhang zur spärlich entwickelten, kindlichen Mikroflora vermutet wird.

Um den allergiepräventiven Effekt von Probiotika zu verdeutlichen, soll hier auf eine Studie von Kalliomäki [2001b und 2003b] verwiesen werden, in welcher bei Hochrisikokindern für atopische Dermatitis, auch noch vier Jahre nach Probiotika-Gabe, eine Reduktion dieser Erkrankung um 50%, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erzielt wurde. Die angehende Mutter bekam vier Wochen vor der Geburt LGG in einer Konzentration von 1×10^{10} cfu/Tag bzw. das Placebo verabreicht. In der Zeit nach der Geburt erhielt entweder die stillende Mutter oder das Neugeborene sechs Monate lang das LGG bzw. bekam das Placebo verabreicht. Nach zwei Jahren ergab die Untersuchung eine deutlich geringere Manifestation einer atopischen Dermatitis in der LGG-Gruppe. Hier wiesen lediglich 23% der Kinder klinische Symptome dieser Erkrankung auf (16 von 64 Kindern); in der Placebo-Gruppe waren es 46%. Dieser präventive Effekt war auch über einen Zeitraum von vier Jahren stabil [Kalliomäki *et al.*, 2003b]. Zu diesem Zeitpunkt hatten 26,4% der Kinder in der LGG-Gruppe und 46,3% in der Placebo-Gruppe eine atopische Dermatitis entwickelt. Im Schweregrad der atopischen Dermatitis waren jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Mittlerweile wurden die Ergebnisse dieser Studie in Frage gestellt, da nach einer Behandlung mit LGG bei Neugeborenen kein Unterschied in der Entwicklung der atopischen Dermatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte [Fölster-Holst *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2008; Kopp und Salfeld, 2009]. Somit müssen weiterführende Arbeiten klären, ob die Gabe von Probiotika, im speziellen eine Supplementierung mit LGG, für die Prävention der atopischen Dermatitis empfohlen werden kann.

Vor dem Hintergrund einer ständig wachsenden Zahl an Publikationen fällt jedoch auf, dass es viele weitere Studien gibt, die bezüglich ihres präventiven Probiotika-Einsatzes nicht so optimistisch verlaufen sind. Das liegt daran, dass solche Ergebnisse nur unter bestimmten Bedingungen zu erzielen sind. Das kann am Einsatz anderer Probiotikastämme, einer Kombination an unterschiedlichen Probiotikastämmen oder anderer Form der Bakterieninaktivierung liegen. So sollten aber auch das experimentelle Studiendesign, der Probandenumfang, die Häufigkeit und Dauer der Probiotika-Gabe oder der

Gesundheitszustand der beteiligten Probanden einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

In einer Studie von Majamaa und Isolauri [1997] haben Säuglinge, über eine Dauer von einem Monat, zusätzlich zu ihren Muttermilchersatzprodukten LGG (5×10^8 cfu/g) bzw. Placebo verabreicht bekommen. In der LGG-Gruppe konnte zwar ein signifikanter Rückgang des Schweregrades der atopischen Dermatitis im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt werden, dieser Unterschied hatte jedoch nach zwei Monaten keinen Bestand mehr. Dieser nur kurz anhaltende Effekt zeigte sich auch in einer weiteren Studie von Isolauri [2000]. Hier wurden die Muttermilchersatzprodukte neben LGG auch jeweils mit *Bifidobacterium lactis* supplementiert. Der signifikante Unterschied in den beiden Probiotikagruppen zur Placebogruppe war anhand des Schweregrades der Erkrankung sichtbar, hatte aber nach sechs Monaten ebenfalls keinen Bestand mehr.

Weiterhin wurde LGG in zahlreichen klinischen Studien zur Behandlung und Prävention der akuten infektiösen Diarrhoe bei Kleinkindern getestet. Nach einer im Jahr 2001 publizierten Studie [Szajewska und Mrukowicz, 2001] zeigte ausschließlich LGG im Gegensatz zu mehreren untersuchten probiotischen Stämmen, wie *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus* einen deutlichen Vorteil gegenüber Placebo. LGG senkte die Dauer der Erkrankung und reduzierte die Wahrscheinlichkeit einer längeren, mehr als drei Tage anhaltenden Diarrhoe um mehr als die Hälfte. In einer Metaanalyse von Huang *et al.*, [2002] konnten diese Daten bestätigt werden. In einer weiteren Metaanalyse von Van Niel *et al.*, [2002] wurde erneut bestätigt, dass eine Therapie mit LGG zur Behandlung von akuten infektiösen Diarrhoen bei Kindern sicher und wirksam ist. Zur Prävention Antibiotika-assoziiertes Diarrhoen wurden ebenfalls umfassende Studien durchgeführt [Vanderhoof *et al.*, 1999]. In einer weiteren Studie von Szajewska *et al.* [2006] wurde die Wirksamkeit einer begleitenden Aufnahme von Probiotika bei Kindern unter Antibiotikatherapie untersucht. Auch bei dieser Form der Diarrhoe ließ sich durch diese Maßnahme die Häufigkeit der Erkrankung auf weniger als die Hälfte reduzieren (von 28,5% auf 11,9%); so konnte jeder siebte Erkrankungsfall vermieden werden.

Im Gegensatz zu Säuglingen ist die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora eines Erwachsenen stabil. Sie kann allerdings durch den heutigen Lebensstil, gekennzeichnet von Stress, Unregelmäßigkeiten in der Ernährung oder durch die Einnahme von Antibiotika und anderen Medikamenten beeinflusst werden [Tannock, 1983]. Stresszustände zeigen einen

deutlichen Rückgang der Bifido- und Laktobacillenflora [Unger, 1999]. Regelmäßig verabreichte Probiotika wirken dem schädlichen Effekt von Antibiotika auf die Darmflora entgegen.

1.6 Prebiotika

Prebiotika bilden neben den Probiotika die zweite große Gruppe der funktionellen Lebensmittel. Mit dem Einsatz der probiotischen Mikroorganismen werden direkt gesundheitsfördernde Effekte erzielt; parallel wird mittels Prebiotika versucht, indirekt über eine Verbesserung der Wachstumsbedingungen probiotischer Keime, das gleiche Ziel zu erreichen [Kasper, 2001].

Der Begriff Prebiotika wurde 1995 von den beiden Wissenschaftlern Gibson und Roberfroid [1995] eingeführt; nach ihrer Definition handelt es sich bei den Prebiotika um unverdauliche Ballaststoffe der Nahrung, die den Gastrointestinaltrakt unverändert erreichen und selektiv das Wachstum gesundheitsfördernder Bakterien, wie Bifidusbakterien, im Darm stimulieren [Roberfroid, 2007]. Zu den Prebiotika gehören Oligosaccharide wie Fructo-Oligosaccharide (FOS) oder Galacto-Oligosaccharide (GOS) [Boehm *et al.*, 2004]. Natürlicherweise kommen sie in einer Vielzahl von Obst- und Gemüsesorten wie z.B. Chicoree, Zwiebel, Lauch, Knoblauch, Spargel, Weizen und Gerste vor [Broussard und Surawicz, 2004].

Um als Prebiotika klassifiziert und definiert zu werden, dürfen diese im Magen bzw. im Dünndarm nicht verdaut werden, müssen selektiv für das Wachstum der Bifidusbakterien von Nutzen sein und müssen zur Bildung von wichtigen Endprodukten beitragen [Gibson, 2004]. Aufgrund ihrer positiven Auswirkungen auf die Mikroflora des Darmes finden sich Prebiotika zunehmend auch als Zusatz in der Säuglingsnahrung wieder. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass derartig angereicherte Säuglingsnahrung vergleichbare positive Auswirkungen auf die Darmflora des Säuglings hat wie Muttermilch [Boehm *et al.*, 2003a; Knol *et al.*, 2003; Moro *et al.*, 2002]. Möglicherweise können sie folglich auch anti-allergische Prozesse in Gang setzen und eine Schlüsselrolle in der Prävention atopischer Erkrankungen einnehmen [Miniello *et al.*, 2003].

1.6.1 Prebiotika in der Säuglingsnahrung

Zahlreiche aktuelle Studien belegen, dass das Immunsystem für eine gesunde Entwicklung des Säuglings wichtig ist. Diese werden mit einem noch nicht ganz ausgereiften Immunsystem geboren und benötigen einen speziellen Schutz. Faktoren in der Muttermilch können diesen speziellen Schutz bieten. Denn nach wie vor ist und bleibt Muttermilch das Nahrungsmittel der ersten Wahl für die Ernährung des Neugeborenen; die dort enthaltenen Nährstoffe sind optimal für ihre gesunde Entwicklung [Matentzoglou und Müller, 2004]. Dazu zählt die Ausbildung einer gesunden Darmflora und eines funktionstüchtigen Immunsystems, das den Säugling vor Infektionen und Allergien schützt. Diese positiven Wirkungen führen dazu, dass Muttermilch eine Art „Modellfunktion“ für industriell hergestellte Säuglingsnahrung ausübt. Da Muttermilch eine äußerst komplexe Zusammensetzung hat und aus mehreren hundert verschiedenen Oligosacchariden und vielen weiteren Inhaltsstoffen besteht [Boehm und Stahl, 2003c], ist es nahezu unmöglich, sie umfassend zu kopieren; dennoch wird versucht den Gehalt an Proteinen, Fetten, Kohlenhydraten, Mineralstoffen und Vitaminen so weit wie möglich anzugleichen. Eine vergleichbare Besiedlung des Darms von gestillten und flaschenernährten Säuglingen soll hiermit erreicht werden.

Eine entscheidende Rolle spielen die eben erwähnten humanen Milch-Oligosaccharide (Human Milk Oligosaccharides, HMOS). Bereits in den 50er Jahren fand Paul György heraus, dass diese in der Lage sind, das Wachstum der Bifidusbakterien zu fördern und für die Dominanz dieser Bakterien in der Darmflora gestillter Säuglinge verantwortlich sind [György *et al.*, 1954; Engfer *et al.*, 2000; Gnoth *et al.*, 2000]; daher macht es Sinn, diesen funktionellen Aspekt der HMOS zu erforschen.

Bislang enthält herkömmliche käufliche Säuglingsnahrung keine bzw. kaum Oligosaccharide [Schmelzle *et al.*, 2003; Coppa *et al.*, 2004], da diese in der Kuhmilch, die als Grundlage für die Säuglingsnahrung fungiert, nicht vorkommen. Somit weisen flaschenernährte Säuglinge deutlich weniger Bifidusbakterien in ihrer Mikroflora auf. Während der prozentuale Anteil der Bifidus-Stämme dieser flaschenernährten Kinder nach der ersten Lebenswoche nur etwa 70% ausmacht, beträgt der Anteil der Bifidusbakterien eines gestillten Säuglings 95% [Yoshioka *et al.*, 1983; Scholtens *et al.*, 2003]. Während diese Mikroflora als bifidusdominante Flora bezeichnet wird, besitzen flaschenernährte Säuglinge, aufgrund vieler anderer vorkommender Stämme, wie z.B. Clostridien, Staphylokokken und Bacteroides, eine gemischte Darmflora [Harmsen *et al.*, 2000; Kullen *et al.*, 2005]. Diese Beobachtung führte

zu der Überlegung, durch den Zusatz von Prebiotika zur Säuglingsnahrung, die Zusammensetzung der Darmflora zugunsten einer bifidusdominanten Mikroflora zu verbessern; mittlerweile zählt die spezifische Mischung aus kurzkettigen GOS und langkettigen FOS zu den anerkannten Oligosacchariden mit prebiotischer Wirkung [Roberfroid, 2007].

1.6.2 Humane-Milch-Oligosaccharide (HMOS)

HMOS bilden neben Laktose und den Lipiden die drittgrößte Komponente der Muttermilch [Newburg, 1996; Picciano, 2001]. Die höchste Konzentration mit mehr als 20g/l erreichen sie im Colostrum, der allerersten Milch einer stillenden Mutter; der Gehalt fällt nach etwa zwei Wochen auf einen Wert von 12-14g/l ab [Coppa *et al.*, 1993]. Die abnehmende HMOS-Konzentration wird durch die im gleichen Zeitraum steigende Laktose-Konzentration wieder ausgeglichen [Coppa *et al.*, 1999].

Die einzelnen Komponenten der HMOS sind D-Glucose, D-Galactose, N-Acetylglucosamin, L-Fucose und Sialinsäure, welche durch unterschiedliche Zusammensetzung und Bindung 130 verschiedene Oligosaccharide bilden können [Sabharwal *et al.*, 1991].

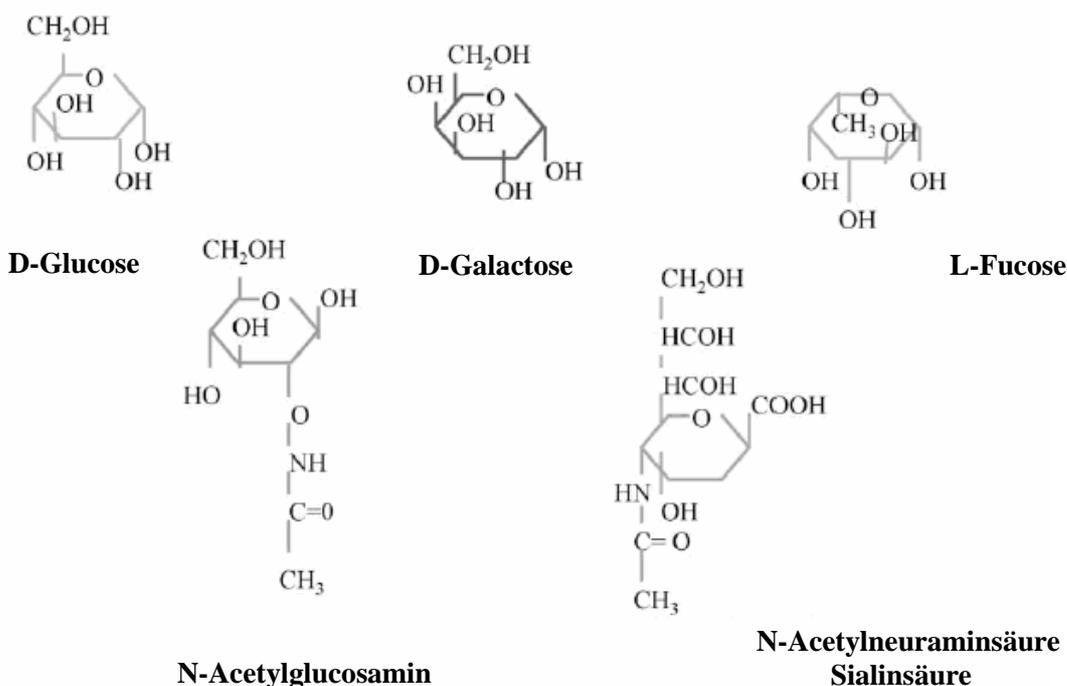


Abb. 3 : Die einzelnen Komponenten der HMOS [nach Rivero-Urgell *et al.*, 2001]

Aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Komponenten der HMOS untereinander durch β -Bindungen verknüpft sind und der Körper nicht über spezifische Enzyme zur Spaltung dieser Bindungen verfügt, werden die Oligosaccharide durch die Enzyme des Darmtraktes nicht verdaut und erreichen so den Dickdarm [Hidaka *et al.*, 1991]. Dies gilt ebenfalls für die sehr spezifischen alpha-glycosidischen Bindungen der Fucose und Sialinsäure an die Kernstrukturen [Kitaoka *et al.*, 2005; LoCascio *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2008]. Hier werden sie durch Bakterien der Darmflora, insbesondere Bifidusbakterien und Lactobacillen, fermentiert und fördern somit, in ihrer Eigenschaft als Prebiotika, d.h. als Substrat, das Wachstum der Bakterien [Hosoya *et al.*, 1988; Engfer *et al.*, 2000].

1.6.3 Wirkung der Prebiotika

Die Hauptfunktion der Prebiotika ist das Wachstum gesundheitsfördernder Bakterien, wie Bifidusbakterien und Lactobacillen, im Darm zu erhöhen; folglich ist eine Reihe von positiven Effekten zu beobachten:

Milchsäurebakterien sind in der Lage die prebiotischen Fasern zu fermentieren und diese zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) wie Acetat, Butyrat, Lactat und Propionat abzubauen [Miller *et al.*, 1996]. Diese erhöhen den osmotischen Gradienten im Kolon und steigern somit den Wassergehalt des Koloninhaltes. Die Folge ist ein gesteigertes Stuhlgewicht und eine weichere Stuhlkonsistenz [Moro *et al.*, 2002; Boehm *et al.*, 2002; Schmelzle *et al.*, 2003], was für Säuglinge von großer Bedeutung ist. Werden diese mit Muttermilchersatzprodukten gefüttert, welche spezifische Oligosaccharide als Zusatz enthalten, ergibt sich eine positive Auswirkung auf ihre Stuhlkonsistenz.

Weiterhin wird den kurzkettigen Fettsäuren eine trophische Wirkung auf die Darmmukosa zugeschrieben, d.h. dass sie von den Darmzellen als zusätzliche Energiequelle genutzt werden können; folglich können etwa 70% der Energie über diesen Mechanismus gewonnen werden [Cummings, 1983]. Während das Butyrat als Energielieferant für den Darm von großer Bedeutung zu sein scheint, wird das Acetat von Gehirn, Herz und den peripheren Geweben und das Propionat vor allem von der Leber verstoffwechselt.

Der Anteil an diesen kurzkettigen Fettsäuren im Stuhl ist abhängig von der Art der Säuglingsernährung; folglich zeigen gestillte Säuglinge höhere Mengen an kurzkettigen Fettsäuren als flaschenernährte Säuglinge [Mountzouris *et al.*, 2002]. Bifidusbakterien sind

dafür bekannt, dass sie hohe Mengen an Acetat bilden, was wiederum die hohe Menge an Acetat bei gestillten Säuglingen, im Vergleich zu flaschenernährten Säuglingen, erklärt. Siigur *et al.* [1993] haben gezeigt, dass eine Assoziation von geringen Acetat-Mengen mit Durchfallerkrankungen und Atemwegsentzündungen bei Säuglingen besteht.

Eine weitere wichtige Wirkung der Prebiotika ist die Fähigkeit zur Absenkung des pH-Wertes im Darm durch die Bildung von Säuren. Der pH-Wert ist ein wichtiger Faktor, der darüber entscheidet, welche Spezies sich in der Darmflora ansiedeln können. Die Schaffung eines sauren Milieus [Moro *et al.*, 2002] wird als ein wesentlicher Mechanismus angesehen, das Wachstum pathogener Bakterien wie *Shigella*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* und Clostridien zu hemmen. Die absolute Anzahl bzw. der Gesamtanteil der „pathogenen“ Bakterien an der intestinalen Mikroflora verringert sich somit [Boehm *et al.*, 2003b; Knol *et al.*, 2003] und die Folge ist ein Bakterien-Verteilungsmuster, welches der Darmflora gestillter Säuglinge sehr nahe kommt [Knol *et al.*, 2002].

Als Folge des niedrigen Stuhl-pHs wird die Löslichkeit von Mineralstoffen und Spurenelementen wie Kalzium und Magnesium erhöht. In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass auf diese Weise die Kalziumabsorption verbessert werden konnte [Van den Heuvel *et al.*, 1999]; somit werden positive Effekte auf den Knochenstoffwechsel ausgeübt [Scholz-Ahrens *et al.*, 2002].

1.7 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Immunantwort. Sie können effizient Antigene aufnehmen, diese verarbeiten und in einer von T-Zellen erkennbaren Form auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dadurch können naive T-Zellen, die den entsprechenden antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Diese immunstimulierenden Eigenschaften der DCs werden gezielt therapeutisch eingesetzt und sind zurzeit Ziel unterschiedlicher Forschungsaktivitäten.

Bei der Antigenpräsentation nehmen DCs eine Schlüsselrolle ein, welche sie von den anderen APCs, wie Makrophagen und B-Zellen, eindeutig unterscheidet. Sie verfügen über das

Potenzial zur hocheffizienten Stimulierung naiver T-Zellen. Diese Funktion besitzen Makrophagen und B-Zellen nicht oder nur begrenzt; sie können lediglich bereits aktivierte T-Zellen effizient stimulieren [Stagg *et al.*, 2004].

DC-Vorläufer entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, welche zunächst im Blut zirkulieren und dann in die peripheren Gewebe einwandern [Banchereau *et al.*, 1998]; hier entwickeln sie sich zu immaturren DCs (iDCs). Diese iDCs zeichnen sich durch ihre endozytotische und phagozytotische Aktivität aus und sind somit in der Lage, über eine Vielzahl von Rezeptoren, wie z.B. Komplement- und Fc-Rezeptoren, Pathogene aufzunehmen. Die Pathogenerkennung geschieht auch über die Erkennung hoch konservierter molekularer Strukturen, welche für viele Mikroorganismen spezifisch sind. Dies sind sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs), die über Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR) auf APCs identifiziert werden. Die Toll-like Rezeptoren (TLR) [Iwasaki and Medzhitov, 2004] gehören zu den am besten analysierten PRRs. Das Lipopolysaccharid (LPS), die Zellwandkomponente Gram-negativer Bakterien, die Lipoteichonsäure, Mannane und Glykane gehören zu den PAMPs, welche von den APCs erkannt werden können. Im Gegensatz zu maturaen DCs besitzen iDCs nur wenige MHC-Moleküle [Mommaas *et al.*, 1995] und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf ihrer Zelloberfläche [Lee *et al.*, 1993]; damit fehlt ihnen zunächst das notwendige Rüstzeug um naive T-Zellen zu stimulieren. Weiterhin verfügen immature DCs über Rezeptoren für die Chemokine CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6. Bei Bindung von Chemokinen an diese Rezeptoren wandern sie zum Endzündungsherd; hier wird die Reifung von DCs induziert.

Kommt eine DC mit einem Erreger in Kontakt, erhält sie einen Reifungsstimulus und wandert zu den sekundären lymphoiden Organen, wie Milz und Lymphknoten aus, um den dort zirkulierenden T-Zellen das aufgenommene Material zu präsentieren. Hier spielt die Expression des Rezeptors für das Chemokin CCR7 eine große Rolle. Mit Hilfe dieses Rezeptors wandern die DCs in die T-Zell-Bereiche der Lymphknoten.

Das aufgenommene Material der DCs wird zuerst prozessiert und die daraus hervorgehenden Peptide werden als MHC-Peptid-Komplex auf ihrer Oberfläche präsentiert. Bei der Reifung wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen in hohem Maße induziert [Banchereau *et al.*, 1998]. Nach der Aktivierung verlieren DCs schnell ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen und zu prozessieren [Randolph, 2001]. Reife DCs weisen einen vollkommen anderen Phänotyp auf als unreife DCs. Als charakteristischstes Merkmal

zeichnen sie sich durch zahlreiche Ausläufer der Plasmamembran aus. Diese werden als Dendriten bezeichnet und verleihen ihnen ein igelförmiges Aussehen [Steinmann und Cohn, 1973]. Ross *et al.* [1998] konnten zeigen, dass das Aktinbündelungsprotein Fascin, das in iDCs nicht produziert wird, bei der Ausbildung dieser Dendriten eine zentrale Rolle spielt. Ein weiteres Charakteristikum reifer DCs ist die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie MHC-, und kostimulatorischen Molekülen [Ruedl *et al.*, 2000], wie CD40 [Inaba *et al.*, 1994], CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) [Chang *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1993]. Diese Moleküle sind für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen notwendig.

Eine Aktivierung der DCs kann sowohl durch den Erreger selbst, als auch über bereits aktivierte Zellen des Immunsystems erfolgen. Im ersten Fall geschieht eine Aktivierung oftmals über TLRs. Mittlerweile sind dreizehn Mitglieder der TLR-Familie identifiziert worden; der am besten untersuchte Rezeptor ist dabei TLR-4, der in der Lage ist, LPS zu binden [Medzhitov and Janeway; 1997]. Während TLR 1, 2, 4, 5 und 6 sich in der äußeren Plasmamembran befinden, sind TLR 3, 7, 8 und 9 in intrazellulären Membransystemen anzutreffen und ragen mit ihrer Rezeptordomäne in das Cytosol. Eine Aktivierung der TLRs führt in den DCs zur Aktivierung der intrazellulären Adapterproteine MyD88 und TRIF. Nach weiteren Schritten kommt es schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB [Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1999] und zur Synthese und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und TNF [Reis e Sousa, 2004]. Alternativ zu TLRs können DCs über CD40L, einem Molekül der TNF-Rezeptor-Familie, aktiviert werden [Caux *et al.*, 1994]. Der Ligand wird von bereits aktivierten T-Zellen exprimiert und führt, über eine MAP-Kinase-Kaskade, ebenfalls zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-12 sowie IL-6 [Quezada *et al.*, 2004].

Ob der Kontakt von T-Zellen mit DCs eine Aktivierung und daraus resultierend eine Proliferation der T-Zellen hervorruft, hängt von zwei unabhängigen Signalen ab. Ein Signal resultiert aus der Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit den MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche der DCs, das zweite Signal stellt die Ligation von kostimulatorischen Molekülen wie CD28 auf den T-Zellen mit CD80 und CD86 dar. Ist das zweite Signal abwesend oder nur unvollständig vorhanden, proliferieren die T-Zellen nicht und kommen in den Zustand der Anergie [Parkin *et al.*, 2001].

1.8 Tolerogene dendritische Zellen

DCs spielen nicht nur bei der Induktion von primären Immunantworten, sondern auch bei der Toleranzinduktion eine wichtige Rolle, da sie neben der T-Zell-Anergie auch regulatorische T-Zellen (Tregs) induzieren können. Insbesondere iDCs weisen einen tolerogenen Status auf und sind in der Lage, T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften zu induzieren [Jonuleit *et al.*, 2000]. Tolerogene DCs können jedoch auch mit Hilfe von immunmodulatorischen Stimuli induziert werden; hierbei wurden IL-10 und TGF- β am intensivsten untersucht [Steinbrink *et al.*, 1997; de Waal *et al.*, 1992]. Das IL-10 ist in der Lage, eine terminale Differenzierung unreifer DCs zu voll-ausgereiften DCs zu inhibieren [Steinbrink *et al.*, 1997]; die Folge ist die Induktion der T-Zell-Toleranz. Somit wird nicht nur die Ausreifung der DCs, sondern auch die Aktivität von NF- κ B-Transkriptionsfaktoren und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-12, beeinträchtigt. Weiterhin wird die Expression von Molekülen mit koinhibitorischer Funktion induziert, zu welchen die inhibitorischen Rezeptoren ILT2 (immunoglobulin-like transcript, ILT), ILT3 und ILT4 gehören [Suciu-Foca *et al.*, 2005]. Nach Befunden von Lutz und Schuler [2002] sind auch sogenannte semi-mature DCs tolerogen. Diese stammen von Kulturen von DC-Vorläufern, welche mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α (tumor necrosis factor, TNF) supplementiert wurden. Im Vergleich zu iDCs zeichnen sie sich durch eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86, auf ihrer Oberfläche aus. Ein weiteres Merkmal ist eine erhöhte Sekretion des Zytokins IL-10, sowie eine fehlende Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-12. Sie verfügen nicht über die Fähigkeit zur Produktion polarisierender Signale, induzieren aber Tregs.

Auch der Einsatz von Glukokortikoiden kann tolerogene DCs induzieren. Zu den Glukokortikoiden gehören z.B. das Dexamethason [Bros *et al.*, 2007] oder das Vitamin D₃. Glukokortikoide sind von der Nebennierenrinde sezernierte Kortikosteroidhormone, die den Glukosestoffwechsel und die Immunfunktion beeinflussen. In zahlreichen Studien mit Pro- und Prebiotika [Zeuthen *et al.*, 2006; Veckman *et al.*, 2004] konnte ebenfalls die Generierung tolerogener DCs beobachtet werden.

1.9 Regulatorische T-Zellen

Neben den konventionellen T-Zellen, die nach ihrer Aktivierung eine Immunantwort auslösen, gibt es T-Suppressorzellen oder regulatorische T-Zellen. Diese sind in der Lage, nach ihrer Aktivierung, konventionelle T-Zellen zu hemmen und folglich eine Immunantwort zu verhindern. Diese Tregs spielen eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz [Suciu-Foca *et al.*, 2005].

Mehrere Subtypen von Tregs sind bisher identifiziert und beschrieben worden; eine Modulation der Aktivierung und Funktion von Th1 und Th2 sowie CD8⁺ Effektorzellen ist ihnen gemeinsam. Die wohl bekanntesten und am besten charakterisierten Tregs sind die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (nTregs), die erstmals 1995 von Sakaguchi [1995] beschrieben wurden. Diese stammen aus dem Thymus und nutzen einen Zellkontakt-abhängigen, IL-10- und TGF- β -unabhängigen Suppressionsmechanismus [Sakaguchi, 2000; Shevach, 2002]. Während in Mäusen 5-10% aller CD4⁺ T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp aufweisen, umfasst die Population der humanen natürlichen Tregs lediglich 1-2% [Baecher-Allan *et al.*, 2001]. Die natürlichen Tregs sind von den peripher induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) zu unterscheiden; diese entwickeln sich in der Peripherie und führen ihre suppressive Funktion nicht Zellkontakt-abhängig, sondern über die Sekretion inhibitorischer Zytokine aus. Hier sind Tr1- und Th3-Zellen zu unterscheiden. Während die Th3-Zellen das Zytokin TGF- β (transforming growth factor- β) sekretieren und eine zentrale Funktion in der oralen Toleranz übernehmen [Chen *et al.*, 1994], lassen sich Tr1-Zellen über hohe Produktionsraten des Zytokins IL-10, jedoch ohne eine simultane IL-4-Sekretion [Barrat *et al.*, 2002], charakterisieren.

Tregs zeichnen sich durch ein einheitliches Expressionsprofil, bestehend aus der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), des GITR (Glucocorticoid-induzierter Tumor Nekrose Faktor Rezeptor) und des CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4; CD152), aus. Ihr eindeutigster Marker ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead Box P3), der in Mäusen von einem Großteil von Tregs exprimiert wird und deren Entwicklung und Funktion kontrolliert [Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003]. Im humanen System ist die Expression von Foxp3 nicht nur auf CD4-positive Tregs beschränkt, sondern kann ebenfalls auf aktivierten T-Effektorzellen beobachtet werden. Dabei ist die Expression jedoch transient und

erreicht bei weitem nicht ein so hohes Expressionsniveau verglichen mit Tregs [Bacchetta *et al.*, 2007].

Die suppressive Aktivität der Tregs erfordert zwar eine Ausgangsaktivierung über den TCR, einmal aktiviert sind diese jedoch in der Lage, auf eine nicht-antigen-spezifische Art und Weise zu supprimieren. Diese Suppression wird als „Bystander Suppression“ bezeichnet. Neben T-Effektorzellen können Tregs auch APCs in ihrer Funktion verändern. Diese verlieren ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation oder werden zur Sekretion von suppressiven Zytokinen veranlasst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Tregs die Expression des immunsuppressiven Enzyms Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) erhöhen können [Mellor und Munn, 2004]; diese IDO-Induktion scheint von dem inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 auf Tregs abhängig zu sein [Puccetti und Grohmann, 2007].

Zu den bereits erwähnten iTregs zählen neben den Th3-Zellen, die Tr1-Zellen. Letztere sind induzierte CD4⁺ regulatorische T-Zellen, welche durch die Sekretion des Zytokins IL-10 ihre Zielzellen supprimieren können. Wie oftmals gezeigt, handelt es sich beim IL-10 um ein potentes immunmodulatorisches Zytokin [Moore *et al.*, 2001; Levings *et al.*, 2002]. In den IL-10-Mechanismus sind sowohl T-Zellen als auch APCs involviert. Eine IL-10-Behandlung von DCs resultiert in einer Herunterregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, wie auch der MHC-II-Moleküle, und führt folglich zur verminderten T-Zell-Aktivierung [Steinbrink *et al.*, 2002]. IL-10 kann aber auch einen direkten Einfluss auf T-Zellen ausüben und führt zur Ausbildung einer Anergie [Jonuleit *et al.*, 2000]. Wenn diese durch IL-10 anergisierten T-Zellen aktiviert werden, verfügen sie über ein bestimmtes Zytokinprofil; sie sekretieren viel IL-10 und TGF- β , wenig IFN- γ und kein IL-2 oder IL-4 [Levings *et al.*, 2002; Groux *et al.*, 1997]. Dabei üben sie eine suppressive Funktion aus.

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Reihe von Pathogenen, die für ihn potenziell schädlich sein könnten, zu schützen; gleichzeitig ist es aber von physiologischer Bedeutung, dass gegenüber Nahrungsmittelantigenen eine Toleranz induziert und aufrechterhalten wird. Hier spricht man von oraler Toleranz. Diese kann für eine Vielzahl von löslichen Antigenen induziert werden, jedoch nicht für lebende Pathogene [Weiner *et al.*, 1994]. Bei der oral-induzierten Toleranz übernehmen die T-Lymphozyten eine zentrale Funktion. Speziell die Th3-Zellen, welche neben den Tr1-Zellen, die zweite T-Zell-Subklasse bilden, zeigen eine gesteigerte Ausschüttung des supprimierenden Zytokins. Diese sekretieren das Zytokin TGF- β und werden nur nach oraler, nicht nach systemischer Gabe des Antigens

generiert [Fukaura *et al.*, 1996]. Ihre suppressiven Effekte richten sich gegen Th1-Zellen und andere Immunzellen. Durch die Tatsache, dass die TGF- β -Expression nicht mit der IL-4 oder IL-10 Expression korreliert, unterscheiden sie sich von den klassischen Th2-Zellen [Weiner, 2001].

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluss von Pre- und Probiotika hinsichtlich ihres Effektes auf den Phänotyp und die Funktion von DCs zu analysieren. Als Modellsystem für *in vitro* Untersuchungen wurden hierzu DCs aus Vorläuferzellen im Knochenmark (BM, bone-marrow; BM-DCs) von Mäusen generiert. Die Präparation und Kultivierung erfolgte dabei nach der Standardmethode von Scheicher *et al.* [1992], welche von Lutz *et al.* [1999] modifiziert wurde.

Im ersten Teil der Arbeit wurden, in Kooperation mit Dr. Bernd Stahl, Danone Research - Centre for Specialised Nutrition, Friedrichsdorf, drei verschiedene prebiotische Oligosaccharide analysiert. Hierbei handelte es sich um folgende:

- Galakto-Oligosaccharide / Frukto-Oligosaccharide (scGOS/lcFOS)
- Saure Oligosaccharide (pAOS)
- Mischung Neutraler Humanmilch-analoger Oligosaccharide mit Neo-Struktur (NOS)

Dem zweiten Abschnitt dieser Arbeit lagen probiotische Bakterien, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Knut Heller und Prof. Dr. Jürgen Schrezenmeir, Max-Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Kiel, zur Verfügung gestellt wurden, zugrunde:

- *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)
- *Lactobacillus fermentum* (LF)

Bei beiden Ansätzen stellte sich die Frage, ob unreife bzw. mit dem Stimulus LPS ausgereifte BM-DCs, durch den Kontakt mit den Pre- und Probiotika, in ihren Eigenschaften modifiziert werden können; als Kontrollen wurden stets unbehandelte Kulturen mitgeführt und in Relation zu den behandelten BM-DCs gesetzt. Mit Hilfe der FACS-Analyse sollte die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie von

MHC-Klasse-II-Molekülen untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte auch auf die eventuelle Induktion tolerogener DCs gelegt werden; in diesem Zusammenhang sollte die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 analysiert werden. Weiterhin sollte mittels einer gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte reaction, MLR) die Fähigkeit der behandelten BM-DCs zur T-Zellaktivierung ermittelt werden. Im Falle einer Hypoproliferation sollten die dabei generierten T-Zellen detailliert charakterisiert und auf eine eventuelle Induktion von regulatorischen T-Zellen untersucht werden; hierbei sollte die Expression des für Tregs charakteristischen Transkriptionsfaktors FoxP3 bestimmt werden. Parallel hierzu sollte ihre Restimulierbarkeit untersucht werden, da dies ebenfalls ein Indiz für die Induktion von Tregs sein könnte.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	Precisa 120A	Otto Mild Waagen, Karlsruhe
Autoklav	Systec V150	Systec GmbH, Wettenberg
Bestrahlungsgerät	Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Riso, Dänemark
Brutschrank	Heraeus KB 600	Heraeus, Hanau
	CB 150	Binder, Tuttlingen
Digitalwaage	Basic Typ 1202	Sartorius, München
Dispenser	Multipette® 4780	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACScan	BD, Heidelberg
ELISA-Waschgerät	Ultrawash plus	Dynex, Chantilly, USA
Folien-Einschweiß-Gerät	Heat Sealer 1295-012	Audion Elektro, Kleve
iCycler IQ®	Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Magnetrührer	IKAMAG® REO	Janke & Kunkel, Staufen
Mehrkanalpipette	Finnpette, 12-Kanalpipette, 50-300 µl	Finnpette, Helsinki, Finnland
	Finpipette, 8-Kanalpipette 30-300 µl	Thermo Scientific, Schwerte
Mikroskope	Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
	Mikroskop CH2	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	--	Severin, Sundern

Gerät	Modell	Hersteller
pH-Meter	WTW pH 538	Labotec, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf-Pipetten: 1-10 μ l, 10-100 μ l, 200-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Finnpette: 5-40 μ l Finnpette: 40-200 μ l	Finnpette, Helsinki, Finnland
Pipettierhilfe	Pipetboy	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Präparierbesteck	--	Hammacher, Solingen
Spektrophotometer	Ultrospec [®] 1100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilwerkbank	Lamin Air [®] HB 2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank	BT 40	L'air liquid, Wiesbaden
Szintillationszähler	1205 Betaplate	LKB Wallac, Freiburg
Thermocycler	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Vortexer	Vortex Genie 2 [™]	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Typ 12219 Multitemp II	LKB Bromma
	Haake GH/D8	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Laboratory Counter	BD, Heidelberg
Zählkammer	Neubauer Improved Bright Line; 0,1 mm	AO, Buffalo, USA
Zellerntegerät	1205-001 Cell Harvester	LKB Wallac, Freiburg

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge	Sorvall RT 6000D	Du Pont, Bad Homburg
	Biofuge primo	Heraeus, Hanau
	Multifuge 1 L-R	Thermo Scientific, Schwerte

2.1.2 Labor - und Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Alufolie	30 u-Qualität	Roth, Karlsruhe
Bakteriologische Petrischalen	Ø 94 mm, Höhe 16 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmal-Feindosierungsspritzen	Omnifix [®] - F 1 ml	B. Braun, Melsungen
	BD Discardit [™] II, 10 ml, 20 ml	BD, Heidelberg
Einmal-Heparin-Kanüle	Sterican: Ø 0,5 x 16 mm	B. Braun, Melsungen
	Sterican: Ø 0,7 x 30 mm	BD, Heidelberg
Einschweißfolien	102 x 258 mm	Wallac, Turku, Finnland
ELISA-Platten	96-Loch-Flachbodenplatte Microlon, high binding	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml- Rundbodenröhrchen	BD, Heidelberg
Gewebekulturschalen	Cellstar: Ø 100 mm, Höhe 20 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Glasfaserfilter	102 x 258 mm	Wallac, Turku, Finnland

Material	Modell	Hersteller
Glaspipetten	Precicolor 1 ml, 5 ml, 10 ml	HBG (Henneberg-Sander GmbH), Gießen
Handschuhe	Sempercare [®]	Semperit, Schweiz
Kulturflaschen	Cellstar 25 cm ² -Kulturflasche	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturplatten	Cellstar 6-Loch-Platte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
	Cellstar 24-Loch-Platte	
	Cellstar 96-Loch-Platte, Flach- und Rundboden	
Küvette	Elektroporations-Küvette	PeqLab, Erlangen
MACS [®] Separationssäulen	MS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Nylonwolle	MKN-100	Kisker-Biotech, Steinfurt
Objektträger	76 x 26 mm mit Mattrand	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Parafilm	Parafilm N	Nationalcan [™] , Chicago, USA
Pasteurpipetten	150 mm	VWR, Darmstadt
PCR-Platten	Micro AMP [™] 96	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen	Gelbe Spitzen: bis 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
	Blaue Spitzen: bis 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Plastikpipetten	Cellstar: 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml Pipetten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen	Cellstar: 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Präzisions Dispenser- Tips	2,5 ml und 5 ml	Brand, Wertheim

Material	Modell	Hersteller
Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
	25 mm Filter/0,1 µm Supor [®] membrane (PN-4611)	PALL Gelman Laboratory, USA
Zellsieb	Cell Strainer: Ø 40 µm	BD, Heidelberg

2.1.3 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2,2,2 Tribromoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Methyl-2-butanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
³ H-Thymidin (³ H-TdR)	GE Healthcare, München
Alkopharm 70 (70%iger Alkohol)	Brüggemann, Heilbronn
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
Brefeldin A (BFA) (γ,4-Dihydroxy-2-[6-hydroxy-1-heptenyl]-4-cyclopentanecrotonic acid λ-lactone)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
CFSE (carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester)	Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA
ConA (Concanavalin A)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim

Substanz	Hersteller
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Glutamin (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	Roth, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Escherichia coli</i>	Calbiochem, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipoteichonsäure (LTA) von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maltose	Fluka Chemie AG, Buchs
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
OPD (o-Phenylendiamin; C ₆ H ₈ N ₂ x 2HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA, Pasching, Österreich
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Saponin	Riedel de Hagen AG, Seelze

Substanz	Hersteller
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 95% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-Peroxidase (ExtrAvidin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Turku, Finland
SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix	Thermo Scientific, Schwerte
Tri-Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween [®] 20 (Polyoxyethylenesorbitan-Monolaurat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser (pyrogenfrei, steril)	Aqua B. Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%ig	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Lösungen

Da die Qualität des Wassers ein essentieller Faktor für den Erfolg einer Zellkultur ist, wurde zur Herstellung von Lösungen, Wasser aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (ELGA, Bucks, Großbritannien) verwendet. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die Puffer und Lösungen bei 4°C gelagert.

1 x PBS (Phosphate buffered saline)

40,2 g NaCl und 7,8 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O wurden in 5 l aqua dest. gelöst; der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,2 eingestellt und die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

10 x PBS

402 g NaCl und 78 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O wurden in 5 l aqua dest. gelöst; der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 6,6 eingestellt und die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

Avertin-Stammlösung

10 g 2,2,2-Tribromoethanol wurden in 10 ml tertiärem Amylalkohol (2-Methyl-2-butanol) durch starkes Vortexen gelöst und anschließend lichtgeschützt verwahrt.

Avertin-Gebrauchslösung

Die Avertin-Gebrauchslösung wurde 2,5%ig aus der Stammlösung mit sterilem 1xPBS (pH 7,2) angesetzt. Dazu wurden 250 µl Avertin-Stammlösung in 9,75 ml 1xPBS durch starkes Vortexen verdünnt. Die Gebrauchslösung wurde maximal zehn Tage lang verwendet und dazu lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Blockierungs- und Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA):

1 g BSA (Bovines Serumalbumin) wurde in 100 ml 1xPBS gelöst.

Die Lösung wurde verwendet, um freie Bindungsstellen der ELISA-Mikrotiterplatten, die nicht durch das verwendete Antigen abgesättigt wurden, zu blockieren; somit konnten eventuelle unspezifische Bindungen vermieden werden. Des Weiteren wurden mit dieser Lösung die verwendeten Proben, die Detektions-Antikörper sowie das Enzym ExtrAvidin-Peroxidase, verdünnt.

EBSS-Puffer

Der EBSS-Puffer wurde aus folgenden Komponenten angesetzt:

0,26 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
0,4 g	KCl
0,2 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
6,8 g	NaCl
2,2 g	NaHCO ₃
0,158 g	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
1,0 g	Glucose

Die einzelnen Komponenten wurden wie angegeben, in 1 l aqua dest gelöst; der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

EBSS-Puffer/ 0,1% Saponin

0,1 g (w/v) Saponin wurden in 100 ml EBSS-Puffer gelöst; diese Lösung ist maximal eine Woche haltbar.

ELISA-Stop-Lösung (1 M H₂SO₄):

1 l aqua bidest. wurden 53 ml konzentrierte H₂SO₄ zugesetzt.

Diese Lösung wurde zum Abstoppen der Substratumsetzung beim Zytokin-ELISA verwendet.

ELISA-Waschpuffer:

Die Lösung, bestehend aus 500 ml 10xPBS und 5 ml Tween, wurde mit 4,5 l aqua bidest. gemischt.

Mit diesem Waschpuffer wurden die Löcher der Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen ELISA-Inkubationsschritten ausgewaschen.

FACS-Fixierlösung I

0,7 g Paraformaldehyd (PFA) wurden bei 56°C in 100 ml 1x PBS gelöst.

FACS-Fixierlösung II

4 g Paraformaldehyd (PFA) wurden bei 56°C in 100 ml 1x PBS gelöst.

FACS-Medium

Um eine eventuelle Verstopfung des FACS-Gerätes zu vermeiden, wurde FCS (PAN Biotech, siehe 2.1.5.1) durch einen Filter der Porengröße 0,2 µm filtriert, und anschließend 2%ig (v/v) in 1xPBS verdünnt; das FCS wirkt wie eine Schutzummantelung für die Zellen.

Fix-Perm-Lösung

Die Fix-Perm-Lösung bestand zu einem Teil aus Lösung 1 und zu drei Teilen aus Lösung 2 (FoxP3 Staining Buffer Set, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach).

Gey's Lyse Puffer

1 g/l KHCO₃, 8,29 g/l Ammoniumchlorid und 0,037 g/l EDTA wurden in 1 l deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde mittels 10 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und anschließend durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

MACS-Puffer

FCS (PAN Biotech; siehe 2.1.5.1) wurde 2%ig (v/v) in 1xPBS/2mM EDTA verdünnt.

NaHCO₃-Puffer (Beschichtungspuffer) 0,1 M:

8,401 g NaHCO₃ wurden in 1 l aqua dest. gelöst; der pH-Wert betrug 8,2.

In diesem Puffer wurde der Primär-Antikörper des IL-4-, IL-5 und des IFN-γ-ELISA verdünnt.

OPD-Substratpuffer:

31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 29,4 g tri-Na-Citrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 1 l aqua dest. gelöst und mittels konz. HCl auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt.

In dieser Lösung wurde das Substrat OPD (o-Phenylendiamin) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Außerdem wurde das Kosubstrat H_2O_2 kurz vor der Entwicklung des ELISA in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ beigemischt.

Permeabilisierungspuffer

10 x Permeabilisierungspuffer (FoxP3 Staining Buffer Set, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) wurde 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt.

Puffer für das Durchflusszytometer

1xPBS/2 mM EDTA

Puffer für die intrazelluläre FoxP3-Färbung

FCS (PAN Biotech; siehe 2.1.5.1) wurde durch einen Filter der Porengröße 0,2 μm steril filtriert und 0,5%ig (v/v) in 1xPBS/2 mM EDTA verdünnt.

Trypanblau-Lösung

Von der Stammlösung, die 0,1% (w/v) Trypanblau und 0,01% (w/v) NaN_3 enthält, wird eine Gebrauchslösung in einem Verhältnis von 9:1 mit 10 x PBS hergestellt und bei 4°C gelagert.

2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

2.1.5.1 Zusätze für Zellkulturmedien

Fötales Kälberserum (FCS)

Zur Kultivierung von Zellen *in vitro* wurde den Puffern, Kultur- und Waschmedien fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum) zugesetzt. Dieses dient als Quelle für verschiedene, zum Teil noch unbekannte Wachstumsfaktoren. Die Seren stammen von PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bzw. PAN Biotech (Aidenbach). Sie sind steril und mykoplasmenfrei und wurden nach dem Aliquotieren bei -20°C aufbewahrt.

β-Mercaptoethanol (5 mM)

Eine Lösung aus 40 µl 2-Mercaptoethanol und 114 ml IMDM wurde durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Diese Lösung wurde den Kulturmedien 1%ig (v/v) zugesetzt.

Glutamin (200 mM)

5,84 g L(+)-Glutamin (Roth, Karlsruhe) wurden in 200 ml 1xPBS gelöst und durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Lösung bei -20°C gelagert und den Kulturmedien 1%ig (v/v) zugesetzt.

Natriumpyruvat (NaPyr, 100 mM)

2,75 g Natriumpyruvat wurden in 250 ml 1xPBS gelöst und durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Lösung bei -20°C gelagert und den Kulturmedien 1%ig (v/v) zugesetzt.

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

Eine Antibiotikallösung aus 10⁴ I.U./ml Penicillin und 10⁴µg/ml Streptomycin wurde den Kulturmedien bzw. Waschmedien, zum Schutz vor einer mikrobiellen Kontamination, 1%ig (v/v) beigemischt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.5.2 Zellkulturmedien

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

Dieses Medium wurde von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen und als Grundmedium, mit weiteren Zusätzen zur Kultivierung von BM-DCs, eingesetzt. Bei den Zusätzen handelt es sich um folgende: 10% (v/v) FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 1% (v/v) Glutamin (200 mM), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 1% (v/v) β-Mercaptoethanol (5 mM).

Cell Gro

Dieses Medium wurde speziell für die serumfreie Kultivierung von BM-DCs bei Cell Genix, Technologie Transfer GmbH, in Freiburg, bezogen.

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

Dieses Medium wurde von Cambrex Bio Science (Viewers, Belgien) bezogen und mit weiteren Zusätzen als Waschmedium für Milzzellen oder BM-DCs eingesetzt.

Kulturmedium für die Kultivierung der Zelllinie 7TD1

IMDM wurde mit 5% (v/v) FCS (PAN, Biotech), 5% (v/v) X63-IL-6-Überstand, 1% (v/v) Natriumpyruvat (100 mM), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (5 mM), sowie 1% (v/v) Glutamin (200 mM) versetzt.

Kulturmedium für die Kultivierung der Zelllinie CTLL-2

IMDM wurde mit 5% (v/v) FCS (PAN, Biotech), 1% (v/v) X63-IL-2-Überstand, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (5 mM), sowie 1% (v/v) Glutamin (200 mM) versetzt.

Kulturmedium für die Kultivierung von BM-DCs unter serumhaltigen Bedingungen

IMDM wurde mit 10% (v/v) FCS (PAA Laboratories), 1% (v/v) Glutamin (200 mM), 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (5 mM), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), sowie 5% (v/v) X63-GM-CSF-Überstand versetzt.

Kulturmedium für die Kultivierung von BM-DCs unter serumfreien Bedingungen

Cell-Gro-Medium wurde mit 1% (v/v) Glutamin (200 mM), 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (5 mM), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 10% (v/v) P388-GM-CSF-Überstand sowie IL-4 (10 ng/ml) versetzt.

Medium für die Kokulturen von DCs und T-Zellen

IMDM wurde mit 10% (v/v) FCS (PAN Biotech), 1% (v/v) Glutamin (200 mM), 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (5 mM) sowie 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) versetzt.

Waschmedium für die serumfreie Zellkultur

EMEM wurde mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) versetzt und zum Waschen von BM-DC-Progenitorzellen benutzt.

Waschmedium für die Zellkultur

EMEM wurde mit 2% (v/v) FCS (PAN Biotech) sowie 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) versetzt und zum Waschen von frisch isolierten Milzzellen und BM-DC-Progenitorzellen benutzt.

2.1.6 Antikörper**2.1.6.1 Antikörper für die FACS-Analyse****FACS-Isotypkontrollantikörper**

Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Hamster IgG1	G235-2356	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster IgG1	A19-3	PE	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG1	X40	unmarkiert	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG1	MOPC-21	PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG1	R3-34	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG1	R3-34	PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG2a	R35-95	PE-Cy5	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG2a	R35-95	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg

Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Ratte IgG2a	EBR2a	unmarkiert	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG2b	A95-1	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG2b	EB149/10H5	PE	1:50	eBioscience, San Diego, USA

FACS-Primärantikörper

Antigen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
CD4	Ratte IgG2a, κ	RM4-5	PE-Cy5	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD8a	Ratte IgG2a,κ	53-6.7	PE-Cy5	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD11b	Ratte-IgG2b,κ	M1/70	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD11c	Hamster IgG1,λ	HL3	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD11c	Hamster IgG1,λ	HL3	PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD14	Ratte IgG1	RmC5-3	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD40	Ratte IgG2a,κ	1C10	FITC	1:25	Southern Biotechnology, Hamburg

Antigen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
CD45	Ratte IgG2b	30-F11	unmarkiert	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD80	Hamster IgG	16-10A1	FITC	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
CD86	Ratte-IgG2a, κ	GL-1	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
F4/80	Ratte-IgG2a	BM8	FITC	1:50	Biozol Diagnostica, Eching
FoxP3	Maus IgG1	3G3	PE	1:10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Gr-1	Ratte-IgG2b,κ	RB6-8C5	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
I-A^d/I-E^d	Ratte-IgG2a,κ	2G9	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
I-A^b	Ratte-IgG2a	AF6120.1	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
IL-4	Ratte-IgG1	11B11	PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
IFN-γ	Ratte-IgG1	XMG1.2	FITC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg

FACS-Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Ratte-IgG	FITC	1:100	Dianova, Hamburg

FACS-Absättigungs-Antikörper

Zur Absättigung der freien Fc-Rezeptoren wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet. 2.4G2 ist gegen den Fc-Rezeptor Typ II gerichtet und wurde als 28-fach ankonzentrierter Kulturüberstand des B-Zellhybridoms 2.4G2 eingesetzt. Der Rattenantikörper gehört zur IgG2b-Subklasse [Unkeless, 1979].

2.1.6.2 Antikörper für Zytokin-ELISA**„Capture“-Antikörper**

Antigen	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) Puffer	Firma
IFN- γ	Ratte IgG1, κ	R4-6A2	1:1000 verdünnt 0,1 M NaHCO ₃	Spitalny und Havel, 1984
IL-4	Ratte IgG1	11B11	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 0,1M NaHCO ₃	BD Pharmingen, Heidelberg
IL-5	Ratte IgG1	TRFK5	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 0,1 M NaHCO ₃	BD Pharmingen, Heidelberg
IL-10	Ratte IgG2b, κ	JES5-16E3	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 1xPBS	eBioscience, San Diego, USA

Antigen	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) Puffer	Firma
IL-12 p70	Ratte IgG2a, κ	C18.2	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 1xPBS	eBioscience, San Diego, USA
TGF- β sRII/Fc Chimäre	-	-	0,5 mg/ml (0,2 μ g/ml) 1xPBS	R&D Systems, Wiesbaden

Detektions-Antikörper

Antigen	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkon.)	Firma
IFN- γ	Ratte IgG1 biotinyliert	AN 18.17.24	1:5000 verdünnt	Cherwinski <i>et al.</i> , 1987
IL-4	Ratte IgG1 biotinyliert	BVD6-24G2	0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
IL-5	Ratte IgG2a biotinyliert	TRFK4	0,5 mg/ml (1 μ g/ml)	BD Pharmingen, Heidelberg
IL-10	Ratte IgG1, κ biotinyliert	JES5-2A5	0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml)	eBioscience, San Diego, USA
IL-12 p70	Ratte IgG2a, κ biotinyliert	C17.8	0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml)	eBioscience, San Diego, USA
TGF- β 1	Huhn-IgY biotinyliert	-	50 μ g/ml (0,1 μ g/ml)	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.6.3 MicroBeads für die magnetische Zellseparation

Zur magnetischen Zellseparation von CD90⁺-T-Zellen wurde ein anti-CD90-Antikörper gekoppelt an MicroBeads (Thy1.2 Microbeads, Klon: 30-H12), von der Firma Miltenyi Biotec GmbH, in Bergisch Gladbach, bezogen.

2.1.7 Zytokine

2.1.7.1 Zytokine für die Zellkultur

Interleukin 2 (IL-2)

Der Kulturüberstand der Maus-Myelom-Zelllinie X63.Ag8-653-IL-2, die mit dem Gen für murines IL-2 transfiziert wurde, wurde 1%ig als Zusatz zum Kulturmedium für die Zelllinie CTLL eingesetzt (X63-IL-2-Überstand).

Rekombinantes humanes IL-2 (rh IL-2), welches im IL-2-Bioassay als Standard zum IL-2-Nachweis eingesetzt wurde, wurde von Cetus, Emeryville, CA, überlassen. Die spezifische Aktivität betrug 1000 U/ml.

Interleukin 4 (IL-4)

Rekombinantes murines IL-4 wurde von AL-Immuno Tools (Friesoythe) bezogen.

Interleukin 6 (IL-6)

Der Kulturüberstand der Maus-Myelom-Zelllinie X63.Ag8-653-IL-6, die mit dem Gen für murines IL-6 transfiziert wurde, wurde 5%ig als Zusatz zum Kulturmedium für die Zelllinie 7TD1 eingesetzt (X63-IL-6-Überstand).

GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) für BM-DCs

GM-CSF wurde 5%ig als Kulturüberstand der Maus-Myelom-Zelllinie X63.Ag8-653-GM-CSF, die mit dem Gen für murines GM-CSF transfiziert wurde, als Zusatz zum Kulturmedium von BM-DCs zugesetzt (X63-GM-CSF).

GM-CSF für serumfrei-generierte BM-DCs

GM-CSF wurde 10%ig als Kulturüberstand der Zelllinie P388/GM-CSF, die mit dem Gen für murines GM-CSF transfiziert wurde, als Zusatz zum Kulturmedium von serumfreien BM-DCs zugesetzt.

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β)

Um BM-DCs auszudifferenzieren, wurden den Kulturen rm TNF- α und rm IL-1 β in einer Konzentration von jeweils 10 ng/ml zugegeben. Beide Zytokine wurden von der Firma AL-Immuno Tools (Friesothye) bezogen.

2.1.7.2 Zytokine für den ELISA (Standard)

Die hier aufgeführten murinen Zytokine wurden zur Konzentrationsbestimmung in Proben als Standard im Zytokin-ELISA mitgeführt. Sie wurden lyophilisiert bezogen und in 1xPBS mit 0,1% (v/v) BSA oder in destilliertem Wasser gelöst.

Zytokin	Artikelnummer	Konzentration (Startkonzentration)	Firma
rm IFN- γ	# 19301T	2 μ g/ml (5 ng/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
rm IL-4	# 19231W	0,2 μ g/ml (5 ng/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
rm IL-5	# 14-8051-62	10 μ g/ml (2 ng/ml)	eBioscience, San Diego, USA
rm IL-10	# 417-ML	5 μ g/ml (4 ng/ml)	R&D Systems, Wiesbaden
rm IL-12	# 19361V	2 μ g/ml (1,5 ng/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
rh TGF- β	# BAF 240	2 μ g/ml (10 ng/ml)	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.8 Peptide

Das Ovalbumin-Peptid **OVA₃₂₃₋₃₃₉** (50 µg/ml), mit der Sequenz ISQAVHAAHAEINEAGR, wurde von Peptide Protein Research Ltd. (Wickham, USA) bezogen.

2.1.9 Prebiotische Oligosaccharide

Die drei folgenden prebiotischen Oligosaccharide wurden freundlicherweise von Dr. Bernd Stahl, Danone Research - Centre for Specialised Nutrition, Friedrichsdorf, zur Verfügung gestellt. Sie lagen als Pulver vor und wurden bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C gelagert.

- Saure Oligosaccharide (pAOS)
- Galakto-Oligosaccharide / Frukto-Oligosaccharide (scGOS/lcFOS)
- Mischung Neutraler Humanmilch-analoger Oligosaccharide mit Neo-Struktur (NOS)

Für die Versuche wurden die prebiotischen Oligosaccharide in BM-DC-Kulturmedium (2.1.5.2) gelöst. Um eine Ausreifung der Zellen durch mögliche LPS-Verunreinigungen in den Präparationen der prebiotischen Oligosaccharide zu vermeiden, wurden die Oligosaccharide vorher mittels spezieller Filter (Acrodisc® Syringe Filter, PN-4611; PALL Gelman Laboratory, USA) von LPS befreit.

2.1.10 Probiotische Bakterien

Die folgenden probiotischen Bakterien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Knut Heller und Prof. Dr. Jürgen Schrezenmeir, Max-Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel in Kiel, zur Verfügung gestellt.

- *Lactobacillus rhamnosus* GG
- *Lactobacillus fermentum*

Vom *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) wurden zwei auf verschiedene Weise inaktivierte Bakterienpräparationen verwendet. Zum einen wurden die Bakterien mittels Einfrieren in

Abwesenheit von Glycerin bei -20°C inaktiviert; diese Form der Inaktivierung wird im folgenden als „LGG gefroren“ bezeichnet. Zum anderen wurden die Bakterien mittels UV-Licht inaktiviert; hierzu wurden diese 5 min lang mit UV-Licht ($9,0 \text{ W/m}^2$) bestrahlt. Die Bezeichnung für diese Inaktivierungsform lautet „LGG UV“. Zusätzlich wurden lebende LGG-Stämme, im Folgenden „LGG lebend“ genannt, in die Experimente eingesetzt und mit den beiden inaktivierten Bakterienformen verglichen. Hierzu wurden die Bakterien in 1xPBS mit 20% Glycerin aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Um das Glycerin nach dem Auftauen und vor der Zugabe der lebenden Bakterien zu den BM-DC-Kulturen auszuwaschen, wurden die Bakterien bei 2656 g für 15 min abzentrifugiert; anschließend wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschriffe in Kulturmedium.

Vom *Lactobacillus fermentum* standen zehn verschiedene Isolate zur Verfügung, welche mittels Einfrieren bei -20°C inaktiviert wurden.

- K1-Lb1, K1-Lb6
- K2-Lb4
- K4-Lb6
- K6-Lb2, K6-Lb4
- K7-Lb1
- K8-Lb1, K8-Lb3
- K9-Lb3

2.2 Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgten stets unter sterilen Bedingungen; dazu gehörte die Verwendung von steril filtrierte ($0,2 \mu\text{m}$) bzw. autoklavierten Lösungen, sterilen Materialien und Geräten sowie das praktische Arbeiten an einer sterilen Werkbank. Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO_2 -begasteten Inkubator bei 37°C und einem CO_2 -Gehalt

von 10% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Die Kultivierung serumfreier Kulturen erfolgte bei einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (AO; Buffalo, USA); dazu wurde die zu bestimmende Zellsuspension 1:10 in dem Farbstoff Trypanblau verdünnt.

Trypanblau kann durch defekte Zellmembranen ins Zytosol diffundieren und bindet als saures Molekül an geladene, zytosolische Proteine. Somit werden lediglich tote Zellen mit dem Farbstoff angefärbt, während lebende Zellen, die sich durch eine intakte Zellmembran auszeichnen, ungefärbt bleiben und somit leicht zu unterscheiden sind. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer, bestehend aus 16 Kleinquadraten, ausgezählt; dabei wurden blau-verfärbte Zellen nicht in die Berechnung der Lebendzellzahl aufgenommen.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} &\text{Gezählte Zellzahl von 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) \\ &= \text{Zellzahl / ml} \end{aligned}$$

2.2.1.2 Bestrahlung von Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (APCs), die in der gemischten Lymphozyten-Reaktion (engl. **Mixed Lymphocyte Reaction, MLR**) nicht proliferieren sollten, wurden mittels einer Cäsium-Quelle mit 30 Gray bestrahlt, dabei entspricht 1 Gray der aufgenommenen Strahlendosis von 1 Joule/kg Gewebe. Die γ -Strahlen, charakterisiert durch kurze Wellenlängen und hohe Frequenzen, dringen tief ins Gewebe ein und führen, verglichen mit α - oder β -Strahlen, zu einer relativ geringen Ionisierung. Die Wirkung auf die Zelle kann entweder direkt erfolgen, wenn die Strahlung unmittelbar auf ein Makromolekül trifft oder indirekt, wenn sie zuerst mit

Makromolekülen des Zellinneren reagiert und dort Elektronen freisetzt, die ihrerseits auf andere Moleküle einwirken können.

Die dabei entstandenen DNA-Strangbrüche verhindern eine DNA-Replikation und damit auch eine Proliferation der Zellen.

2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien (2.2.2) wurden in speziellen Einfrierröhrchen bei -156°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen solange vorsichtig bei 37°C im Wasserbad geschwenkt, bis noch deutliche Eisklumpchen sichtbar waren. Diese wurden anschließend mittels einer Pipette durch Resuspendieren aufgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml kaltem Waschmedium, welches 2%ig mit FCS (PAN Biotech) und 1%ig mit Penicillin/Streptomycin versetzt war, überführt. Anschließend wurden 20 ml Waschmedium hinzupipettiert und die Zellen bei 4°C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Zellsediment in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums (2.1.5.2) aufgenommen und in eine 25 cm^2 -Kulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 10% CO_2 in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre.

2.2.2 Haltung von Zelllinien

2.2.2.1 Haltung der Zelllinie 7TD1

Das Maus-B-Zellhybridom 7TD1 wurde von Dr. Jacques Van Snick am Ludwig Institut für Krebsforschung in Brüssel etabliert [1986]. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die IL-6-abhängig wächst, und sich somit als Indikatorzelllinie für den IL-6-Bioassay (2.6.3) eignet. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie wurde in Kulturmedium, bestehend aus IMDM, versetzt mit 5% (v/v) FCS (PAN Biotech), 1% (v/v) Natriumpyruvat, 5% (v/v) X63-IL-6-Überstand, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) β -Mercaptoethanol sowie 1% (v/v) Glutamin, gehalten. Die Kultivierung erfolgte in einer 25 cm^2 -Kulturflasche bei 37°C und 10% CO_2 in gesättigter

Wasserdampfatmosphäre. Die Zelllinie wurde drei Mal in der Woche neu verdünnt; montags und mittwochs wurden sechs Tropfen und freitags zwei Tropfen der Zellsuspension aus der Kultur entnommen und in eine neue Kulturflasche mit 10 ml frischem Kulturmedium (2.1.5.2) ausgesät.

2.2.2.2 Haltung der Zelllinie CTLL-2

Die murine T-Zelllinie CTLL-2 (cytotoxic T-lymphocyte line, CTLL) entstand aus einer zytotoxischen T-Zelllinie [Gillis und Smith, 1977], die während der Kultur die Antigenspezifität sowie die zytolytische Eigenschaft verloren hat. Sie wächst IL-2-abhängig und eignet sich somit als Indikatorzelllinie für den IL-2-Bioassay (2.6.2). Die Zelllinie wurde in Kulturmedium, bestehend aus IMDM, versetzt mit 5% (v/v) FCS (PAN Biotech), 1% (v/v) X63-IL-2-Überstand, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) β -Mercaptoetanol sowie 1% (v/v) Glutamin, gehalten. Die Kultivierung erfolgte in einer 25 cm²-Kulturflasche bei 37°C und 10% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatmosphäre.

Die CTLL-2-Zellen wurden drei Mal in der Woche umgesetzt; montags und mittwochs wurden 1 ml und freitags 300 μ l aus der Kultur entnommen und in eine neue Kulturflasche mit 10 ml frischem Kulturmedium (2.1.5.2) ausgesät.

2.2.2.3 Haltung der Zelllinie P388/GM-CSF

Die mit dem GM-CSF-Gen stabil transfizierte Zelllinie P388/GM-CSF zeichnet sich durch eine hohe Produktion an GM-CSF in den Kulturüberständen aus. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Karsten Mahnke (Hautklinik, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2.2.4 Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-IL-2

Die mit dem murinen IL-2-Gen stabil transfizierte Zelllinie X63Ag8.653-IL2 zeichnet sich durch eine hohe Sekretion von IL-2 in den Kulturüberständen aus.

Die Zelllinie ist ein Subklon der Maus-Myelom-Zelllinie P3-X63-Ag8, welche von Kearney *et al.* [1979] etabliert wurde und zeichnet sich durch eine Resistenz gegenüber 8-Azaguanin sowie eine fehlende Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase aus. Ferner sekretiert sie, aufgrund der fehlenden leichten und schweren Immunoglobulinketten, kein Immunglobulin. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in IMDM, versetzt mit 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Natriumpyruvat, 5% FCS (PAN Biotech) und 1 mg/ml Geneticin.

2.2.2.5 Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-IL6

Die mit dem IL-6-Gen stabil transfizierte Zelllinie zeichnet sich durch eine sehr hohe Produktion von IL-6 im Kulturüberstand aus und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lukas T. Jeker (Pädiatrische Immunologie, Zentrum für Biomedizin, Basel) zur Verfügung gestellt.

Wie bei der Zelllinie X63Ag8.653-IL2, handelt es sich auch hier um einen Subklon der Maus-Myelom-Zelllinie P3-X63-Ag8, welche von Kearney *et al.* [1979] etabliert wurde.

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in IMDM, versetzt mit 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Natriumpyruvat, 5% FCS (PAN Biotech) und 1 mg/ml Geneticin.

2.2.2.6 Haltung der Zelllinie X63-Ag8.653-GM-CSF

Die mit dem GM-CSF-Gen stabil transfizierte Zelllinie X63-Ag8.653-GM-CSF [Zal *et al.*, 1994] zeichnet sich durch eine sehr hohe Produktion von GM-CSF im Kulturüberstand aus und wurde freundlicherweise von Dr. B. Stockinger (National Institute for Medical Research, London, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie wurde in IMDM, versetzt mit 1 mg/ml G418 und 5% FCS (PAN Biotech) kultiviert. Alternativ ist auch eine Kultur in RPMI möglich.

2.2.3 Präparation von Zellen aus lymphoiden Organen der Maus

2.2.3.1 Mäuse

Für die Versuche wurden Inzuchtmäuse der Stämme C57BL/6 (Genotyp H-2^b), BALB/c J (Genotyp H-2^d), FVB/N (Genotyp H-2^q) und OT-II.1 (Genotyp H-2^b) ab einem Alter von sechs Wochen eingesetzt. Diese wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz gezüchtet.

C57BL/6-Tg OT-II.1-(OT-II)-Mäuse sind transgene Mäuse auf dem genetischen Hintergrund des C57BL/6-Inzuchtstammes. Sie exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf CD4⁺ T-Zellen, welcher spezifisch das OVA-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen erkennt [Barnden *et al.*, 1998].

2.2.3.2 Gewinnung von Knochenmarkszellen

Zur Differenzierung von BM-DCs wurden Knochenmarkszellen aus sechs bis zwölf Wochen alten C57BL/6-Mäusen isoliert.

Die Maus wurde in Rückenlage auf einem Präparierbrett mittels Nadeln fixiert und die Bauchseite wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde auf der Bauchseite an Abdomen und Hinterextremitäten abgelöst; die Femuren und Tibien wurden entfernt, weitestgehend von Muskeln befreit und zum Desinfizieren in 70%iges Ethanol eingetaucht. Anschließend wurden die Knochen in einer Petrischale mit Waschmedium (EMEM, 2% FCS (PAN Biotech) 1% Penicillin/Streptomycin) aufbewahrt. Um restliche Muskel- und Faserreste zu entfernen wurden die Knochen mit ethanolgetränkten, fusselreien Tüchern abgerieben, und anschließend an beiden Enden mittels einer Schere vorsichtig aufgeschnitten. Mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und einer 0,5 mm-Kanüle wurden die Röhrenknochen mit Waschmedium ausgespült, bis sie durchgehend weiß erschienen. Das Knochenmark wurde in einer Petrischale mit frischem Waschmedium aufgefangen. Nachdem die Knochenmarkszellen mittels einer dünnen Glaspipette vereinzelt wurden, wurden sie in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Geyschem Lyse-Puffer (ca. 1 ml Lyse-Puffer je Knochenmarkszellen aus einer Maus) zur Erythrozytenlyse aufgenommen. Nach 1 min wurde diese Reaktion durch

Zugabe von Waschmedium abgestoppt, die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Sediment zur Zellzahlbestimmung in BM-DC-Kulturmedium (2.1.5.2) aufgenommen.

Die durchschnittliche Ausbeute pro C57BL/6-Maus betrug 2 bis $4,5 \times 10^7$ Knochenmarkszellen und entsprach damit den Literaturangaben [Lutz *et al.*, 1999].

2.2.3.3 Gewinnung von Milzzellen

Zur Gewinnung von Milzzellen wurde die Maus in Rückenlage auf einem Präparierbrett mittels Nadeln fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach der Öffnung des Abdomens wurde die Milz freipräpariert und entfernt, von anhängendem Fettgewebe befreit und in einer Petrischale mit Waschmedium (EMEM, 2% FCS (PAN Biotech), 1% Penicillin/Streptomycin) aufbewahrt. Anschließend wurde sie mittels gezählter chirurgischer Pinzetten zerkleinert und die Zellsuspension wurde durch ein feines steriles Zellsieb ($\text{\O} 40 \mu\text{m}$) in ein 50 ml-Probenröhrchen überführt. Diese Suspension wurde für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde pro Milz 1 ml Geyscher Lyse-Puffer zugegeben und die Reaktion wurde nach 1 min, durch Zugabe von 10 ml Waschmedium, abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in warmem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.3.4 Gewinnung von Lymphknotenzellen

Für die Gewinnung von Zellen der drainierenden Lymphknoten nach subkutaner Injektion von DCs in die Fußsohlen der Maus, wurden die poplitealen Lymphknoten aus der Kniekehle steril entnommen, in eiskaltes Waschmedium (EMEM, 2% FCS (PAN Biotech), 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und auf Eis gelagert. Nach der Präparation wurden die Lymphknoten zwischen den rauen Enden zweier Mattrandobjektträger zerrieben und die Suspension wurde über ein Zellsieb ($\text{\O} 40 \mu\text{m}$) in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Danach erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 300 g. Das Zellsediment wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.4 Kultivierung (Differenzierung und Stimulation) von BM-DCs

2.2.4.1 Generierung von DCs aus Knochenmarksvorläuferzellen unter serumhaltigen Bedingungen

Die Generierung von BM-DCs aus Vorläuferzellen des Knochenmarks erfolgte nach der Standardmethode von Scheicher *et al.* [1992], welche von Lutz *et al.* [1999] modifiziert wurde.

Die Aussaat der Knochenmarkszellen erfolgte in bakteriologischen Petrischalen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/10 ml Kulturmedium. Die anschließende Kultur erfolgte in BM-DC-Kulturmedium (2.1.5.2) bei 37°C und 10% CO₂. Supplementiert wurde das Medium mit 5% GM-CSF. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden am dritten Tag der Kultur 5 ml frisches Kulturmedium pro Petrischale zupipettiert. Am sechsten Tag wurden 5 ml Medium aus der Kultur entnommen und nach einer Zentrifugation bei RT und 300 g wurde das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert und in gleichem Volumen der Kultur wieder zurückgegeben. Dabei wurde das GM-CSF bei jedem Mediumwechsel frisch zugesetzt.

Für die Analyse unreifer Zellen wurde an Tag Acht keine Ausreifung induziert, sondern ein weiterer Mediumwechsel wurde vorgenommen und die Kultivierung an Tag Zehn beendet.

2.2.4.2 Stimulation von BM-DCs unter serumhaltigen Bedingungen

Am achten Tag der Kultur erfolgte die Stimulierung der BM-DCs mittels LPS. Dabei wurde die Zellsuspension vollständig aus der Petrischale geerntet, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei RT und 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, mit 5% GM-CSF und 1 µg/ml LPS versetzt und für zwei weitere Tage in Gewebekulturschalen überführt.

Wie Literaturergebnisse [Lutz *et al.*, 1999] belegen, induziert allein dieser Wechsel der Kulturschale und die Rekultivierung der Zellen in frischem Medium mit GM-CSF die spontane Ausreifung der Zellen und erhöht damit die Ausreifungsquote um 10-20% im Vergleich zu Zellen, welche in der alten Petrischale verbleiben. Die Behandlung mit LPS führt zu einer Ausreifung von 50-70% aller Zellen.

In einem Teil der Experimente wurden die BM-DCs auch durch die Zugabe von Lipoteichonsäure (LTA, 10 ng/ml) oder von TNF- α plus IL-1 β (jeweils 10 ng/ml) ausgereift.

2.2.4.3 Generierung von DCs aus Knochenmarksvorläuferzellen unter serumfreien Bedingungen

Die Differenzierung von BM-DCs unter serumfreien Bedingungen wurde nach dem Protokoll von Warncke *et al.* [2006] durchgeführt.

Die serumfreie Gewinnung von Knochenmarkszellen erfolgte, von der praktischen Anwendung her, wie unter 2.2.4.1 für die Kultivierung muriner BM-DCs unter serumhaltigen Bedingungen beschrieben, mit der Ausnahme, dass anstatt des FCS-haltigen Waschmediums, serumfreies Waschmedium eingesetzt wurde. Nach der Zellzahlbestimmung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch in einem Gesamtvolumen von 1 ml Kulturmedium (2.1.5.2) in die Löcher einer 24-Loch-Platte ausgesät. Aufgrund des Befundes, dass die Kulturen in den Rand-Löchern der 24-Loch-Platte eine geringere Viabilität aufwiesen, wurden die Rand-Löcher der Platte nicht mit Zellen, sondern mit 1xPBS belegt.

Der erste Mediumwechsel erfolgte bei den serumfreien Kulturen einen Tag früher als bei den serumhaltigen Kulturen, also bereits an Tag Zwei der Kulturperiode. Dabei wurden pro Loch 700 μ l Überstand entnommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei RT sowie 300 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in frisches serumfreies Kulturmedium aufgenommen und 750 μ l dieser Suspension wurden pro Loch wieder in die Platte ausgeteilt. Bei jedem Mediumwechsel wurden den Kulturen das GM-CSF (10%ig) sowie das IL-4 (10 ng/ml) frisch zugegeben.

An Tag Fünf der Kulturperiode erfolgte, nach dem hier beschriebenen Schema, ein weiterer Mediumwechsel. Für die Analyse unreifer Zellen wurde an Tag Sieben keine Ausreifung induziert, sondern ein weiterer Mediumwechsel vorgenommen und die Kultivierung an Tag Neun beendet. Im Fall, dass die Kulturen an diesem Tag schon sehr dicht bewachsen waren, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 neu ausgesät.

2.2.4.4 Stimulation von BM-DCs unter serumfreien Bedingungen

Am siebten Tag der serumfreien Kulturen erfolgte die Stimulierung der BM-DCs mittels LPS. Dabei wurden die Zellen vollständig aus der 24-Loch-Platte geerntet, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei RT und 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 10 ml frischem, serumfreien Kulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl wurde bestimmt. Danach wurden 1×10^6 Zellen/ml in die Löcher einer 6-Loch-Gewebekulturschale in frischem Kulturmedium ausgeteilt; GM-CSF (10%ig), IL-4 (10 ng/ml) sowie der Ausreifungsstimulus LPS (1 μ g/ml) wurden den Kulturen frisch zugesetzt. Insgesamt wurden 3×10^6 bis maximal 4×10^6 Zellen pro Loch, in einem Gesamtvolumen von 3 bis 4 ml, ausgesät.

2.2.4.5 Ernten der BM-DC-Kulturen

Die BM-DCs liegen in Suspension vor und können durch mehrmaliges Abspülen der Petri- bzw. Gewebekulturschale leicht geerntet werden. Nach Überführung der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen wurden sie bei RT und 300 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Bestimmung des Zytokingehaltes in Eppendorf-Gefäßen bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden in frischem Waschmedium aufgenommen, erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml Kulturmedium für die Zellzahlbestimmung aufgenommen.

Für die RNA-Isolierung wurden 5×10^5 Zellen der unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs zur Lyse in 300 μ l RA1-Lysepuffer aufgenommen und bis zur Präparation bei -20°C in Eppendorf-Gefäßen aufbewahrt

2.2.4.6 Kultivierung von BM-DCs mit prebiotischen Oligosacchariden

BM-DCs wurden unter Zusatz von prebiotischen Oligosacchariden, welche unter 2.1.9 aufgeführt und beschrieben wurden, differenziert; diese wurden den BM-DC-Kulturen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (10 μ g/ml bis 5 mg/ml).

Die Zugabe der prebiotischen Oligosaccharide erfolgte, je nach Versuchsansatz, zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierungsphase- bzw. Ausreifungsphase zum Zeitpunkt eines Mediumwechsels (Tag Drei, Sechs und Acht der Kulturperiode).

2.2.4.7 Kultivierung von BM-DCs mit probiotischen Bakterien

BM-DCs wurden unter Zusatz von probiotischen Bakterien, welche unter 2.1.10 aufgeführt wurden, kultiviert. Die auf eine Konzentration von 3×10^8 /ml voreingestellten Bakterien wurden den BM-DC-Kulturen, welche mit 2×10^6 Zellen pro Petrischale ausgesät wurden, im Verhältnis 10:1 (2×10^7) bzw. 1:1 (2×10^6) zugesetzt.

Die Zugabe der Bakterien zu den Kulturen erfolgte, je nach Versuchsansatz, zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierungs- bzw. Ausreifungsphase zum Zeitpunkt eines Mediumwechsels (Tag Drei, Sechs und Acht der Kulturperiode).

2.3 Funktionelle Untersuchungen zur T-Zell-stimulatorischen Kapazität von DC *in vitro*

2.3.1 Aufreinigung von T-Zellen

2.3.1.1 Aufreinigung von T-Zellen über Nylonwolle-Säulen

Mit Hilfe von Nylonwolle-Säulen ist es möglich, T-Zellen aus einer heterogenen Milzzellsuspension anzureichern, wobei vorrangig Makrophagen und B-Zellen in der Nylonwolle zurückgehalten werden.

Zur Herstellung der Nylonwolle-Säulen wurden 0,6 g Nylonwolle abgewogen und mittels Pinzetten sorgfältig zerzupft, so dass eventuell vorhandene Knoten entfernt wurden. Die Nylonwolle wurde anschließend in die Hülse einer 10 ml-Spritze überführt und die so hergestellte Säule wurde in einem 50 ml-Zentrifugationsröhrchen autoklaviert.

Die Säule wurde mit 20 ml warmem Waschmedium (EMEM, 2% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) benetzt und eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit einer sterilen Pinzette herausgedrückt; dabei wurde das Volumen der Nylonwolle auf ca. 6 ml verringert. Anschließend wurde die Säule bei 37°C im Wasserbad angewärmt. Nach Ablauf

einer Inkubationszeit von 45 min wurde die Säule mit 20 ml warmem Waschmedium gespült und anschließend wurde die Milzzellsuspension von max. 2 Milzen, in einem Volumen von 1 ml, auf die Mitte der Säule gegeben. Nun wurden 500 µl warmes Kulturmedium hinzupipettiert und die Säule wurde wieder für 45 min im Wasserbad inkubiert.

Im letzten Schritt erfolgte die Eluation der T-Zellen. Dafür wurde der Deckel eines 50 ml-Zentrifugationsröhrchens mit 70%igem Ethanol desinfiziert, mit einer 0,7x30 mm-Kanüle durchstoßen und die Säule wurde auf die Kanüle aufgesteckt. Anschließend wurden insgesamt 20 ml warmes Waschmedium hinzupipettiert, wobei die Tropfgeschwindigkeit durch vorsichtiges Drehen des Zentrifugenröhrchendeckels auf ca. einen Tropfen pro Sekunde eingestellt wurde. Das Eluat wurde für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert, das Sediment im Testmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde auf 3×10^6 /ml eingestellt.

2.3.1.2 Aufreinigung von CD90⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation

Die Separation CD90⁺ T-Zellen aus einer gemischten Milzzellsuspension erfolgte mittels magnetischer Separation (MACS[®]-Technologie) nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec GmbH. Um ein Internalisieren von MicroBeads durch markierte Zellen zu vermeiden, erfolgten alle Schritte der Markierung und anschließender Aufreinigung mit gekühlten Gebrauchslösungen. Nach der Präparation von Milzzellen (2.2.3.3) und der Zellzahlbestimmung wurde das Zellsediment in einem entsprechendem Volumen eiskalten MACS-Puffers (2.1.4) aufgenommen. Dazu wurden pro 1×10^7 Zellen 90 µl MACS-Puffer und 10 µl CD90-MicroBeads zupipettiert. Bei den CD90-MicroBeads handelt es sich um monoklonale Antikörper, welche hochaffin an das auf T-Zellen exprimierte Zelloberflächenmolekül CD90 binden, und die mit paramagnetischem Material gekoppelt sind. Nach einer 15 minütigen Inkubationsphase bei 4°C, in welcher die MicroBeads an die entsprechenden Moleküle auf der Zelloberfläche binden konnten, wurde die Zellsuspension mit einem zehnfachen Volumen des MACS-Puffers versetzt und für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Die anschließende Separation erfolgte mittels einer MS-Trennsäule, welche in einen OctoMACS[™]-Separator platziert und mit 500 µl eiskaltem MACS-Puffer aktiviert wurde. Das Zellsediment, aus maximal 1×10^8 Zellen, wurde in 500 µl eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen und auf die Trennsäule gegeben. Dabei wurden magnetisch markierte CD90⁺-T-Zellen in der Trennsäule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Trennsäule passieren konnten. Nach Passieren der Zellsuspension wurde die Säule dreimal

mit jeweils 500 µl MACS-Puffer gewaschen und aus dem Magnetfeld entfernt. Mit Hilfe eines Säulenstempels und nach Auftragen von 1 ml MACS-Puffer wurden die positiv-aufgereinigten T-Zellen aus der Säule eluiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

2.3.2 T-Zell-Stimulationsassays

2.3.2.1 Allogene Stimulation von T-Zellen

2.3.2.1.1 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Die gemischte Lymphozytenreaktion wurde als Methode gewählt, um die Fähigkeit von APCs zur Aktivierung naiver T-Zellen zu testen. Als APCs wurden dazu unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs verwendet, die mit naiven allogenen T-Zellen kokultiviert wurden. Das Prinzip der MLR basiert auf der Proliferation von T-Zellen, welche durch allogene MHC-Moleküle auf APCs aktiviert werden. Aus diesem Grund wurden T-Zellen von BALB/c-Mäusen (H-2^d) mit BM-DCs aus C57BL/6-Mäusen (H-2^b) kultiviert. Als Maß für die Proliferation der T-Zellen dient der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die neu synthetisierte DNA. Die Bestimmung der Radioaktivität gibt somit Aufschluss über die Stärke der induzierten Proliferation.

Zur Unterdrückung der Eigenproliferation der BM-DCs wurden diese mit einer Dosis von 30 Gy bestrahlt (2.2.1.2). Die dabei induzierten DNA-Strangbrüche verhindern eine korrekte DNA-Replikation und somit die Zellproliferation; in ihrer Eigenschaft als APCs bleiben die BM-DCs aber funktionstüchtig.

Durchführung:

Die im Rahmen der MLR als APCs zu verwendenden BM-DCs wurden aus den Kulturschalen bzw. Kulturplatten geerntet, auf 5×10^5 /ml eingestellt und anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Die T-Zell-Stimulation wurde in sterilen 96-Loch-Flachbodenplatten durchgeführt; dabei wurden in die ersten drei Löcher jeweils 150 µl APCs vorgelegt. Daraus wurden jeweils 50 µl entnommen und mit 100 µl des jeweiligen Kulturmediums in Triplikaten über insgesamt acht Stufen seriell 1:3 verdünnt. Anschließend wurden 3×10^5

allogene T-Zellen in einem Volumen von 100 µl pro Loch hinzugegeben. In der ersten Verdünnungsstufe betrug demnach das Verhältnis der BM-DCs und der naiven T-Zellen 1:6. Das Gesamtvolumen der Kokultur betrug 200 µl pro Loch. Zur Kontrolle der Eigenproliferation der bestrahlten BM-DCs bzw. der T-Zellen wurden diese Zellen alleine kultiviert.

Nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 0,25 µCi/Loch ³H-Thymidin versetzt. Nach weiterer 16-stündiger Inkubation wurden die Kulturplatten bei -20°C eingefroren; hierbei brachen die Zellmembranen auf. Nach dem Auftauen der Platten bei RT wurde das Lysat mittels eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter gesaugt, wobei die radioaktiv markierte DNA auf den Filtern zurückgehalten wurde. Anschließend wurden die Filter für 2 min in der Mikrowelle getrocknet und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Radioaktivität wurde mittels einer Flüssigszintillationszählung in einem Szintillationszähler als „counts per minute“ (cpm) gemessen.

Die in die DNA eingebaute Radioaktivität war ein direktes Maß für die Proliferation der T-Zellen und damit auch ein Maß für die Intensität der Aktivierung der T-Zellen durch die APCs.

Alternativ wurden die unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs mit allogenen T-Zellen auch auf 6-Loch-Kulturplatten kokultiviert. Diese Vorgehensweise erlaubte die Kokultur im größeren Maßstab, um anschließend stimulierte T-Zellen in höherer Zellzahl zu erhalten, die dann wiederum in weiterführende Tests (Restimulation (2.3.2.1.2) und Suppression (2.3.2.1.3)) eingesetzt werden.

Dazu wurden 8×10^5 BM-DCs pro Loch einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät und mit zuvor über Nylonwolle aufgereinigten allogenen T-Zellen (5×10^6 pro Loch) kokultiviert. Anschließend wurde das Gesamtvolumen der Kokultur mit Kulturmedium auf 4 ml pro Loch aufgefüllt und die Kulturen für sieben Tage bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

2.3.2.1.2 Restimulation der T-Zellen aus der MLR

Im Restimulations-Test wurden die nach der MLR gewonnen T-Zellen mit frisch isolierten allogenen Milzzellen, die als APCs fungieren, kokultiviert. Dieses Testverfahren gibt Aufschluss darüber, ob sich die T-Zellen eventuell in einem anergen Status befinden.

Durchführung:

Dazu wurden die vorstimulierten T-Zellen aus den 6-Loch-Kulturplatten durch mehrmaliges Abspülen des Plattenbodens geerntet, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment zweimal mit Waschmedium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wurden gezählt. Im Anschluss wurden die T-Zellen auf 3×10^6 /ml eingestellt und 6×10^5 Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl in die ersten drei Löcher einer 96-Loch-Flachbodenplatte vorgelegt. Aus diesen Löchern wurden jeweils 100 µl (entsprechend 3×10^5 Zellen) entnommen und mit dem jeweiligen Kulturmedium in Triplikaten über insgesamt acht Stufen 1:2 seriell verdünnt. Als APCs dienten frisch isolierte Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen, die wie in 2.2.3.3 beschrieben isoliert wurden. Diese wurden auf 6×10^6 /ml eingestellt und mit 30 Gy bestrahlt. Anschließend wurden 3×10^5 Milzzellen in einem Volumen von 50 µl/Loch den T-Zellen zugegeben. Somit befanden sich im ersten Triplikat jeweils 3×10^5 T-Zellen und Milzzellen, wobei das Gesamtvolumen pro Loch bei 200 µl lag. Als Negativkontrollen für die Bestimmung der jeweiligen Eigenproliferation dienten Kulturen, die entweder nur T-Zellen oder nur Milzzellen beinhalteten.

Die Kulturen wurden für drei Tage bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 0,25 µCi ³H-TdR/Loch versetzt. Nach weiterer 16 stündiger Inkubation wurden die Platten bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.3.2.1.1 beschrieben.

2.3.2.1.3 Suppressions-Test

Im Suppressions-Test wurde untersucht, ob vorstimulierte T-Zellen, die aus einer MLR mit vorbehandelten BM-DCs stammen, die Proliferation naiver T-Zellen inhibieren können. Dazu wurde eine weitere MLR mit Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen als APCs und naiven allogenen T-Zellen aus BALB/c-Mäusen durchgeführt. Zu diesen Kokulturen wurden T-Zellen aus der allogenen T-Zell-Stimulation mit BM-DCs, in unterschiedlichen Zellzahlen, hinzutitriert und der Effekt der Zugabe der vorstimulierten T-Zellen auf die Proliferation der naiven T-Zellen wurde ermittelt.

Durchführung:

Der Suppressions-Test wurde analog zur Restimulation (2.3.2.1.2) ebenfalls in einer 96-Loch-Flachbodenkulturplatte durchgeführt. Dazu wurden wie unter 2.3.1.1 beschrieben 3×10^5 naive T-Zellen, die mittels Aufreinigung über Nylonwolle aus Milzen von BALB/cJ-Mäusen isoliert wurden, und 3×10^5 Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen als APCs kokultiviert. In unterschiedlichen Zellzahlen (maximal 3×10^5 /Loch) wurden vorstimulierte T-Zellen, die wie unter 2.3.2.1.1 beschrieben gewonnen wurden, zu den Kokulturen hinzugegeben. Als Positivkontrollen dienten entsprechende Kulturen nur mit naiven T-Zellen und C57BL/6-Milzzellen. Ansätze mit Milzzellen ohne T-Zellen sowie nur naive oder vorstimulierte T-Zellen ohne Milzzellen dienten zur Überprüfung der Eigenproliferation der Zellen. Die Kulturen wurden für drei Tage bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 0,25 µCi ³H-TdR/Loch versetzt. Nach weiterer 16 stündiger Inkubation wurden die Platten bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.3.2.1.1 beschrieben.

2.3.2.2 Stimulation von T-Zellen

2.3.2.2.1 Beladung von BM-DCs mit OVA₃₂₃₋₃₃₉

Für die Beladung der BM-DCs mit dem OVA-Peptid wurden diese in warmem Kulturmedium aufgenommen und auf 3×10^5 /ml eingestellt. Danach erfolgte die Inkubation mit 10 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen; diese erfolgte für mindestens 1 h bis maximal 4 h im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂-Begasung. Um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten mussten dabei die Deckel der Zentrifugationsröhrchen leicht aufgeschraubt werden. Nach der Inkubation wurde das Peptid dreimal mit warmem Waschmedium ausgewaschen und anschließend wurden die Zellen mit 30 Gy bestrahlt. Danach konnten sie für die Stimulation syngener OT-II-T-Zellen verwendet werden (2.3.2.2.2).

2.3.2.2.2 Stimulation von OT-II-T-Zellen

Zur Bestimmung der Stimulationskapazität von APCs für antigenspezifische T-Zellen wurden OVA-spezifische OT-II-T-Zellen mit BM-DCs kokultiviert, welche mit dem Peptid

OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen wurden. Als antigenpräsentierende Zellen wurden BM-DCs aus C57BL/6-Mäusen verwendet, da sie aus Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie die OT-II-T-Zellen stammen.

Durchführung:

Nach der Differenzierung von BM-DCs aus C57BL/6-Mäusen wurden diese mit dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen (2.3.2.2.1), mit 30 Gy bestrahlt und ihre Zellzahl auf 3×10^5 /ml eingestellt. In der Zwischenzeit wurden CD4⁺ OT-II-T-Zellen mittels magnetischer Separation aufgereinigt (2.3.1.2). Anschließend wurde ihre Zellzahl auf 5×10^5 /ml eingestellt. In die ersten drei Löcher einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden $4,5 \times 10^4$ BM-DCs, in einem Volumen von 150 µl/Loch, vorgelegt. Jeweils 50 µl (entsprechend $1,5 \times 10^4$ Zellen) wurden entnommen und mit 100 µl des jeweiligen Kulturmediums in Triplikaten über fünf Titrationsstufen seriell 1:3 verdünnt. Anschließend wurden 5×10^4 OT-II-T-Zellen in einem Volumen von 100 µl zu den BM-DCs hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Ansätze mit jeweils nur APCs ohne OVA-Peptid-Beladung bzw. nur T-Zellen und T-Zellen mit Peptid. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 10%iger CO₂-Begasung wurden die Zellen mit 0,25 µCi/Loch ³H-Thymidin versetzt. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Kulturplatten bis zur Messung der Radioaktivität bei -20°C eingefroren.

2.3.2.2.3 CFSE-Proliferationstest

Die Proliferation antigenspezifischer OT-II-T-Zellen, nach Stimulation mit syngenem BM-DCs, wurde alternativ zur Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem ³H-Thymidin in die DNA, auch nach Markierung mit dem fluoreszierenden Lebendfarbstoff CFSE gemessen. CFSE bindet an Proteine und seine Fluoreszenzintensität halbiert sich seriell bei der Zellteilung der Lymphozyten. Unter optimalen Bedingungen sind CFSE-gefärbte Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* über acht bis zehn diskrete Zellteilungszyklen mittels FACS-Analyse nachzuweisen [Lyons, 2000].

Durchführung:

Für die CFSE-Markierung wurden die aufgereinigten T-Zellen in serumfreiem Waschmedium aufgenommen und bei 4°C und 300 g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in serumfreiem Waschmedium, versetzt mit 1,5 µM CFSE, im Wasserbad bei

37°C für 10 min inkubiert. Um nicht gebundenes CFSE auszuwaschen, wurde die Zellsuspension anschließend in einem Überschuss an serumhaltigem Waschmedium aufgenommen und bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zwei weitere Male mit serumhaltigen Waschmedium gewaschen und ihre Zellzahl wurde auf 5×10^5 /ml eingestellt.

Nach der Differenzierung von BM-DCs aus C57BL/6-Mäusen wurden diese mit dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen (2.3.2.2.1), mit 30 Gy bestrahlt und ihre Zellzahl auf 3×10^5 /ml eingestellt. Die BM-DCs wurden zunächst in einem Volumen von 150 µl in die Löcher einer 96-Rundbodenplatte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl entnommen und mit 100 µl des jeweiligen Kulturmediums in Triplikaten über fünf Titrationsstufen 1:3 seriell verdünnt. Danach wurden 5×10^4 CFSE-markierte T-Zellen in einem Volumen von 100 µl pro Loch dazu pipettiert. Als Kontrolle dienten Ansätze mit jeweils nur APCs ohne OVA-Peptid-Beladung bzw. nur T-Zellen und T-Zellen mit Peptid. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 10%iger CO₂-Begasung wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 4°C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, wurde das Zellsediment in 500 µl FACS-Medium aufgenommen und eine durchflusszytometrische Bestimmung der Intensität der CFSE-Färbung durchgeführt.

2.4 Bestimmung der allogenen T-Zell-stimulatorischen Kapazität von BM-DCs *in vivo* (*In-vivo*-MLR)

Für die Bestimmung der primärstimulatorischen Kapazität von BM-DCs *in vivo* wurden BM-DCs aus C57BL/6-Mäusen nach dem Protokoll von Warncke [Warncke *et al.*, 2006] (2.2.4.3) unter serumfreien Bedingungen differenziert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, in serumfreiem Medium gewaschen und ihre Zellzahl bestimmt. Das Zellsediment wurde in warmem 1xPBS aufgenommen und die Zellsuspension wurde in sterile 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei RT und 300 g wurden die BM-DCs mit 1xPBS auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt. Danach wurden jeweils 1×10^5 BM-DCs, in einem Volumen von 50 µl, in die beiden Fußsohlen der hinteren Extremitäten von BALB/c-Mäusen, die zuvor durch intraperitoneale Avertin-Gabe sediert wurden, subkutan injiziert. Kontrolltieren wurde 50 µl 1xPBS pro Fußsohle gespritzt.

Nach sieben Tagen wurden den Rezipienten die poplitealen Lymphknoten entnommen (2.2.3.4). Die daraus präparierten Lymphknotenzellen wurden *in vitro* in eine MLR mit syngeneten (BALB/c) sowie allogenen (C57BL/6, FVB/N) Milzzellen als APCs eingesetzt.

Die Milzzellen wurden mit 30 Gy bestrahlt und 6×10^5 APCs wurden in Triplikaten in einem Volumen von 200 μl pro Loch einer 96-Flachbodenplatte pipettiert. Danach wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension entnommen und mit 100 μl des jeweiligen Kulturmediums in Triplikaten 1:2 seriell verdünnt. Anschließend wurden 3×10^5 Lymphknotenzellen in einem Volumen von 100 μl hinzupipettiert. Zur Überprüfung der Eigenproliferation wurden Kontrollkulturen mitgeführt, die entweder nur Lymphknotenzellen oder nur Milzzellen, getrennt nach den drei Haplotypen, enthielten. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 10%iger CO₂-Begasung wurden die Zellen mit 0,5 $\mu\text{Ci/Loch}$ ³H-Thymidin versetzt und nach weiteren 16 Stunden bis zur Messung der Radioaktivität bei -20°C eingefroren.

2.5 FACS-Analyse

Diese analytische Methode wurde unter dem Gesichtspunkt der Charakterisierung der BM-DCs anhand ihrer Oberflächenmoleküle eingesetzt. Mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (fluorescence-activated cell sorter, FACS) können einzelne Zellen klassifiziert und voneinander getrennt werden. Dazu werden die Zellen zuerst mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Färbungen, die direkte und die indirekte Färbung. Bei der direkten Färbung ist der proteinspezifische Primärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und kann somit direkt nachgewiesen werden. Bei der indirekten Färbung liegt der Primärantikörper ungekoppelt vor, daher muss eine weitere Markierung dieses Antikörpers durch einen isotypspezifischen Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper erfolgen. Ein Vorteil der indirekten Methode ist die Amplifikation der Antikörperbindung und damit eine erhöhte Sensitivität der Detektion des Oberflächenmarkers.

Das FACS-Gerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem Laserlicht-Generator und einem optischen System, mit den Komponenten Messstrahl-Aufbereitung, Messkammer und Emissionsstrahl-Bearbeitung. Das Gemisch der markierten Zellen wird durch ein Drucksystem ins Flüssigkeitssystem eingeschleust, hydrodynamisch fokussiert und als feiner Flüssigkeitsstrahl aus vereinzelt Zellen, die in bestimmten Abständen platziert sind, durch

die Messkammer geschleust. Hier werden sie mit monochromatischem Laserlicht angeleuchtet, wobei das Streulicht registriert wird. Das Vorwärtsstreulicht gibt Aufschluss über die Größe der gemessenen Zellen und das Seitwärtsstreulicht über ihre Granularität. Außerdem wird das emittierte Fluoreszenzlicht in drei Messbereichen (entsprechend den Farben grün, orange, rot) gemessen. Bei den hier dargestellten Versuchen wurde mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Cy5-Phycoerythrin (Cy5-PE) gearbeitet. Diese Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch Strahlung der Wellenlänge 488 nm angeregt und emittierten dann Licht der Wellenlängen 519 nm (FITC), 578 nm (PE) und 633 nm (Cy5-PE).

2.5.1 Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen

Für den Nachweis von Oberflächenmolekülen auf BM-DCs (z.B. CD86, MHC-II) oder T-Zellen (CD4 bzw. CD8) wurden die Zellen durch mehrmaliges Abspülen der Petrischalen oder Kulturplatten geerntet. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden 2,5 bis maximal 5×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen eingesetzt und mit FACS-Medium gewaschen. Das FACS-Medium enthält 2%ig FCS, welches als Schutzkolloid wirkt und damit für Bedingungen sorgt, die besser an die Zellphysiologie angepasst sind; weiterhin reduziert es die artifizielle Adhärenz der Zellen an das Probenröhrchen und verringert das Ausmaß der unspezifischen Antikörper-Bindung. Die Bindung von Antikörpern an Oberflächenmoleküle von Zellen kann entweder Rezeptor-„shedding“ oder Endozytose hervorrufen, weshalb die Färbung bei 4°C durchgeführt wird. Außerdem wurden die Proben während und nach der Färbung im Dunkeln aufbewahrt, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen. Alle für die FACS-Färbung verwendeten Antikörper sind unter (2.1.6.1) aufgelistet.

Nachdem die Zellen mit FACS-Medium versetzt wurden, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g und 4°C. Vor der eigentlichen Markierung der Zellen wurde eine Absättigung der freien Fc-Rezeptoren durchgeführt, um spezifische Bindungen von Immunglobulinmolekülen zu verhindern. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 25 µl 2.4G2-Überstand (anti-Maus FcγRII/III), 1:5 in FACS-Medium verdünnt, je FACS-Röhrchen versetzt, vermischt und 15 min lang bei 4°C inkubiert. Zwischendurch wurde noch einmal gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im 2.4G2-Überstand zu erhalten und so eine maximale Absättigung der freien Bindungsstellen zu ermöglichen. Danach wurde der Zellsuspension je Röhrchen ein antigen-spezifischer Primärantikörper, in geeigneten Verdünnungen in 25 µl

FACS-Medium, zugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen für weitere 20 min abgedunkelt auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörper mit 1 ml FACS-Medium herausgewaschen. Zellen, die mit einem direktmarkierten Primärantikörper angefärbt wurden, wurden nach dem Waschen und Absaugen des Überstandes in 500 µl FACS-Fixierlösung I (1xPBS/0,7% PFA) aufgenommen, resuspendiert und darin bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Mit Proben, die anschließend einer intrazellulären Färbung unterzogen wurden, wurde nach Abschnitt 2.5.2 (intrazelluläre FACS-Färbung, icF) weiter verfahren. Die mit einem unmarkierten Primärantikörper behandelten Zellen wurden mit isotypspezifischen FITC-markierten Sekundärenantikörpern, in geeigneter Verdünnung in 50 µl FACS-Medium, aufgenommen. Nach kurzem Durchmischen der Zellen erfolgte eine erneute Inkubation für 20 min auf Eis. Auch nach dieser Inkubation wurden überschüssige Antikörper mit 1 ml FACS-Medium herausgewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen, ebenfalls durch Zugabe von 500 µl FACS-Fixierlösung I, fixiert; bis zur Messung wurden die Proben im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Die Isotypkontrollantikörper (2.1.6.1), welche zu jedem Antikörper mitgeführt wurden, dienten zur Justierung der Empfindlichkeit des Durchflusszytometers und zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren. Die Messung erfolgte nach Ausgrenzung von Aggregaten und toten Zellen über Größe (FSC, „forward scatter“) und Granularität (SSC, „side scatter“). Somit wurden nur intakte Zellen in die Auswertung aufgenommen; dabei wurden bei der Charakterisierung der Oberflächenmoleküle 10.000 Ereignisse (intakte Zellen) jeder Probe mit Hilfe der CellQuest™-Software gemessen.

2.5.2 Nachweis von IFN- γ und IL-4 produzierenden T-Zellen in Kokulturen durch intrazelluläre FACS-Färbung

Für den Nachweis von IFN- γ - und IL-4-produzierenden T-Zellen, in Kokulturen aus BM-DCs und allogenen T-Zellen, wurden 6×10^5 unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs (C57BL/6) und $1,2 \times 10^6$ über Nylonwolle aufgereinigte T-Zellen (BALB/c), in einem Gesamtvolumen von 1 ml, auf 24-Loch-Kulturplatten für 96 Stunden kokultiviert. In den letzten vier Stunden der Kulturperiode wurde den Kulturen, zur weiteren Stimulierung, 20 ng/ml PMA sowie 1 µM Ionomycin zugesetzt. Parallel dazu erfolgte eine Behandlung mit 10 µg/ml Brefeldin A, damit die Zytokine nicht von den Zellen sekretiert werden, sondern in der Zelle akkumulieren

und somit intrazellulär nachweisbar sind. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aus der 24-Loch-Kulturplatte in ein 50 ml Reaktionsgefäß geerntet und für 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in FACS-Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl wurden maximal $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt.

Zunächst wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 gefärbt (2.1.6.1). Anschließend erfolgte die intrazelluläre FACS-Färbung der Zytokine IFN- γ und IL-4.

Dazu wurden die Proben zuerst in 4%igem PFA (FACS-Fixierlösung II) in einem Volumen von 50 μ l/Ansatz für 5 min bei RT fixiert. Da die Proben bereits extrazellulär gefärbt wurden, erfolgte der Inkubationsschritt im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Danach wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Medium gewaschen und bei 4°C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen wurden, in einem Volumen von 50 μ l EBSS-Puffer/0,1% Saponin je Ansatz, aufgenommen. Die Zellen wurden dann für 10 min bei RT inkubiert. Bei diesem Prozess wird die Zellmembran permeabilisiert, was ermöglicht, dass Antikörper in die Zelle eindringen können. Die Proben wurden anschließend mit 1 ml EBSS-Puffer/0,1% Saponin gewaschen und bei 4°C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte die intrazelluläre Färbung mit FITC-gekoppeltem anti-IFN- γ und PE-gekoppeltem anti-IL-4. Dazu wurden die Antikörper mit EBSS-Puffer/0,1% Saponin in geeigneter Weise verdünnt. Die Zellen wurden dann in 50 μ l dieser Antikörperlösung suspendiert und bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert; zwischendurch wurde die Probe noch einmal resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Antikörperlösung zu gewährleisten. Abschließend wurden die Zellen mit 1 ml EBSS-Puffer/0,1% Saponin versetzt und für 10 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen wurden die Proben in 500 μ l 1xPBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Auch bei dieser Art der FACS-Färbung wurden zum Justieren des FACS-Gerätes zu jeder Färbung Isotypkontrollantikörper mitgeführt. Die Messung erfolgte nach Eingrenzung von Lymphozyten über ihre Größe und Granularität. Danach erfolgte eine weitere Eingrenzung der Zellen nach der Expression von CD4 bzw. CD8 über den entsprechenden Kanal (hier: Kanal-3), in welchem die für diese Markierung verwendete Fluoreszenz Cy5-PE gemessen wurde; von den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden 10.000 Ereignisse jeder Probe mit Hilfe der CellQuest™-Software gemessen.

2.6 Zytokin-Bestimmung in Zellkulturüberständen

2.6.1 Zytokin-Bestimmung mittels ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) wurde für den Nachweis der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TGF- β in den Zellkulturüberständen verwendet.

Bei diesem Test wurde ein zytokinspezifischer Fang-Antikörper an die polymere Matrix einer 96-Loch-Mikrotiterplatte adsorbiert. Anschließend wurden verbleibende Bindungsstellen durch eine Blockierungslösung abgesättigt und die zu testenden Überstände wurden aufgetragen. In diesem Schritt bindet das vorhandene Zytokin an den Antikörper. Danach erfolgte das Auftragen des biotinylierten Detektions-Antikörpers, welcher ein anderes Epitop des Zytokins als der Fang-Antikörper erkennt. An das Biotin wurde im nächsten Schritt eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase gebunden. Nach Zugabe des farblosen Substrats o-Phenylendiamin (OPD) erfolgte unter Verwendung des Kosubstrats H₂O₂ eine enzymatische Reaktion in ein farbiges Produkt. Anhand dieses Farbumschlags konnte das Zytokin im zu testenden Überstand nachgewiesen werden und die Konzentration wurde anhand eines mitgeführten Standards, dessen Konzentration bekannt ist, photometrisch bestimmt werden.

Durchführung:

Im ersten Schritt wurden die Löcher einer 96-Loch-Mikrotiterplatten mit jeweils 50 μ l des „Capture“-Antikörpers in geeigneten Konzentrationen (2.1.6.2) beschichtet und über Nacht bei 4°C (IFN- γ , IL-4, IL-5) bzw. bei RT (IL-10, IL-12, TGF- β) inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte mit 0,1 M NaHCO₃ (IFN- γ , IL-4, IL-5) bzw. mit 1xPBS (IL-10, IL-12, TGF- β).

Nach zweimaligem Waschen der Platten mit 1xPBS/0,1% Tween im ELISA-Waschgerät wurden freie Bindungsstellen, durch Zugabe von 150 μ l 1xPBS/1% BSA je Loch, abgesättigt. Nach einer Inkubation von ein bis zwei Stunden bei RT erfolgte das Ausklopfen des Blockierungspuffers und die Zugabe der Zellkulturüberstände. Dabei wurden die Überstände in einem Volumen von 50 μ l seriell zweifach in 1xPBS/1% BSA titriert. Zur Standardisierung wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Zytokins (2.1.7.2) mit bekannter Konzentration mitgeführt; für die Bestimmung des Leerwertes wurden 50 μ l 1xPBS/1% BSA, anstatt des Überstandes, pro Loch aufgetragen. Die Testplatten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend zwei Mal im ELISA-Waschgerät gewaschen. Danach wurden

jeweils 50 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers (2.1.6.2) zugegeben und eine Stunde bei RT (IL-10, IL-12, TGF-β) bzw. bei 37°C (IFN-γ, IL-4, IL-5) inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigen Detektionsantikörpern wurden die Platten erneut zwei Mal gewaschen und anschließend mit dem Enzym ExtrAvidin-Peroxidase (1:2000) für eine Stunde bei RT beschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten dreimal gewaschen und es folgte die Zugabe des Substrats OPD in einem Volumen von 50 µl. Hierzu wurden 1 mg/ml OPD in Substratpuffer gelöst und mit 1 µl/ml H₂O₂ versetzt; durch den enzymatischen Substratumsatz kommt es hierbei zu einer Gelbfärbung. Je mehr Zytokin in den Zellkulturüberständen vorhanden war, desto intensiver wird die Färbung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt, wodurch eine Farbänderung nach orange erfolgte. Die Extinktion wurde im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Nach linearer Regressionsanalyse der Extinktionswerte für die Proben und den Standard wurde der Zytokingehalt in den Proben berechnet

2.6.2 IL-2-Bestimmung mittels Bioassay

Zum Nachweis von IL-2 im Überstand von BM-DC-Kulturen wurde die Zelllinie CTLL-2 (2.2.2.2) verwendet. Diese Zelllinie wächst ausschließlich IL-2-abhängig und eignet sich somit als Indikatorzelllinie.

Zunächst wurde in CTLL-2-Kulturmedium (ohne Zusatz von IL-2) mit den zu testenden Kulturüberständen in 96-Loch-Flachboden-Kulturplatten eine serielle Titrationsreihe (1:3) angelegt. Danach wurden die CTLL-2-Zellen aus der Kulturflasche geerntet und bei 300 g und 4°C für 7 min zentrifugiert. Um eventuelle Rückstände des im Kulturmedium der Zellen vorhandenen Zytokins IL-2 auszuschließen, wurden die Zellen anschließend zwei Mal im Waschmedium gewaschen. Die Zellen wurden in CTLL-2-Kulturmedium (ohne IL-2) aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl wurden 5x10³ CTLL-2-Zellen/Loch in einem Volumen von 100 µl gegeben. Die anschließende Kultivierung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 10% CO₂. Als Negativkontrolle wurden CTLL-2-Zellen in Kulturmedium ohne Zusatz von Zellkulturüberstand oder exogenem IL-2 kultiviert. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration wurde eine Standardverdünnungsreihe mit rekombinantem humanem IL-2 (Anfangskonzentration 3 U/ml) angelegt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit 0,1 µCi/Loch ³H-Thymidin versetzt. Der Zeitpunkt wurde so gewählt, dass die Viabilität der

CTLL-2-Zellen in der Negativkontrolle, welche kein exogenes IL-2 erhalten hatten, gering war.

Die Bestimmung der in die DNA eingebauten Radioaktivität gibt Auskunft über die Stärke der durch das IL-2 induzierten Proliferation der CTLL-2-Zellen und korreliert somit mit der Menge an gebildetem IL-2 in den zu testenden Überständen. Nach der achtstündigen Inkubation der Kulturen mit dem ^3H -Thymidin wurde der Test durch das Einfrieren der Kulturplatten bei -20°C gestoppt. Nach dem Auftauen der Platten im Brutschrank wurde die in die DNA eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Nach linearer Regressionsanalyse der Werte für die Radioaktivität in den Kulturen, die mit den Proben bzw. mit rekombinantem Zytokin als Standard kultiviert wurden, wurde der Zytokingehalt in den Überständen berechnet.

2.6.3 IL-6-Bestimmung mittels Bioassay

Zum Nachweis von IL-6 im Überstand von BM-DC-Kulturen wurde die Zelllinie 7TD1 (2.2.2.1) eingesetzt. Diese Zelllinie wächst ausschließlich IL-6-abhängig und eignet sich somit als Indikatorzelllinie.

Zunächst wurde in 7TD1-Kulturmedium (ohne Zusatz von IL-6) mit den zu testenden Kulturüberständen in 96-Loch-Flachboden-Kulturplatten eine serielle Titrationsreihe (1:3) angelegt. Danach wurden die 7TD1-Zellen aus der Kulturflasche geerntet und bei 300 g und 4°C für 7 min zentrifugiert. Um eventuelle Rückstände des im Kulturmedium der Zellen vorhandenen Zytokins IL-6 auszuschließen, wurden die Zellen anschließend zwei Mal im Waschmedium gewaschen und in 7TD1-Kulturmedium (ohne IL-6) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^3 7TD1-Zellen/Loch in einem Volumen von 50 μl gegeben. Die anschließende Kultivierung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 10% CO_2 . Als Negativkontrolle wurden 7TD1-Zellen in Kulturmedium ohne Zusatz von Zellkulturüberstand oder exogenem IL-6 kultiviert. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration wurde über acht Stufen eine Standardverdünnungsreihe des X63-IL-6-Überstandes angelegt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit 0,1 $\mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin versetzt. Der Zeitpunkt wurde so gewählt, dass die Viabilität der 7TD1-Zellen in der Negativkontrolle, welche kein exogenes IL-6 erhalten hatte, gering war.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Spezielle Reagenzien für die Molekularbiologie

2.7.1.1 Fertigsysteme

Für die RNA-Aufreinigung bzw. die Reverse Transkription wurden Fertigsysteme von Machery-Nagel bzw. Bio-Rad benutzt.

System	Hersteller
IScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
NucleoSpin® RNAII total RNA Isolation Kit	Machery-Nagel, Düren

2.7.1.2 Primer

Murines Zielgen	Primer Sequenz
B7-H3	Sense: 5'-AGTCTGGCACAGCTCAACTC-3' Antisense: 5'-CAAAGTCCTGGATGCTCACA-3'
CD40	Sense: 5'-CCTGGCTTTGGAGTTATGGA-3' Antisense: 5'-CCGGGACTTTAAACCACAGA-3'
CD80	Sense: 5'-CCATGTCCAAGGCTCATTCT-3' Antisense: 5'-TTCCCAGCAATGACAGACAG-3'
CD86	Sense: 5'-CAGTTACTGTGGCCCTCCTC-3' Antisense: 5'-ACTCTGCATTTGGTTTTGCT-3'
Delta-4	Sense: 5'-ACCTTTGGCAATGTCTCCAC-3' Antisense: 5'-TTGGATGATGATTTGGCTGA-3'
Fascin	Sense: 5'-AACCCCTTGCCTTTCAAAC-3' Antisense: 5'-CATGGAAAGAAGGGGACAGA-3'

Murines Zielgen	Primer Sequenz
FcγRIIB	Sense: 5'-CCAAAGGCTGTGGTCAAAC-3' Antisense: 5'-TGCTCCATTTGACACCGATA-3'
IL-10	Sense: 5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3' Antisense: 5'-TTTTACAGGGGAGAAATCG-3'
IL-12a	Sense: 5'-ACAGGGTGATGGGCTATCTG-3' Antisense: 5'-TATGAGAGAAGCGATGGAGG-3'
IL-12b	Sense: 5'-CATCTGCTGCTCCACAAGAA-3' Antisense: 5'-CGCCATTCCACATGTCACTGC-3'
Jagged-1	Sense: 5'-CAGTGCCTCTGTGAGACCAA-3' Antisense: 5'-AGGGGTCAGAGAGACAAGCA-3'
UBC (Ubiquitin C)	Sense: 5'-GTCTGCTGTGTGAGGACTGC-3' Antisense: 5'-CAGGGTGGACTCTTTCTGGA-3'

2.7.2 RNA-Isolierung

Die RNA wurde aus unterschiedlich differenzierten BM-DCs isoliert. Hierzu wurden 5×10^5 Zellen, nach zweimaligem Waschen, zur Lyse in 300 µl Lysepuffer RA1 aufgenommen und die Zelllysate bis zur Präparation der RNA bei -20°C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert. Der Lysepuffer enthält chaotrope Ionen, die die dreidimensionale Struktur von Proteinen und somit auch die der Zellwände in Anwesenheit eines reduzierenden Agens zerstört und dadurch die Zellen lysiert.

Bei der RNA-Isolierung ist auf eine RNase-freie Umgebung zu achten. Da RNasen auf Körperoberflächen vorkommen ist es notwendig, bei der RNA-Isolierung Handschuhe zu tragen. Außerdem ist darauf zu achten, dass alle Arbeitslösungen, welche für die RNA-Isolierung benötigt werden, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt werden; dieser Enzyminhibitor deaktiviert vorhandene RNasen. Weiterhin wurden nur Pipetten verwendet, die ausschließlich für die RNA-Isolierung eingesetzt werden.

2.7.3 Aufreinigung der RNA mit dem „RNA Isolation Kit“

Zur Isolierung von RNA wurde der „NucleoSpin[®] RNAII total RNA Isolation Kit“ von Machery-Nagel (Düren) verwendet.

Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten Zellysate auf Eis aufgetaut, zur Reduktion der Viskosität auf eine NucleoSpin[®] Filter-Säule gegeben und 1 min bei RT und 12470 g zentrifugiert. Danach wurden 350 µl 70%iger Ethanol zum Efflux hinzugegeben, die Proben durchmischt und auf eine NucleoSpin[®] RNA II Säule pipettiert, welche für 30 sek bei RT und 12470 g zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen und 350 µl MDB-Puffer (Membrane Desalting Buffer) wurden zum Entsalzen der Membran auf die Säule pipettiert. Anschließend wurde die Säule 1 min lang bei RT und 12470 g zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Um noch eventuell vorhandene genomische DNA zu verdauen, wurden 90 µl DNase Reaktionspuffer (Reaction Buffer for DNase) mit 10 µl rekonstituierter RNase-freier DNase gemischt, vorsichtig auf die Mitte der Membran pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran mit 200 µl RA2-Puffer versetzt und anschließend wieder bei RT und 12470 g für 30 sek zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 600 µl RA3-Puffer versetzt und für 30 sek zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl RA3-Puffer auf die Säule gegeben und diese wurde zum Trocknen der Membran für 2 min bei RT und 12470 g zentrifugiert. Nun wurde die Säule auf ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 12470 g und RT eluiert. Ein Teil der isolierten RNA wurde für die Reverse Transkription (2.7.4) eingesetzt und der Rest bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.7.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der Reversen Transkription wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Eine reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die anhand einer RNA-Matrize komplementär dNTPs anfügt. Bei der reversen Transkription werden zwei verschiedene Primer verwendet: Oligo-dt- und Random-Hexamer-Primer. Die Oligo(dT)-Primer binden an den Poly(A)-Schwanz der RNA und Random Hexamer-Primer sind eine Mischung aus verschiedenen sechs Nukleotid-langen Primern, die statistisch verteilt an eine RNA-Sequenz binden können.

Anhand des Protokolls des “iScript™cDNA Synthesis Kit“ (BioRad) wurde die reverse Transkription durchgeführt. Das Fertigsystem enthält das Enzym (iScript™Reverse Transkriptase) und eine 5x iScript-Reaktionsmischung mit Primern und dNTPs sowie Nuclease-freies Wasser.

Durchführung:

Bei der Reversen Transkription wurden zu 11 µl RNA 4 µl Nuclease-freies Wasser, 4 µl 5x iScript Reaction Mix sowie 1 µl iScript Reverse Transkriptase pipettiert. Dieses Gemisch wurde zunächst für 5 min bei 25°C, dann für 40 min bei 42°C und abschließend für 5 min bei 85°C inkubiert. Anschließend wurde der cDNA-Gehalt der Probe bestimmt (2.7.5) und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung der cDNA

Die Bestimmung der jeweiligen cDNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch. Dabei wurden die Proben zunächst 1:100 in Wasser verdünnt, und die Lösung zur Konzentrationsbestimmung in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde die Absorption bei 260 nm gemessen; bei diesem Wert liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren.

2.7.6 Quantitative (Realtime) Polymerase-Kettenreaktion (QPCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (**polymerase chain reaction, PCR**) ist es möglich, sequenzspezifische Abschnitte doppelsträngiger DNA zu amplifizieren. Dazu macht man sich DNA-Polymerasen zunutze, die Einzelstränge zu Doppelsträngen aufpolymerisieren können. Die klassische PCR-Polymerase ist die Taq-DNA-Polymerase, welche aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 72°C, das Enzym ist aber auch für eine kurze Zeit bei 95°C stabil. Somit können sich aufeinanderfolgend Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte abwechseln, ohne dass zwischendurch ein neues Enzym beigefügt werden muss oder dass Reinigungsschritte erforderlich sind.

Weitere Komponenten der PCR sind ein doppelsträngiger DNA-Matrizenstrang, Mg^{2+} als Kofaktor für die Polymerase, dNTPs, die molekularen Bausteine der DNA, und natürlich die PCR-Primer.

Die PCR-Primer haben eine Länge von 18-30 Basen und besitzen einen Anteil von 40-60 % an Guanidin und Cytosin. Die Schmelztemperatur muss 55-80°C betragen, um ausreichend hohe Primer-Anlagerungstemperaturen (Annealingtemperaturen) zu erlauben. Die Primer sind so ausgewählt, dass sie an den „sense“- bzw. den „antisense“-Strang der DNA binden, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich begrenzen.

Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94°C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Matrizen-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Matrizen-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wodurch der Primer verlängert wird bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Matrizen-DNA exakt gleicht. Weil die DNA-Aufpolymerisierung an beiden Strängen der Matrizen-DNA abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Matrizen-DNAs verdoppelt. Wiederholt man die Zyklen, wird die Anzahl der Matrizen-DNA exponentiell erhöht.

Die Real-time quantitative PCR (QPCR) ist eine Methode, die die Quantifizierung von mRNA bzw. cDNA erlaubt und basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Im Unterschied dazu bedient man sich hier eines Farbstoffes, welcher in die doppelsträngige DNA interkaliert, weshalb die Fluoreszenz doppelsträngiger DNA messbar erhöht wird. Ein großer Vorteil der QPCR ist die Quantifizierung der PCR-Produkte nach jedem Zyklus, also auch während der exponentiellen Phase. Dies ist bei der konventionellen PCR nicht möglich, da dort lediglich eine Endpunktbestimmung der PCR-Endprodukte erfolgt.

Im Gegensatz zu der konventionellen PCR werden bei der Durchführung der QPCR die vier Komponenten Primer, Reaktionspuffer, Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs) und die Polymerase nicht einzeln zupipettiert. In der käuflichen SYBR Green-Lösung sind nämlich neben dem eigentlichen Farbstoff, SYBR Green 490 (QPCR Mastermix mit SYBR-Green und Fluorescein, Thermo Scientific, Schwerte), die dNTPs, die Polymerase und der Reaktionspuffer schon enthalten. Infolge von Pipettierungenauigkeiten können sich in den einzelnen Löchern leicht unterschiedliche Fluoresceinmengen befinden. Zum Startpunkt der

PCR wird in jedem Loch der 96-Loch-PCR-Platte die Fluoresceinmenge bestimmt und die so ermittelten Pipettierungenauigkeiten „softwaremäßig“ ausgeglichen. Die Primer werden als Primer-Mix, bestehend aus „sense“- und „antisense“-Primern, zupipettiert, welche auf jeweils 1 pmol/μl eingestellt sind.

Somit ergibt sich folgender Reaktionsansatz (Mengenangaben pro Probe):

1,75 μl Primer-Mix (je 1 pmol/μl)
 9,75 μl H₂O_{bid.} (Aqua B. Braun, B. Braun, Melsung)
 12,5 μl SYBR Green 490-Lösung
 1 μl cDNA (200 ng/μl)

$$\Sigma = 25 \mu\text{l}$$

Nachdem die vier Komponenten in die Löcher der Micro AmpTM 96-Loch-Platten (Applied Biosystem, Darmstadt) pipettiert wurden, wurden diese mittels Abdeckfolie (Absolute QPCR Seal, Thermo Scientific, Schwerte) abgeklebt und die PCR entweder direkt im Thermocycler (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt oder bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Messung erfolgte im Thermozykler nach folgendem Protokoll:

Phase	Zyklen	Zeit	Temperatur [°C]
1	1	15 min	95
2	50	15 sek	95
		1 min	60
3	1	30 sek	95
		30 sek	60
		15 sek	95

2.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die grafische und statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit Hilfe von Sigma Plot 2001 sowie Excel. Die Bestimmung der Signifikanzen ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) wurde mittels des studentischen t-Tests errechnet und durch entsprechende Symbole, welche aus den Legenden zu entnehmen sind, gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Stimulation von BM-DCs mit Lipopolysaccharid (LPS) auf deren Phänotyp und Funktion

Die Generierung von BM-DCs aus Vorläuferzellen des Knochenmarks von C57BL/6-Mäusen erfolgte nach der Standardmethode von Scheicher *et al.* [1992], welche nach Lutz *et al.* [1999] modifiziert wurde. Nach der zehntägigen Kultivierung der Knochenmarkszellen in serumhaltigem IMDM-Kulturmedium, unter Zusatz von GM-CSF, befinden sich die differenzierten BM-DCs in einem immaturren Stadium.

Durch eine 24- bzw. 48-stündige Behandlung mit unterschiedlichen Stimuli lassen sich unreife BM-DCs zu reifen BM-DCs ausdifferenzieren, wodurch sie einen veränderten Phänotyp aufweisen. Als charakteristischstes Merkmal zeichnen sich die maturaen BM-DCs durch zahlreiche Ausläufer der Plasmamembran aus. Diese werden als Dendriten bezeichnet und verleihen den Zellen ein igelförmiges Aussehen (Abb. 4).

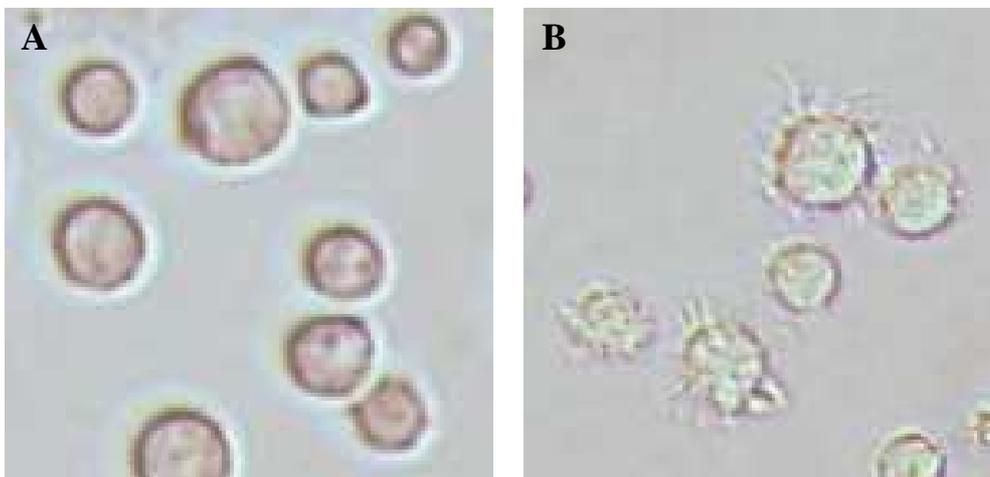


Abbildung 4: Morphologie von BM-DCs in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. (A): BM-DCs, unstimuliert (40-fache Vergrößerung) (B): BM-DCs mit 1 µg/ml LPS für eine Dauer von 48 Stunden stimuliert (40-fache Vergrößerung). Reife BM-DCs zeichnen sich durch ihre charakteristischen Dendriten aus, welche ihnen ein igelförmiges Aussehen verleihen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Stimuli zur Ausreifung der BM-DCs verwendet: 1.) Lipopolysaccharid (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$), eine Zellwandkomponente Gram-negativer Bakterien, 2.) Lipoteichonsäure (LTA, 10 ng/ml) und 3.) eine Kombination der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β (jeweils 10 ng/ml). Die Supplementierung der Kulturen mit dem jeweiligen Stimulus erfolgte entweder an Tag Acht oder an Tag Neun der BM-DC-Kultur und dauerte bis zum zehnten Tag an. Mit LPS stimulierte BM-DCs unterscheiden sich in ihrer Morphologie nicht von Zellen, die mit LTA oder TNF- α /IL-1 β stimuliert wurden.

Ein weiteres Charakteristikum reifer BM-DCs ist ihre verstärkte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie von kostimulatorischen Molekülen wie, CD40, CD80 und CD86. Diese Moleküle spielen bei der Interaktion zwischen DCs und T-Zellen eine wichtige Rolle und sind für die Aktivierung naiver T-Zellen essentiell.

Die Zellen unstimulierter, immaturer BM-DC-Kulturen weisen kaum CD40 und CD80 auf ihrer Oberfläche auf, während CD86 und MHC-Klasse-II-Moleküle von einem gewissen Prozentsatz (ca. 40%) der Zellen bereits verstärkt exprimiert wird (Abb. 5, obere Reihe).

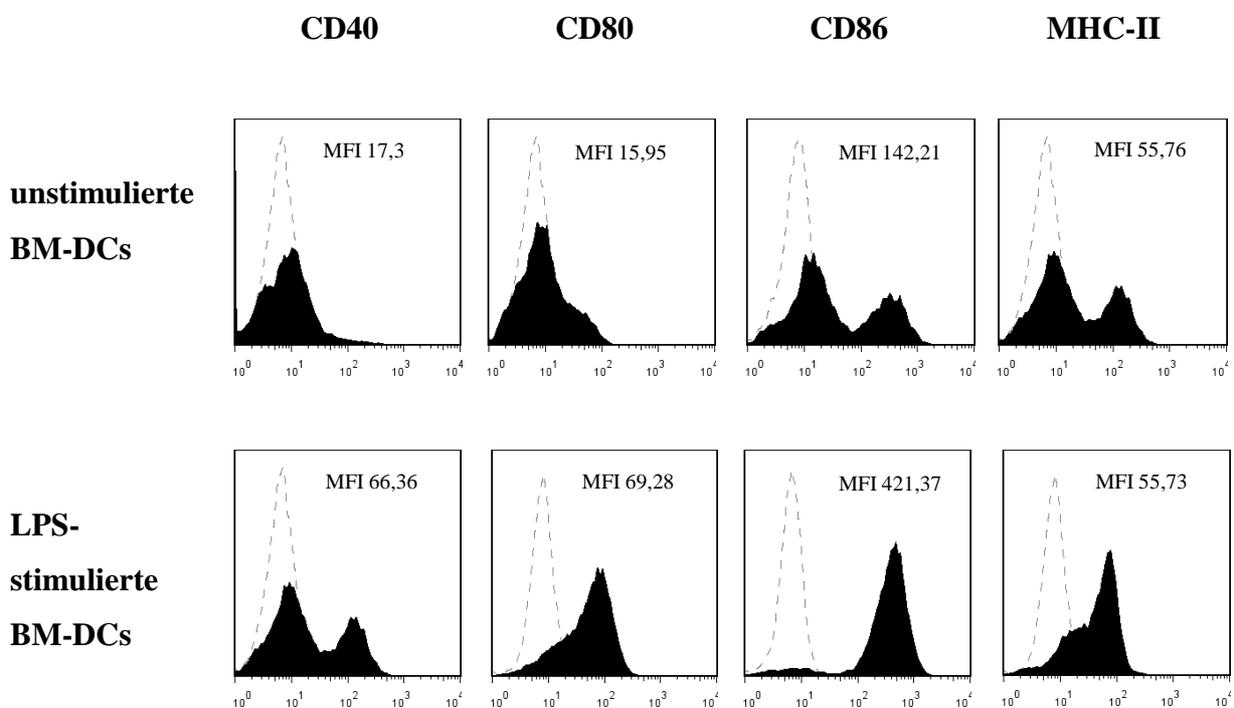


Abbildung 5: LPS-stimulierte BM-DCs zeigen im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Knochenmarks-Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

Die durch LPS induzierte Ausreifung der BM-DCs ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in diesem Stadium in verstärktem Ausmaß CD80, CD86 sowie MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren; auch CD40 wird von einem Großteil der BM-DCs in der Kultur exprimiert. Die erhöhte Expression von CD40, CD80 und CD86 spiegelt sich in einer Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wieder, während die verstärkte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nicht mit einer Erhöhung des MFI einhergeht. Jedoch sind auch Variationen in der Stärke der Expression der genannten Oberflächenmoleküle in den einzelnen Versuchen möglich, die in Abhängigkeit von der Präparation der BM-DC-Kultur auftreten können.

Mittels der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) wurde das Potential von BM-DCs zur Stimulierung naiver T-Zellen untersucht. Dazu wurden die BM-DCs, für eine Dauer von vier Tagen, mit allogenen T-Zellen aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Um die Eigenproliferation der BM-DCs in der Kokultur zu limitieren, wurden diese mittels einer Cäsium-Quelle mit 30 Gy (Gray) bestrahlt. Die dabei induzierten DNA-Strangbrüche verhindern die DNA-Replikation und somit die Proliferation der BM-DCs.

Während unstimulierte BM-DCs kaum in der Lage sind, allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen, weisen mit LPS stimulierte BM-DCs ein stark erhöhtes Stimulationspotential auf (Abb. 6-A). Für die ebenfalls untersuchten Ausreifungsstimuli LTA bzw. TNF- α plus IL-1 β zeigte sich eine zum LPS vergleichbar hohe Stimulierungskapazität (Abb. 6-B).

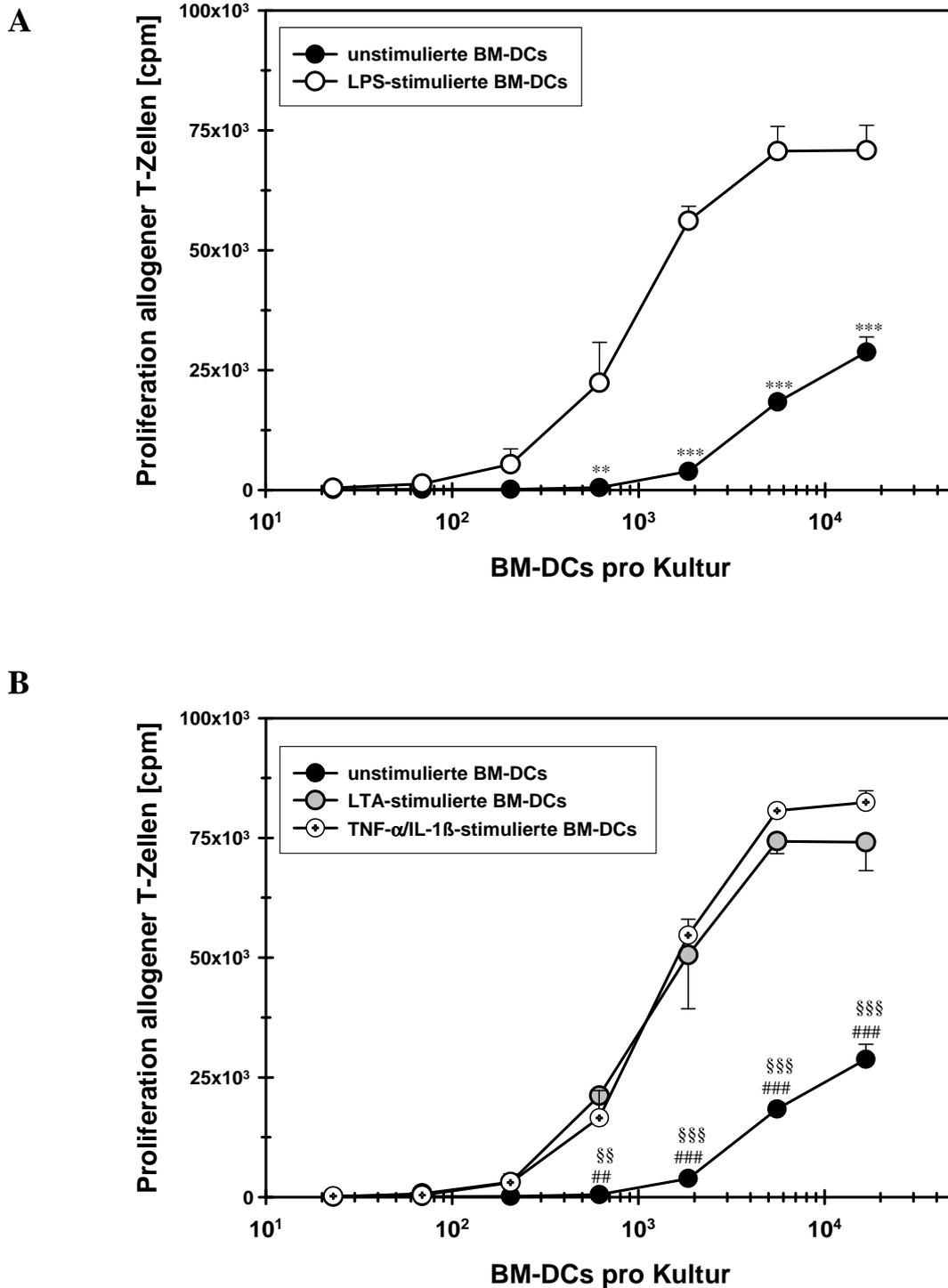


Abbildung 6: Mit einem Ausreifungsstimulus-behandelte BM-DCs verfügen, im Vergleich zu unstimulierten BM-DCs, über ein hohes Potential allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit (A) 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, (B) 10 $\mu\text{g/ml}$ LTA bzw. jeweils 10 ng/ml TNF- α /IL-1 β stimuliert oder blieben immatur. Anschließend wurden die BM-DCs mit 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von 0,25 $\mu\text{Ci}/\text{Loch}$ ^3H -Thymidin und weiterer Kultur für 18 Stunden gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt und sind repräsentativ für über 50 (LPS), sechs (LTA) bzw. acht (TNF- α /IL-1 β) unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten BM-DCs (** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$), LTA-stimulierten BM-DCs (## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$), bzw. TNF- α /IL-1 β -stimulierten BM-DCs (§§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

3.2 Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosaccharide auf den Phänotyp und die Funktion von BM-DCs

3.2.1 Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosaccharide auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs

Um den Einfluss von prebiotischen Oligosacchariden auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs zu untersuchen, wurden die Kulturen mit einer 9:1-Mischung aus kurzkettigen (short-chain) Galakto-Oligosacchariden und langkettigen (long-chain) Frukto-Oligosacchariden (scGOS/lcFOS), mit spezifischen enzymatisch aus Pektin gewonnenen sauren Oligosacchariden (pAOS) sowie mit einer Mischung neutraler Humanmilch-analoger Oligosaccharide (NOS) supplementiert. Diese Supplementierung erfolgte ab dem dritten Tag der BM-DC-Kultur sowie bei jedem weiteren Mediumwechsel. Kontrollkulturen erhielten anstelle der prebiotischen Oligosaccharide, Kulturmedium.

Übereinstimmend mit den zuvor dargestellten Ergebnissen (Abb. 5), führt die Stimulation immaturer BM-DCs mit LPS zu einer Ausreifung der Zellen, erkennbar vor allen Dingen an der verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (Abb. 7). Während die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit scGOS/lcFOS und pAOS, während ihrer Differenzierung und Ausreifung, keinen Einfluss auf die verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen nach der Stimulation mit LPS zeigte, bewirkte die Zugabe der NOS-Präparation zu den BM-DC-Kulturen eine deutliche Reduzierung der Expression der analysierten Moleküle. Die mit NOS behandelten BM-DCs wiesen demnach ein Expressionsmuster ähnlich dem unstimulierter, unbehandelter Kulturen auf.

Auch für unstimulierte BM-DCs ließ sich ein inhibitorischer Einfluss der Differenzierung in Anwesenheit von NOS-Präparationen nachweisen. BM-DCs stellen eine heterogene Population von Zellen dar, welche zu einem gewissen Anteil auch ohne exogene Stimulation Zellen beinhaltet, die einen erhöhten Reifegrad aufweisen und die relativ hohe Mengen an CD86 und an MHC-Klasse-II-Molekülen exprimieren (Abb. 8).

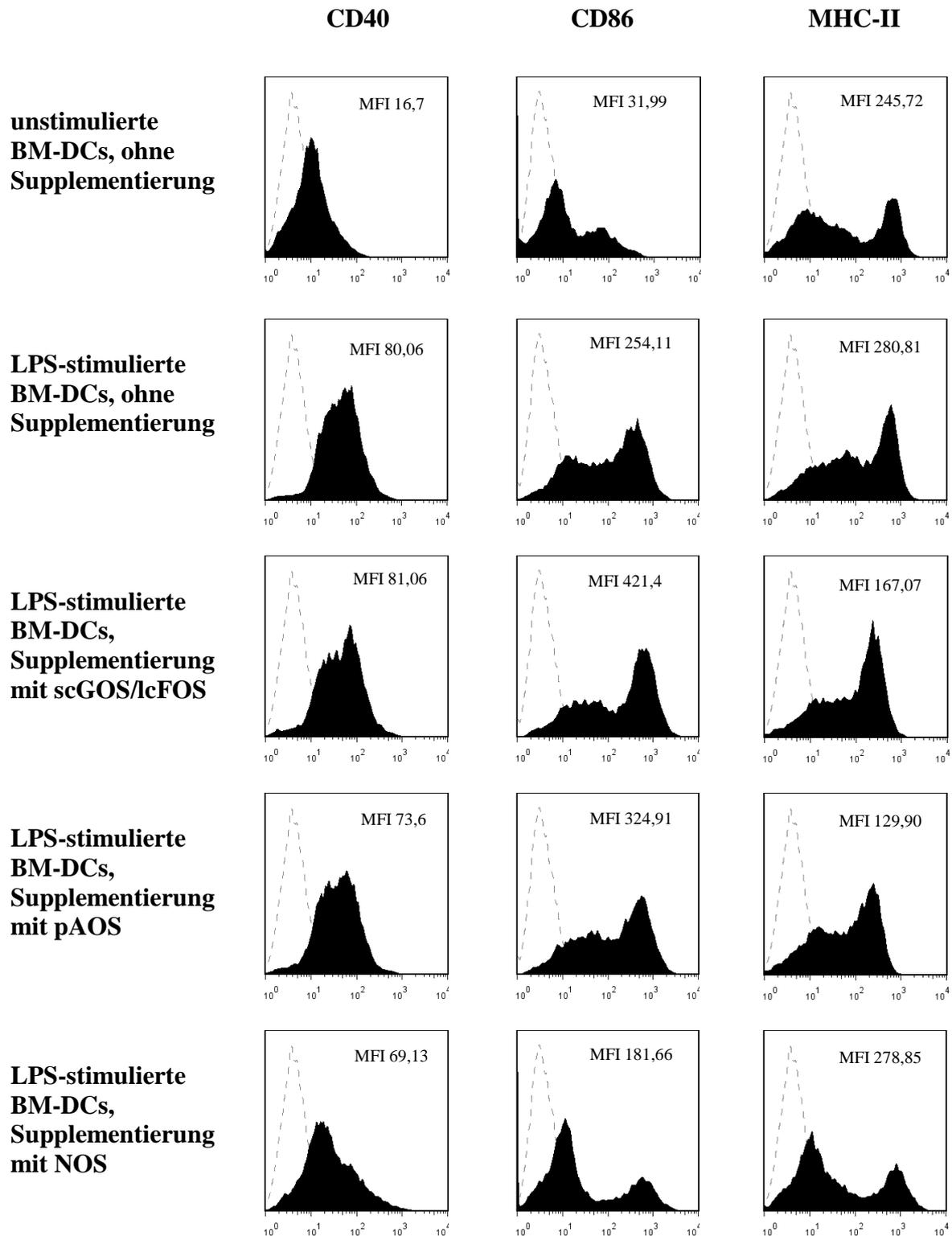


Abbildung 7: Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS, nicht jedoch von scGOS/lcFOS oder von pAOS, verhindert deren LPS-induzierte Ausreifung. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. In parallel angelegten Kulturen wurden diese ab dem dritten Kulturtag mit prebiotischen Oligosacchariden (NOS, scGOS/lcFOS und pAOS) supplementiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Wenn die BM-DCs jedoch ab dem dritten Kulturtag mit den NOS-Präparationen supplementiert werden, wird deren spontane Ausreifung deutlich reduziert, was insbesondere an der verminderten Expression von CD86 und MHC-Klasse-II-Molekülen sichtbar wird.

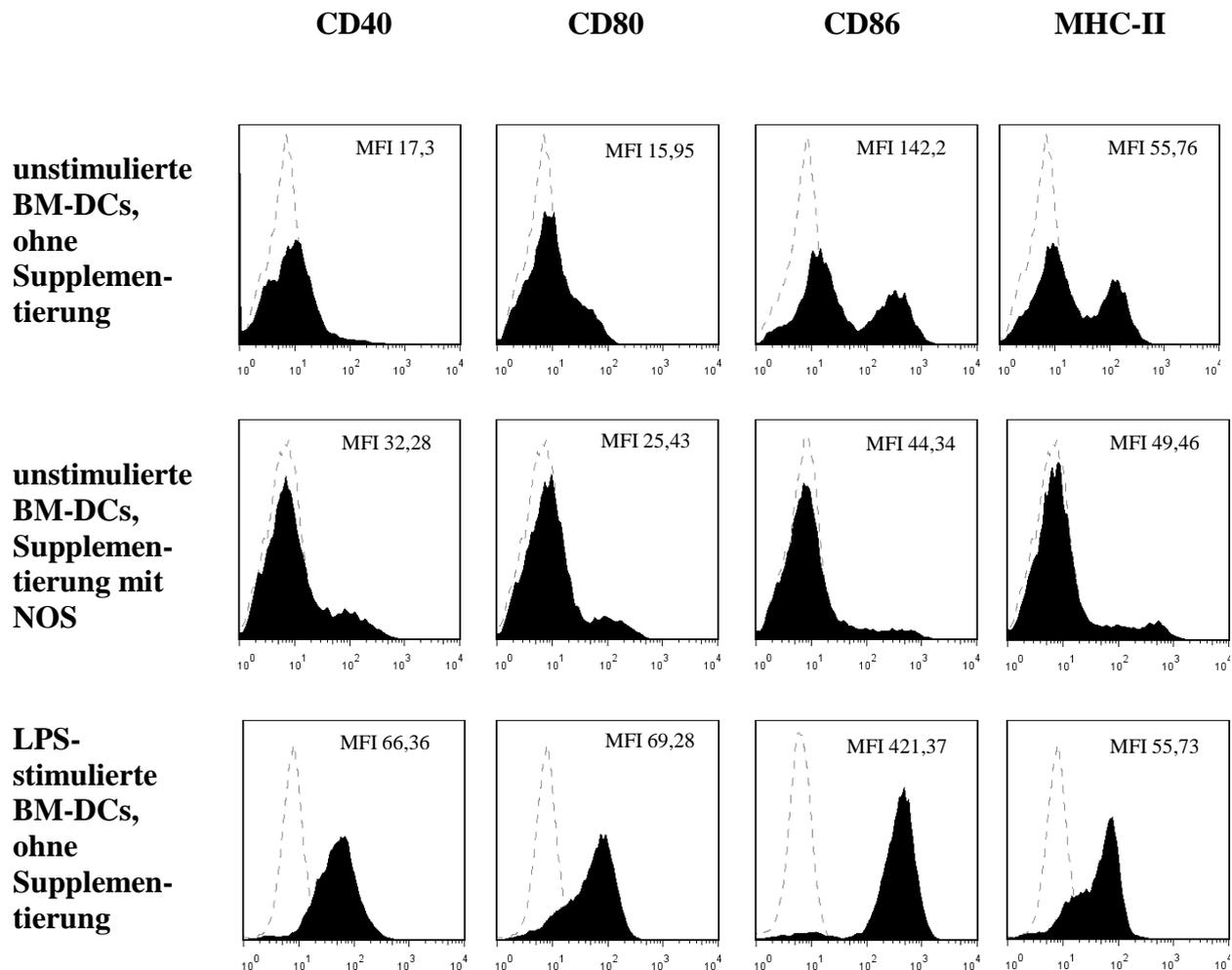


Abbildung 8: NOS verhindert die spontane Ausreifung immaturer BM-DCs. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Parallel wurde der unstimulierten BM-DC-Kultur NOS ab dem dritten Kulturtag zugegeben; eine anschließende Ausreifung mit LPS fand nicht statt. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für acht unabhängig von einander durchgeführte Experimente.

Um die Wirkung der NOS-Präparationen näher zu analysieren, wurde den BM-DC-Kulturen das NOS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur zugegeben. Hierzu wurden zwei Phasen der Kultivierung unterschieden, zum einen die Differenzierungsphase (von Tag Drei bis Acht

der Kultur) und zum anderen die Ausreifungsphase unter Zugabe von LPS (Tag Acht bis Zehn). Die BM-DC-Kulturen wurden nun, entweder wie zuvor, während der gesamten Kulturdauer, oder aber nur während der Differenzierungsphase bzw. nur während der Ausreifungsphase mit NOS supplementiert. Der Einfluss der Kultur mit NOS auf die durch LPS induzierte Ausreifung der BM-DCs wurde, durch den Vergleich mit nicht supplementierten Kulturen maturer BM-DCs, bestimmt.

In der Tat konnte hier gezeigt werden, dass eine späte Supplementierung der Kulturen mit den NOS-Präparationen (während der Ausreifungsphase) keinen Einfluss auf die durch LPS induzierte Maturierung der BM-DCs hat (Abb. 9): unbehandelte BM-DCs, die lediglich während der zweitägigen Ausreifungsphase mit NOS kultiviert wurden, wiesen eine ähnlich hohe Expression der Moleküle CD86 und MHC-Klasse-II und damit einen muren Phänotyp auf, wie nicht supplementierte, mit LPS stimulierte BM-DCs. Im Gegensatz dazu weisen BM-DCs, die ab dem dritten Kulturtag unter dem Einfluss von NOS stimuliert wurden, unabhängig von der Anwesenheit von NOS während der anschließenden Stimulation mit LPS, eine vergleichbar verminderte Expression dieser Moleküle auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die prebiotischen NOS-Präparationen relativ früh in der Differenzierungsphase der BM-DC-Kulturen ihren Wirkmechanismus entwickeln.

Eine durch die Kultur mit NOS herbeigeführte verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie der MHC-Klasse-II-Moleküle, wurde, über die hier dargestellten Versuche mit LPS hinaus, in der durchflusszytometrischen Analyse, auch für die Kombination der proinflammatorischen Zytokine TNF- α plus IL-1 β bzw. für den TLR-2-Liganden LTA als Ausreifungsstimulus gezeigt (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Studien wurde der Phänotyp der mit den NOS-Präparationen behandelten BM-DCs durchflusszytometrisch detailliert untersucht. Hierzu wurde zusätzlich zu den Molekülen CD86 und MHC-Klasse-II die Expression des Makrophagen-Markers F4/80, des für myeloide DCs charakteristischen Markers CD11c, des LPS-Rezeptors CD14 sowie die Expression von CD45, einem Marker für hämatopoetische Zellen, analysiert. Wie aus der Abbildung 10 ersichtlich, wird die Expression der genannten Moleküle nach Supplementierung mit NOS-Präparationen sowohl bei unstimulierten als auch bei LPS-stimulierten BM-DCs nicht verändert.

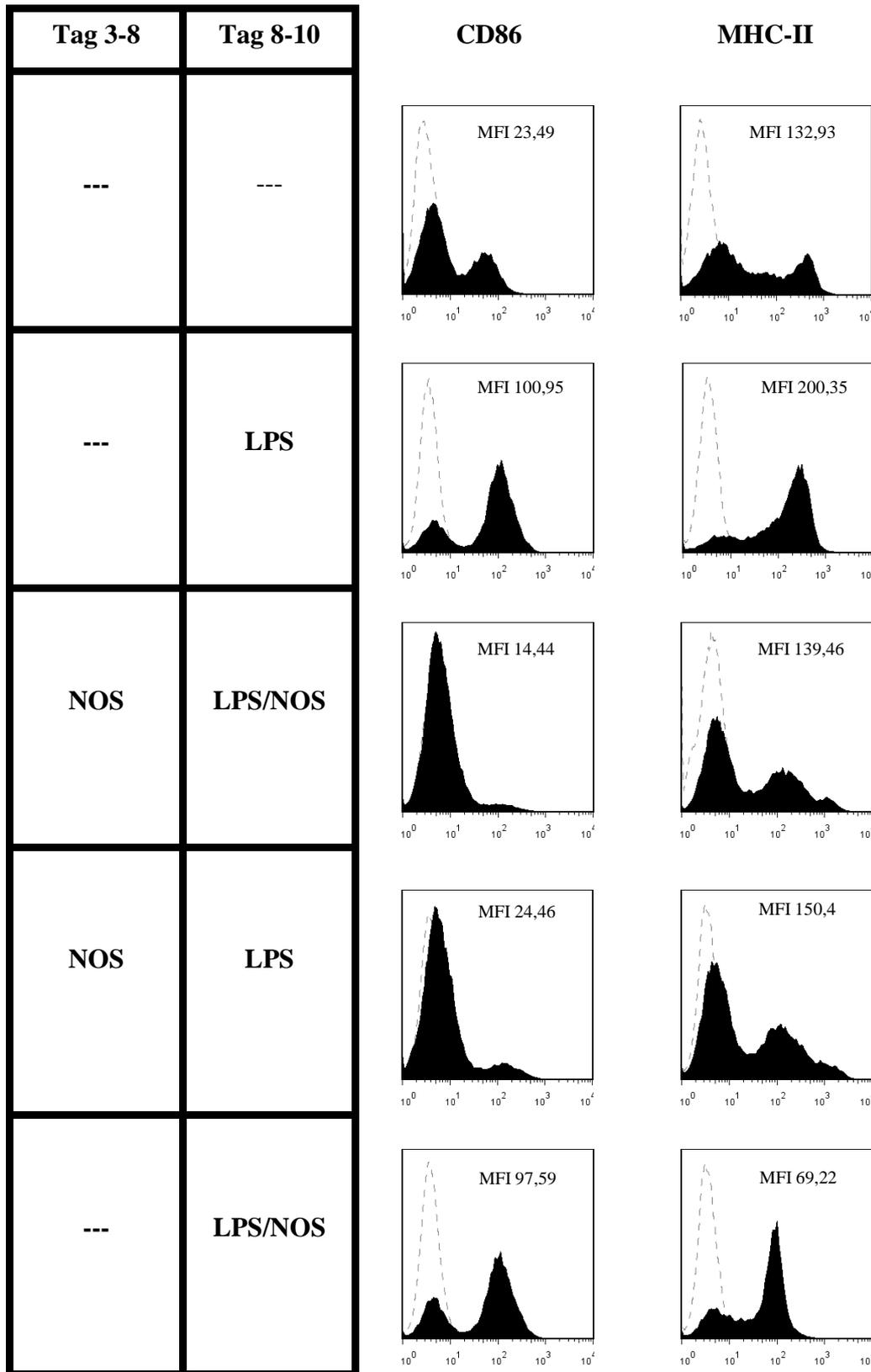


Abbildung 9: Die Kultur in Gegenwart von NOS-Präparationen beeinflusst die Differenzierung von BM-DCs. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert (Differenzierungsphase) und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert (Ausreifungsphase). Parallel wurden Kulturen entweder in der Differenzierungsphase oder in der Ausreifungsphase oder über die gesamte Kulturdauer mit NOS supplementiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig von einander durchgeführte Experimente.

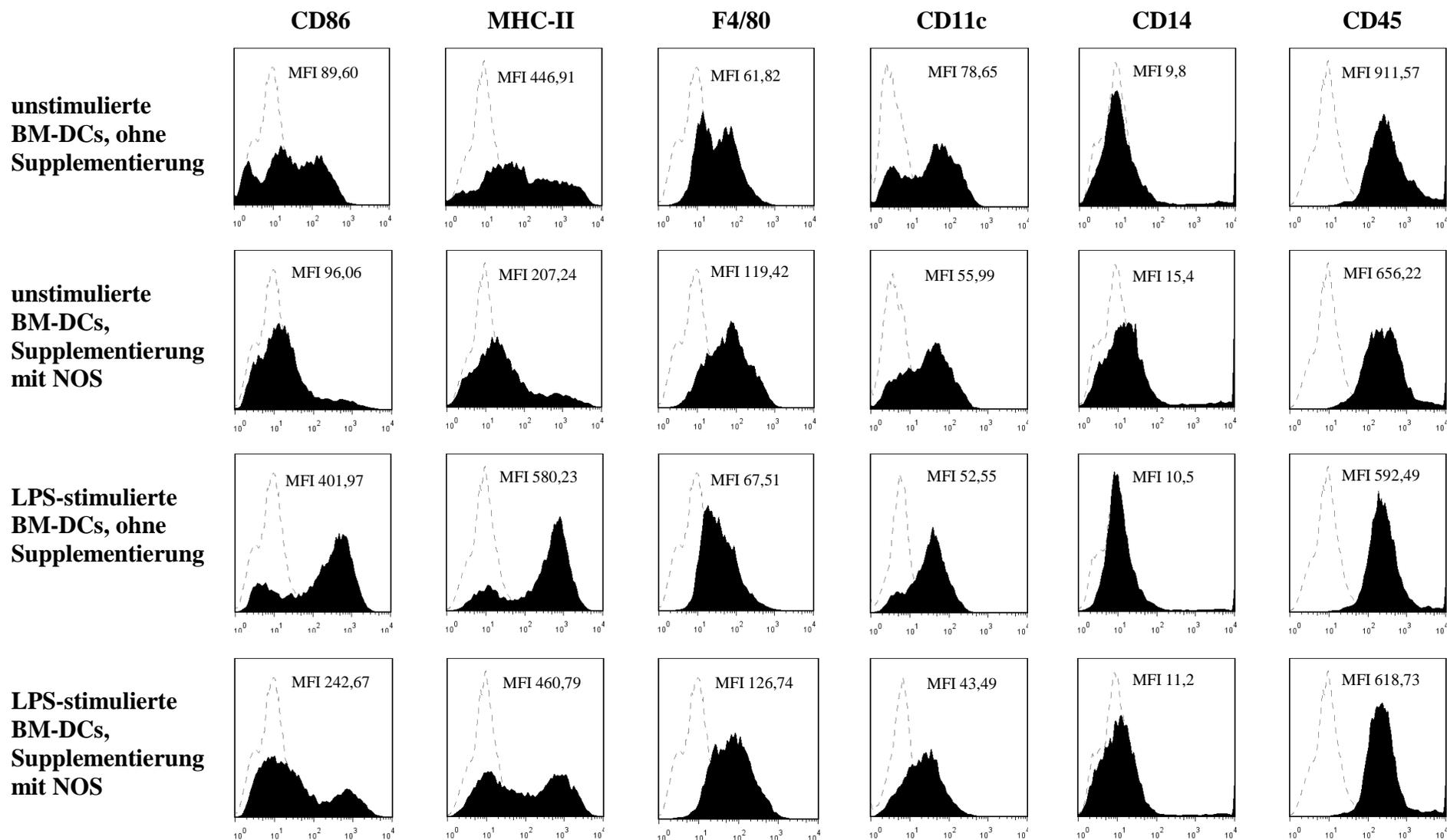


Abbildung 10: Phänotypische Charakterisierung von mit NOS-Präparationen behandelten BM-DCs. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Parallel wurden immature bzw. mature Kulturen ab dem dritten Kulturtag mit NOS-Präparationen supplementiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte graue Linie dargestellt.

Das charakteristische DC-Oberflächenmolekül CD11c wird in unbehandelten und mit NOS-Präparationen behandelten Kulturen gleichermaßen stark exprimiert und auch der Makrophagenmarker F4/80 bleibt unverändert. Somit handelt es sich bei den generierten Zellen um DCs; in der Literatur konnte ebenfalls gezeigt werden, dass F4/80 auf DCs exprimiert wird [Masurier *et al.*, 1999].

3.2.2 Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen verändert das Genexpressionsprofil der Zellen nach deren Stimulation mit LPS

Zur Analyse des Einflusses von NOS-Präparationen auf die Genexpression von BM-DCs wurden, auf molekularer Ebene, relative mRNA-Mengen mittels der Realtime-PCR bestimmt. Für eine endogene Kontrolle wurde das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC) herangezogen, dessen Expression sich bei der Ausreifung der BM-DCs nicht verändert. Bei der Auswertung der Daten wurde auf die mRNA-Expression unstimulierter unbehandelter BM-DCs normiert. Im Rahmen der Analyse wurde die mRNA-Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie des Aktinbündelungsproteins Fascin, welches bei der Ausbildung der Dendriten eine zentrale Rolle spielt, quantifiziert. Weiterhin wurde die Expression der beiden koinhibitorischen Moleküle B7-H3 und Fc γ RIIB sowie der beiden Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1 untersucht.

In Übereinstimmung mit den Resultaten aus den FACS-Analysen wurde anhand der Daten aus der Bestimmung der mRNA-Expression gezeigt, dass die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 nach Stimulation der BM-DCs mit LPS beträchtlich erhöht ist (Abb. 11). Die mRNA für das Aktinbündelungsprotein Fascin wird nach LPS-induzierter Maturierung der BM-DCs ebenfalls deutlich erhöht exprimiert. Der Zusatz von NOS-Präparationen während der Differenzierung der BM-DCs führt dazu, dass nach ihrer Stimulation der Anstieg in der mRNA-Expression für die betrachteten Moleküle vermindert ist, die Expression von Fascin-mRNA verbleibt sogar auf dem Niveau der unstimulierten BM-DCs. Allerdings ist die verminderte Expression der Moleküle nur im Falle von Fascin statistisch signifikant.

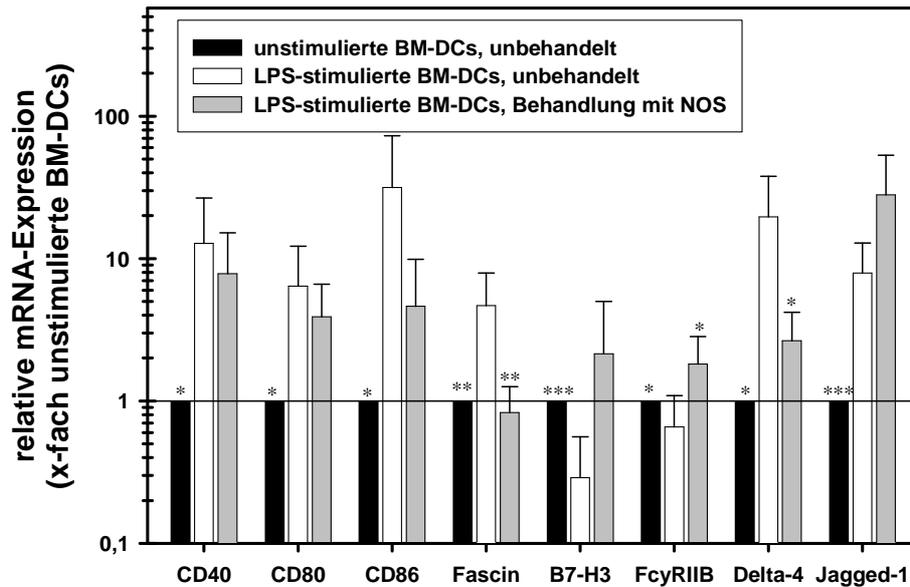


Abbildung 11: Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen verändert das Genexpressionsmuster der Zellen nach deren Stimulation mit LPS. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die BM-DCs wurden geerntet, ihre RNA wurde isoliert und die cDNA wurde hergestellt. Die mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen wurde mittels Realtime-PCR ermittelt, die Expression der mit LPS stimulierten BM-DCs (in Ab- und Anwesenheit von NOS) wurde zu der Expression der unstimulierten BM-DCs in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus neun unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

Die koinhibitorischen Moleküle B7-H3 und FcγRIIB werden, im Vergleich zu unstimulierten BM-DCs, in LPS-stimulierten BM-DCs schwächer exprimiert und in Kulturen unter Zusatz der NOS-Präparation deutlich stärker exprimiert.

Die Expression der beiden Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1, deren Verhältnis für eine Aussage über die Th-Polarisierung von Bedeutung ist, wird nach LPS-Behandlung erhöht. Während die Expression des Delta-4 nach Kultur unter Zusatz von NOS-Präparationen signifikant vermindert wird, bleibt die Expression des Jagged-1 unverändert; so wird eher eine Polarisierung der Effektorzellen in Th2 als in Th1 unterstützt.

Somit werden die durch LPS induzierten Genexpressionsänderungen durch den Zusatz der NOS-Präparationen vermindert.

3.2.3 Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen auf deren Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS

Die Quantifizierung der Produktion der Zytokine IL-10 und IL-12 durch BM-DCs wurde parallel sowohl auf mRNA-Ebene (mittels RT-PCR) als auch auf Proteinebene (mittels ELISA) durchgeführt.

In Abbildung 12-A ist dargestellt, dass, im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, die Expression von IL-10-mRNA nach LPS-Stimulation von BM-DCs zunimmt. Auf Proteinebene ist ebenfalls eine gesteigerte IL-10-Sekretion nach LPS-Stimulation der BM-DCs zu erkennen (Abb. 12-B).

Die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen hat keinen Einfluss auf deren Kapazität, nach der LPS-induzierten Ausreifung, IL-10 zu produzieren.

Das IL-12-Protein besteht aus den beiden Untereinheiten IL-12 p35 und p40, die durch eigene Gene kodiert werden; beide Untereinheiten wurden mittels RT-PCR analysiert. Erst wenn beide Untereinheiten auf gleiche Weise reguliert werden, kann eine Veränderung im ELISA, anhand des Proteins IL-12 p70, detektiert werden.

Die mRNA-Expression der beiden Untereinheiten p35 und p40 (Abb. 12-A) wird nach LPS-Stimulation erhöht; somit ergibt sich eine Übereinstimmung zu den in den Kulturüberständen gemessenen IL-12p70-Mengen (Abb. 12-B). Nach Kultur der BM-DCs unter Zusatz der NOS-Präparationen wird zwar die mRNA der Untereinheit p35 des Zytokins IL-12 erhöht exprimiert, die mRNA der Untereinheit p40 wird jedoch vermindert exprimiert. IL-12p70, welches auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt wird, wird nach Supplementierung mit NOS unverändert, im Vergleich zu LPS-stimulierten Kulturen, sekretiert, vermutlich weil p35 als limitierende Untereinheit weniger produziert wird.

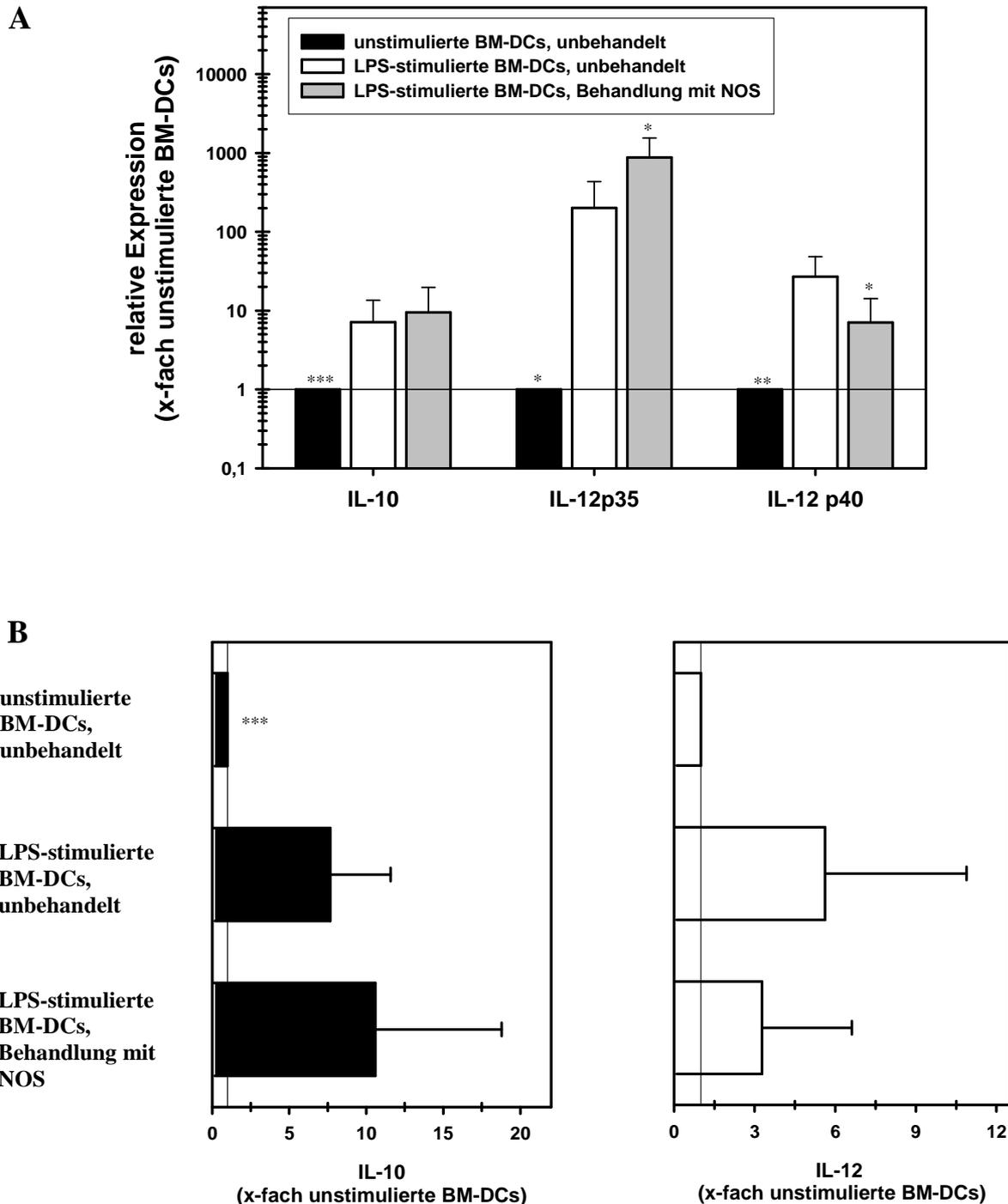


Abbildung 12: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen auf die Produktion von IL-10 und IL-12. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die BM-DCs wurden geerntet, ihre RNA wurde isoliert und die cDNA wurde hergestellt. Die mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen wurde mittels Realtime-PCR ermittelt, die Expression in den mit LPS stimulierten BM-DCs (in Ab- und Anwesenheit von NOS) wurde zu der Expression in den unstimulierten BM-DCs in Relation gesetzt (**A**). Parallel wurden Kulturüberstände genommen und mittels ELISA wurde die Konzentration von IL-10 und IL-12 in den Überständen ermittelt. Diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (140 pg/ml IL-10 bzw. 2 pg/ml IL-12) in Relation gesetzt (**B**). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus neun (**A**) und elf (**B-IL-10**) bzw. fünf (**B-IL-12**) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

3.2.4 Einfluss verschiedener prebiotischer Oligosaccharide auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs *in vitro*

Der Effekt der Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit prebiotischen Oligosacchariden auf deren Kapazität zur Stimulation naiver T-Zellen wurde mittels der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) untersucht. Dazu wurden BM-DCs ab dem dritten Tag der Kultur unter dem Einfluss von scGOS/lcFOS, pAOS und NOS-Präparationen differenziert, mit LPS stimuliert und anschließend für die Dauer von drei Tagen mit allogenen T-Zellen kokultiviert.

Unstimulierte, immature BM-DCs sind kaum in der Lage, T-Zellen zur Proliferation anzuregen; mit LPS stimulierte BM-DCs weisen hingegen ein hohes Potential zur Aktivierung der T-Zell-Proliferation auf. Die Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen, vermindert nach der Stimulation mit LPS, signifikant deren T-Zell-stimulatorische Kapazität. Im Vergleich zu der Proliferation von T-Zellen, welche durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wird, ergibt sich eine Inhibition, die in Abhängigkeit von der Anzahl der BM-DCs in der Kokultur mit den allogenen T-Zellen zwischen 33% und 47% liegt (Abb. 13-A und B). Im Gegensatz dazu hat eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit scGOS/lcFOS bzw. pAOS keinen signifikanten Einfluss auf deren stimulatorische Kapazität für naive T-Zellen (Abb. 14-A und B).

Die in der durchflusszytometrischen Analyse beobachtete inhibitorische Wirkung von NOS-Präparationen auf die Differenzierung von unstimulierten BM-DCs wurde aufgrund der Daten zur T-Zell-Stimulation durch BM-DCs in der MLR bestätigt. Unstimulierte BM-DCs, die über die gesamte Kulturdauer mit NOS-Präparationen supplementiert wurden, wiesen dabei, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, ein reduziertes T-Zell-stimulatorisches Potenzial auf (Abb. 15-A).

Wie zuvor bereits anhand der durchflusszytometrischen Analyse des Phänotyps von BM-DCs, die mit NOS-Präparationen kultiviert wurden, gezeigt, wirken die NOS-Präparationen während der initialen Differenzierung der DCs. Diese Feststellung bestätigte sich durch die Resultate der MLR. Wie aus Abb. 15-B ersichtlich, induzieren BM-DCs, welche lediglich während der zweitägigen Ausreifungsphase mit NOS-Präparationen kultiviert wurden, eine vergleichbar hohe T-Zell-Proliferation wie unbehandelte Kulturen. BM-DCs hingegen, die lediglich während der Differenzierungsphase ab Tag Drei bis Tag Acht mit NOS-Präparationen behandelt und danach ohne Anwesenheit von NOS mit LPS ausgereift wurden,

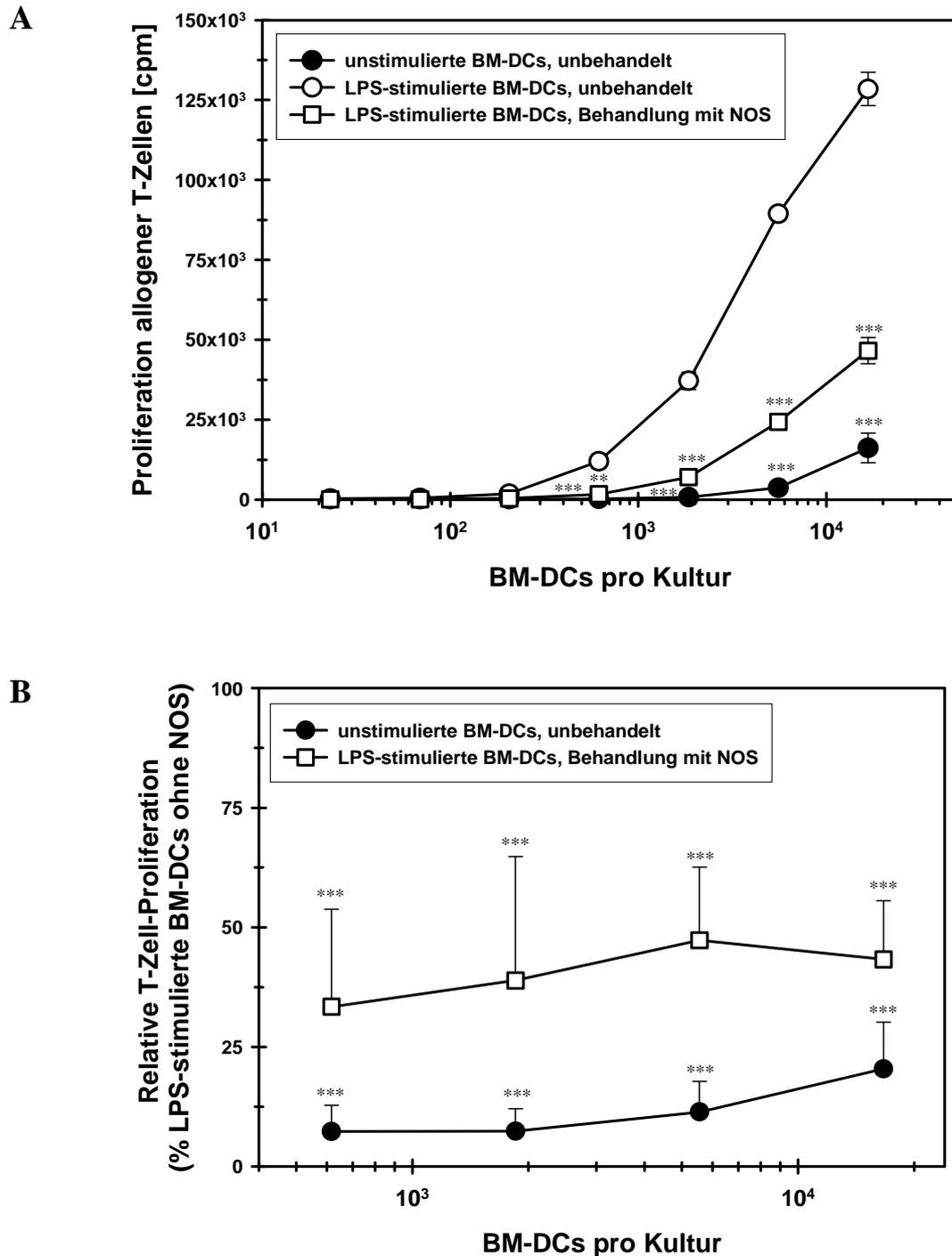


Abbildung 13: Die Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen resultiert in einem verminderten Potential der BM-DCs zur Stimulation allogener T-Zellen. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs mit 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen BALB/c-T-Zellen (3×10^5 /Loch) für 72 Stunden kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Anschluss durch Zugabe von 0,25 µCi/Loch ^3H -Thymidin für 18 Stunden gemessen. Abbildung (A) zeigt eine repräsentative Graphik zur durchgeführten MLR; dabei sind die Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. In der Abbildung (B) ist die relative allogene T-Zell-Proliferation in Bezug zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (festgesetzt als 100%) dargestellt. In dieser Grafik wurden Mittelwerte aus acht unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kokulturen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

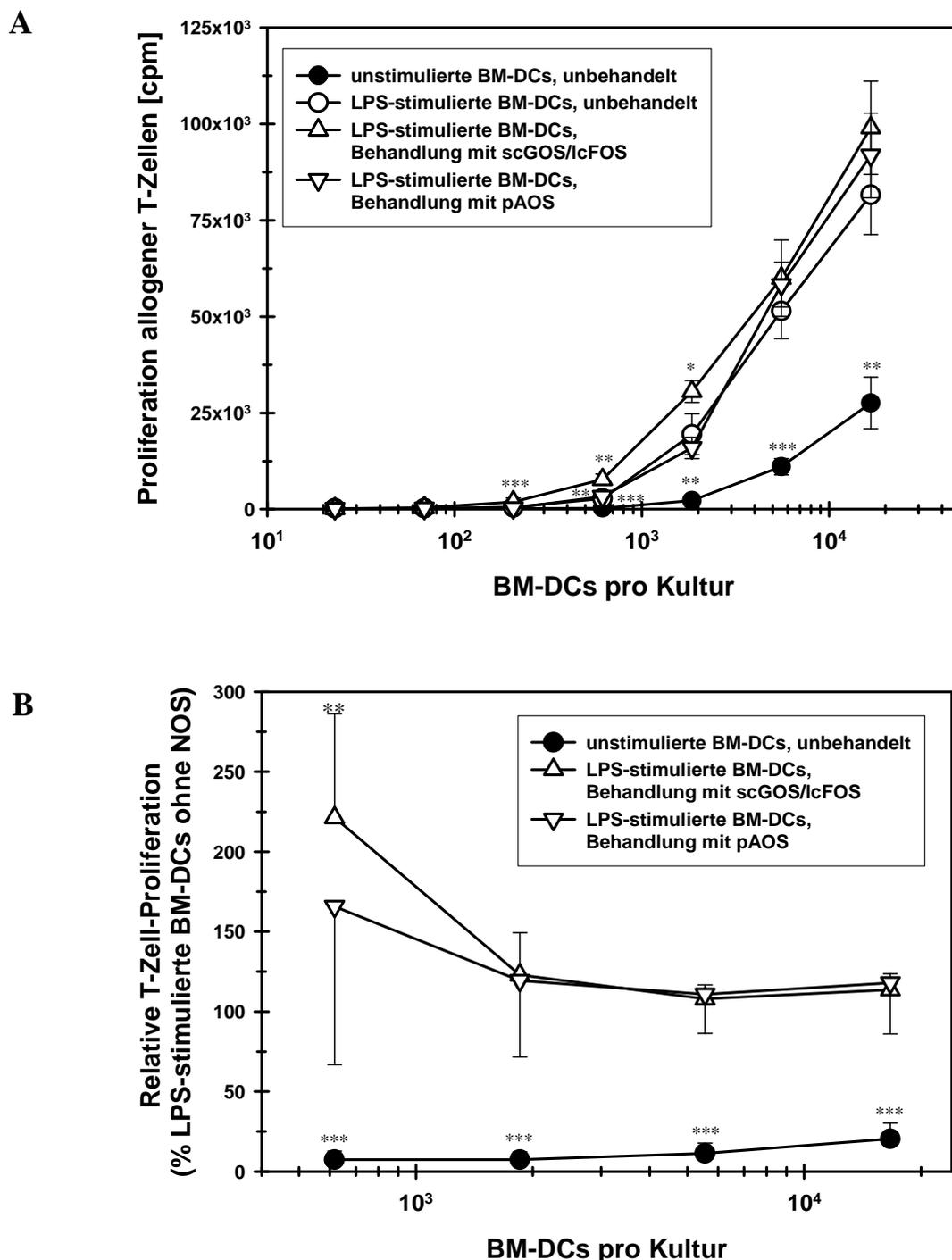


Abbildung 14: Die Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit scGOS/lcFOS bzw. pAOS resultiert in keinem verminderten Potential der BM-DCs zur Stimulation allogener T-Zellen. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von scGOS/lcFOS- bzw. pAOS für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs mit 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen BALB/c-T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) für 72 Stunden kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Anschluss durch Zugabe von 0,25 $\mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin für 18 Stunden gemessen. Abbildung (A) zeigt eine repräsentative Graphik zur durchgeführten MLR; dabei sind die Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. In der Abbildung (B) ist die relative allogene T-Zell-Proliferation in Bezug zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (festgesetzt als 100%) dargestellt. In dieser Grafik wurden Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kokulturen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

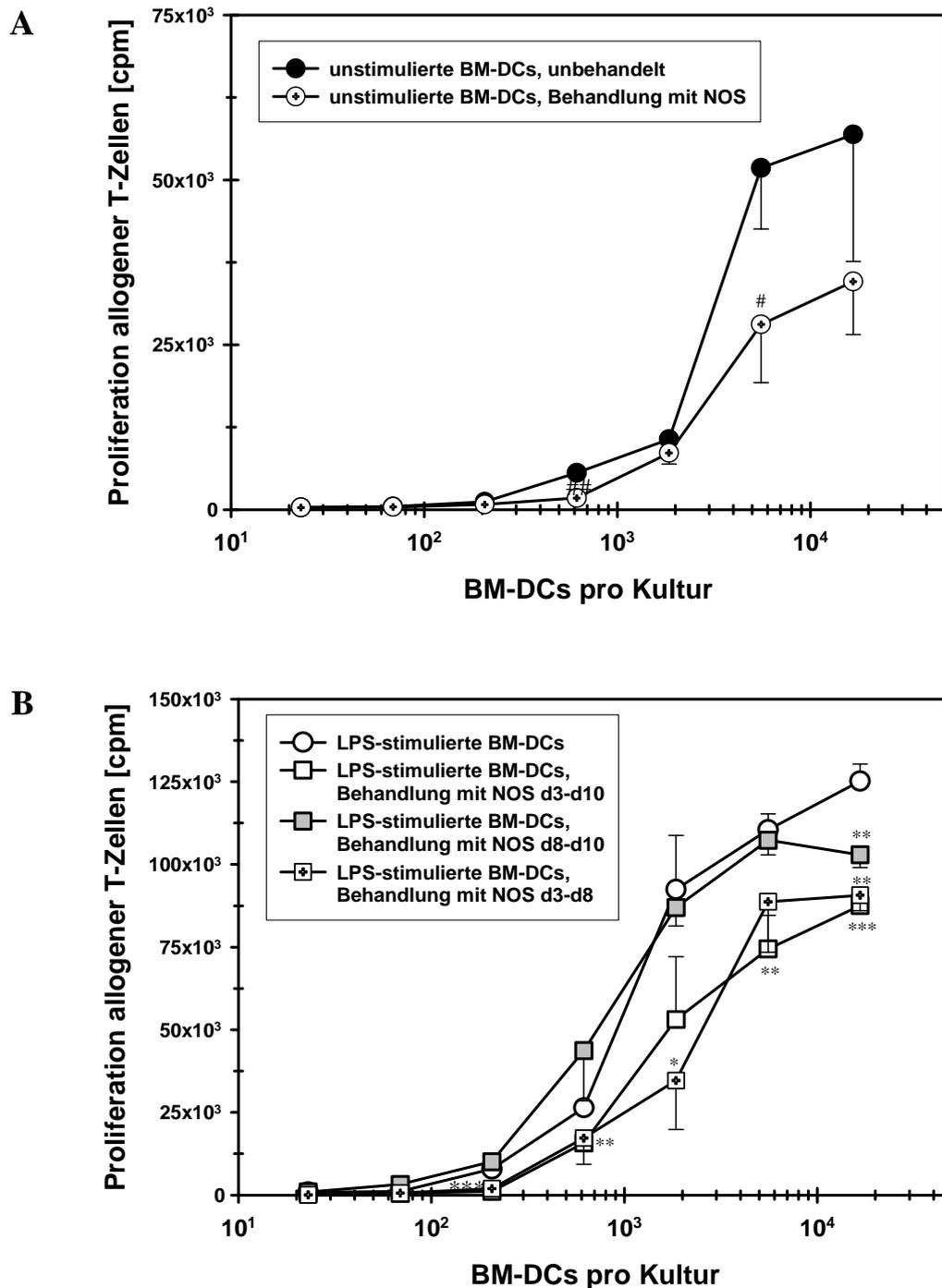


Abbildung 15: Die Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen während der Differenzierungsphase, nicht aber während der Ausreifungsphase, inhibiert die T-Zell-stimulatorische Kapazität. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert (A) und/oder für zwei weitere Tage in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen mit 1 µg/ml LPS stimuliert (B). Anschließend wurden die BM-DCs mit 3000 rad bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen BALB/c-T-Zellen (3×10^5 /Loch) für 72 Stunden kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Anschluss durch Zugabe von 0,25 µCi/Loch ^3H -Thymidin für 18 Stunden gemessen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dar. In (A) zeigen die Symbole signifikante Unterschiede zu unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$) bzw. (B) zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

weisen ähnlich wie BM-DCs, die während der Differenzierung und der Ausreifung mit NOS-Präparationen konfrontiert wurden, eine verminderte Kapazität zur Induktion der T-Zell-Proliferation auf.

In einem weiteren Versuch (Abb. 16) wurde gezeigt, dass durch den Einfluss der Kultur mit NOS-Präparationen die Aktivierungsschwelle der BM-DCs deutlich heraufgesetzt ist. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen von LPS für die Ausreifung von BM-DCs verwendet, die in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von NOS-Präparationen differenziert wurden. Anschließend wurden diese BM-DCs in eine MLR mit allogenen T-Zellen eingesetzt.

Bei allen LPS-Konzentrationen, die zur Stimulation von mit NOS-Präparationen behandelten BM-DCs verwendet wurden, wird deutlich, dass die T-Zell-Proliferation nach Kultur mit diesen BM-DCs im Vergleich zu der Proliferation, die durch unbehandelte BM-DCs induziert wird, deutlich herabgesetzt ist. Dabei ist nicht nur die absolute Proliferation der T-Zellen unter Kultur der BM-DCs mit NOS-Präparationen signifikant geringer, sondern es ist auch, zur Erringung einer vergleichbaren Proliferation der T-Zellen durch NOS-behandelte BM-DCs, ungefähr 10-mal mehr LPS nötig. Somit bedeuten die Resultate in ihrer Gesamtheit, dass die Aktivierungsschwelle der BM-DCs durch die Differenzierung in Anwesenheit der NOS-Präparationen deutlich erhöht ist.

Weiterhin wurde evaluiert, ob auch syngene T-Zellen nach Kontakt mit NOS-behandelten BM-DCs, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, eine Hypoproliferation aufweisen. Hierzu wurden naive OT-II-T-Zellen verwendet, die einen OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) exprimieren und spezifisch das aus dem OVA stammende kognitive Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉, präsentiert durch das MHC-Klasse-II-Molekül I-A^b, erkennen. Die OT-II-T-Zellen wurden mit BM-DCs kokultiviert, die zuvor mit dem OVA-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ inkubiert wurden. Das Potenzial der BM-DCs zur Stimulation der T-Zellen wurde dabei auf zweifache Weise bestimmt: zum einen wurde die Proliferation der T-Zellen durch den Einbau von ³H-Thymidin gemessen, zum anderen wurde die Proliferation mittels einer durchflusszytometrischen Analyse nach CFSE-Färbung der OVA-transgenen T-Zellen bestimmt.

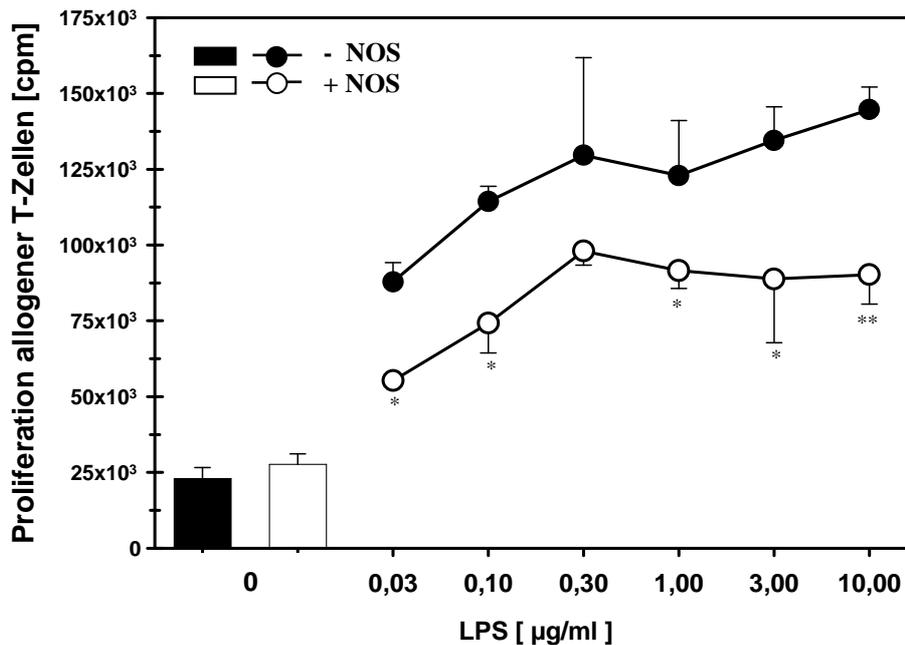
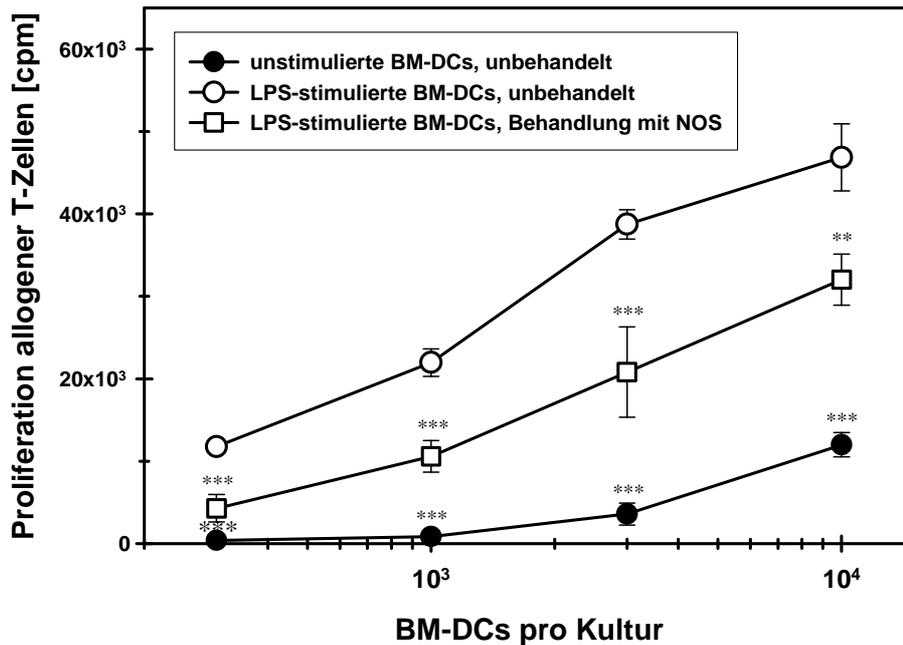


Abbildung 16: Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen erhöht deren Aktivierungsschwelle. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden in Abwesenheit (schwarze Balken und Symbole) bzw. Anwesenheit (weiße Balken und Symbole) von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit den dargestellten LPS-Konzentrationen ausgereift. Anschließend wurden die BM-DCs mit 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen BALB/c-T-Zellen (3×10^5 /Loch) für 72 Stunden kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Anschluss durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci/Loch } ^3\text{H-Thymidin}$ für 18 Stunden gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig von einander durchgeführte Experimente. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kulturen mit unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

In der Abbildung 17-A ist dargestellt, dass LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs ein hohes Potential zur Stimulierung von OT-II-T-Zellen besitzen, während unstimulierte BM-DCs kaum in der Lage sind, die T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen führt dazu, dass analog zu der allogenen Stimulation von T-Zellen auch die Induktion der Proliferation syngener T-Zellen durch solchermaßen behandelte BM-DCs signifikant auf etwa 50% reduziert ist.

Dieses Resultat wurde mittels der durchflusszytometrischen Bestimmung der Proliferation der T-Zellen, welche zuvor mit dem Lebendfarbstoff CFSE markiert wurden, verifiziert. CFSE bindet zelluläre Proteine, was zur Folge hat, dass sich die Fluoreszenzintensität der markierten OT-II-T-Zellen bei Zellteilungen seriell halbiert. Das erhöhte Potenzial der LPS-stimulierten BM-DCs zur Aktivierung naiver T-Zellen wird in diesem System darin deutlich, dass in dem

A



B

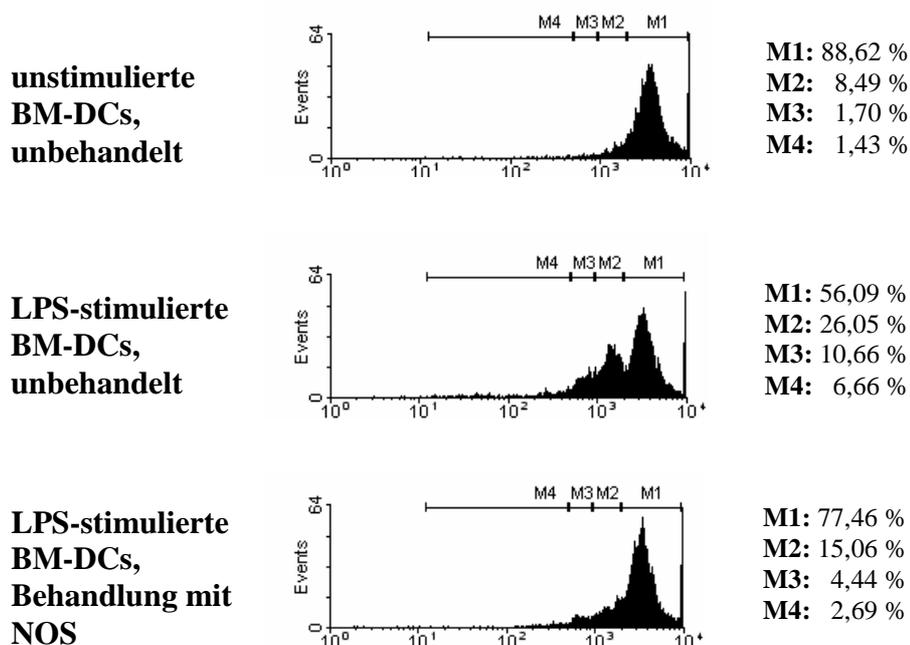


Abbildung 17: Eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen resultiert in einem verminderten Potential der BM-DCs zur Stimulation syngener OT-II-T-Zellen. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs für eine Dauer von ca. drei Stunden mit dem OVA-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ inkubiert, bei 30 Gy bestrahlt und mit OVA-TCR-transgenen OT-II-T-Zellen (5×10^4 /Loch) kokultiviert. (A) Nach 48 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von 0,25 µCi/Loch ³H-Thymidin und weiterer Kultur für 18 Stunden gemessen. Die Graphik ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente; dabei sind die Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kokulturen mit LPS-stimulierten unbehandelten BM-DCs (** = P<0,01; *** = P<0,001). (B) Für die Messung der Proliferation wurden OT-II-T-Zellen zu Beginn des Versuches mit CFSE markiert. Die Fluoreszenzintensität der T-Zellen wurde nach 48 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Graphik ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. M1-M4 geben die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der proliferierenden T-Zellen in den gesetzten Abschnitten (M) in Prozent an.

untersuchten Zeitraum nach der Kokultur zwei bis drei Zellteilungszyklen (M2-M4) der T-Zellen durchflusszytometrisch nachweisbar sind, während unstimulierte BM-DCs nur in geringer Frequenz eine Zellteilung in den OT-II-T-Zellen induzieren (Abb. 17-B). Im Gegensatz zu den stimulierten, unbehandelten BM-DCs ist die durch die mit NOS-Präparationen behandelten BM-DCs induzierte T-Zellteilung vermindert; die Frequenz der Zellen, die eine (M2) oder zwei (M3) Zellteilungen durchlaufen haben, ist hier stark herabgesetzt. Die in Anwesenheit der NOS-Präparationen differenzierten BM-DCs weisen somit eine reduzierte Kapazität zur Stimulation sowohl allogener als auch syngener T-Zellen auf.

3.2.5 Einfluss von NOS-Präparationen auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs *in vivo*

Um die Wirkung der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen auf die primärstimulatorische Kapazität der DCs, nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* zu analysieren, erfolgte ein subkutaner Transfer von BM-DCs des Mausstammes C57BL/6, welcher nach dem Protokoll von Warncke *et al.* [2006], unter serumfreien Bedingungen, differenziert wurden, in die Fußsohlen von BALB/c Mäusen. Die Stärke der durch den DC-Transfer *in vivo* ausgelösten Aktivierung allogener T-Zellen wurde dadurch bestimmt, indem den Rezipienten nach sieben Tagen die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen wurden und die daraus präparierten Lymphknotenzellen *in vitro* mit syngenen (BALB/c) sowie allogenen (C57BL/6, FVB/N) Milzzellen als APCs stimuliert wurden. Die BM-DCs wurden vor dem Transfer über eine Dauer von sieben Tagen aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit LPS ausgereift. In parallelen Kulturen wurden BM-DCs ab dem zweiten Tag sowie auch während der zweitägigen Ausreifung mit NOS-Präparationen supplementiert. Pro Gruppe wurden jeweils drei Mäusen die unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs transferiert. Zur Bestimmung der Höhe der Primärstimulation der Lymphknotenzellen in der MLR *in vitro* wurde Kontrolltieren PBS in die Fußsohlen gespritzt.

Mit Hilfe dieses Mausmodells wurde analysiert, in wieweit mit NOS-Präparationen behandelte BM-DCs die Proliferation von allospezifischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten induzieren können. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass BM-DCs bei

Kultivierung in FCS-haltigem Medium Serumbestandteile aufnehmen, prozessieren und präsentieren, was nach Transfer *in vivo* zu einer unerwünschten Aktivierung von FCS-spezifischen T-Zellen führte. Um eine FCS-spezifische Restimulation der Lymphknotenzellen in dem in FCS-haltigem Medium durchgeführten Proliferationstest *in vitro* ausschließen zu können, wurden die BM-DCs vor dem Transfer in einem serumfreien Medium, dem sogenannten Cellgro-Medium, generiert. Die Kulturdauer der BM-DCs beträgt unter serumfreien Bedingungen insgesamt neun Tage; die Supplementierung der BM-DC-Kulturen erfolgte dabei bereits ab dem zweiten Kulturtag, die Stimulation mit LPS erfolgte am siebten Kulturtag.

Vor dem Zelltransfer wurde anhand einer MLR überprüft, ob sich unter serumfreien Bedingungen generierte BM-DCs, in Bezug auf ihr stimulatorisches Potential für allogene T-Zellen, in ähnlicher Weise wie BM-DCs verhalten, die unter dem Zusatz von FCS differenziert wurden. Tatsächlich induzieren mit LPS stimulierte unbehandelte BM-DCs, die serumfrei kultiviert wurden, die Proliferation allogener T-Zellen ebenfalls in hohem Maße, wohingegen die Stimulation mit serumfrei generierten unstimulierten BM-DCs nur eine geringe Aktivierung der T-Zellen zur Folge hat (Abb. 18). Wie zuvor unter serumhaltigen Bedingungen gezeigt, ist nach Zusatz von NOS-Präparationen, auch unter serumfreien Bedingungen, die Kapazität der BM-DCs zur Induktion der Proliferation naiver T-Zellen vermindert; in der MLR lässt sich eine Hypoproliferation der T-Zellen beobachten.

Nachdem gezeigt war, dass BM-DCs, die unter serumfreien Bedingungen differenziert wurden, sich ähnlich, wie die in Anwesenheit von FCS generierten BM-DCs verhalten, wurden C57BL/6-BM-DCs in BALB/C-Mäuse transferiert. Nach sieben Tagen erfolgte dann die Restimulation der drainierenden Lymphknotenzellen (LNCs) *in vitro* durch Kokultur mit allophen Milzzellen aus C57Bl/6 bzw. FVB/N-Mäusen oder mit syngenem Milzzellen aus BALB/c-Mäusen. Diese Restimulation erfolgte nur für 72 Stunden anstelle der üblichen 90 Stunden. Dadurch wird vermieden, dass Proliferationsraten aufgrund einer Primärstimulation von LNCs in der *in vitro*-MLR detektiert werden, welche die Ergebnisse verfälschen würden.

In Abbildung 19 sind die dazugehörigen Versuchsergebnisse dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen konnte für die LNCs, der mit PBS injizierten Mäuse, keine erhöhte Proliferationsinduktion durch syngene APCs beobachtet werden. Durch die allophen APCs

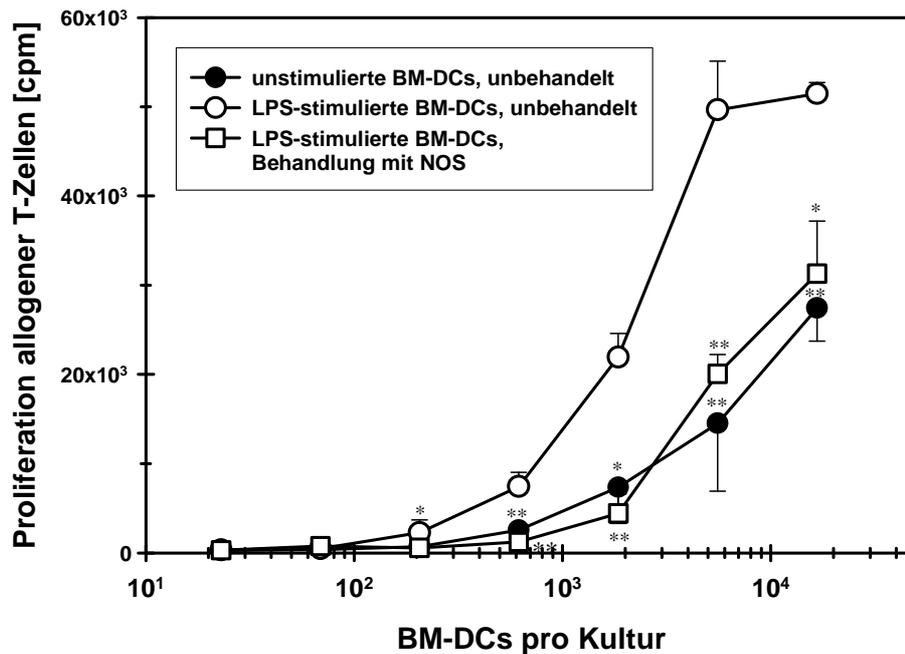


Abbildung 18: Die Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen vermindert, auch unter serumfreien Kulturbedingungen, deren Fähigkeit zur Stimulation allogener T-Zellen. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für sieben Tage unter serumfreien Bedingungen aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs mit 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen BALB/c-T-Zellen (3×10^5 /Loch) für 72 Stunden kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Anschluss durch Zugabe von 0,25 µCi/Loch ³H-Thymidin für 18 Stunden gemessen. Die Grafik ist repräsentativ für sieben unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kokulturen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

wurde wegen des frühen Zeitpunkts der Radioaktivitätsmessung nur eine schwach erhöhte Proliferation induziert.

Die syngene und FVB/N allogene Stimulation ist auch in den drei Gruppen, denen unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs transferiert wurden, ähnlich wie bei der PBS-Kontrollgruppe, nicht bzw. nur sehr gering vorhanden. Die fehlende FVB/N allogene Stimulation ist auch hier, mit dem frühen Zeitpunkt der Proliferationsmessung, wie für die PBS-Kontrollgruppe, zu erklären.

Weiterhin ist auffällig, dass bei Verwendung von C57BL/6-Milzzellen als APCs die LNCs der mit BM-DCs transferierten Gruppen gegenüber dem Hintergrund der LNCs alleine signifikant stärker proliferieren. Bei den C57BL/6-Milzzellen als APCs war die höchste Proliferation nach Transfer LPS-stimulierter unbehalteter BM-DCs zu beobachten. Diese Proliferation war signifikant erhöht im Vergleich zur Proliferation nach dem Transfer von unstimulierten unbehalteten BM-DCs. Nach dem Transfer von LPS-stimulierten NOS-

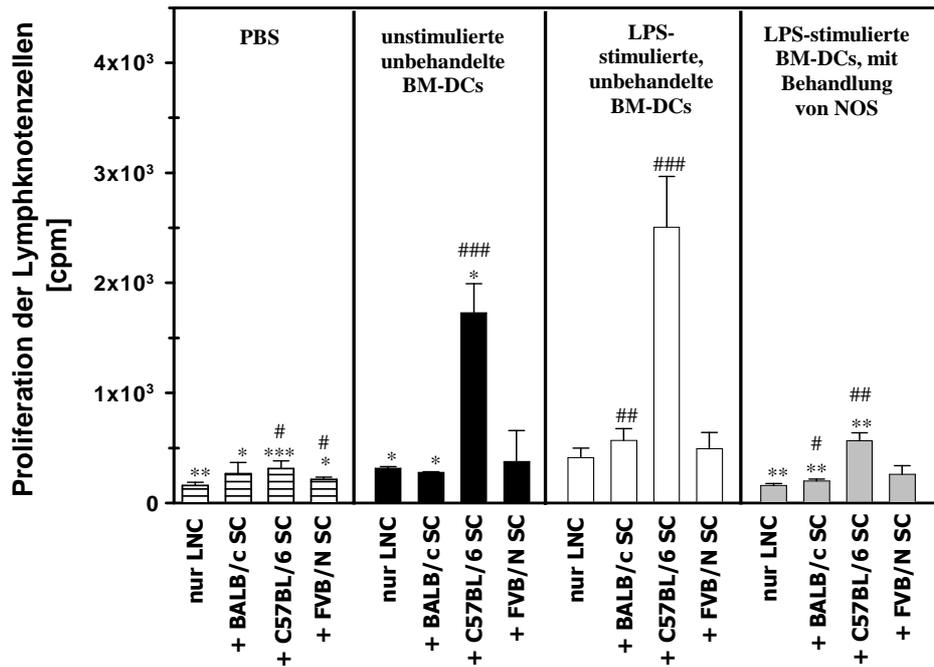


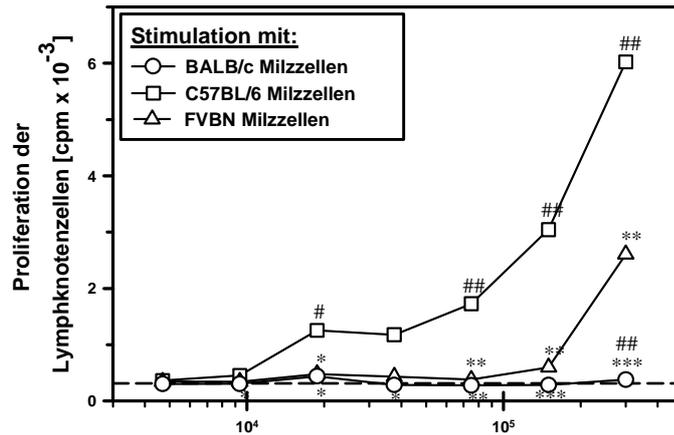
Abbildung 19: In Anwesenheit von NOS differenzierte BM-DCs besitzen ein reduziertes T-Zell-stimulatorisches Potenzial *in vivo*. Jeweils drei bis vier BALB/c-Weibchen wurden pro Fußsohle der hinteren Extremitäten 2×10^5 unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs transferiert. Nach sieben Tagen erfolgte in Triplikatanalysen die Stimulation von 3×10^5 Zellen der drainierenden Lymphknoten (LNC) mit $3,75 \times 10^4$ bestrahlten syngen (BALB/c) oder allogenen (C57BL/6, FVB/N) Milzzellen (SC). Die MLR wurde für 72 Stunden inkubiert, wobei die Proliferation durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin/Loch}$ für die letzten 16 Stunden der MLR bestimmt wurde. In Kontrollansätzen befanden sich lediglich LNCs. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. Die dargestellten Diagramme sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation der Lymphknoten zellen nach dem Transfer der LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) bzw. signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, zwischen der Proliferation der Lymphknoten zellen alleine und ihrer Proliferation in Kokultur mit den unterschiedlichen Milzzellen (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$).

behandelten BM-DCs konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zu LPS-stimulierten unbehandelten BM-DCs beobachtet werden. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse hinsichtlich der Titration der APCs dargestellt.

Somit konnte auch *in vivo* ein reduziertes T-Zell-stimulatorisches Potenzial der BM-DCs, infolge der NOS-Behandlung, aufgezeigt werden und die *in vitro*-Resultate konnten bestätigt werden.

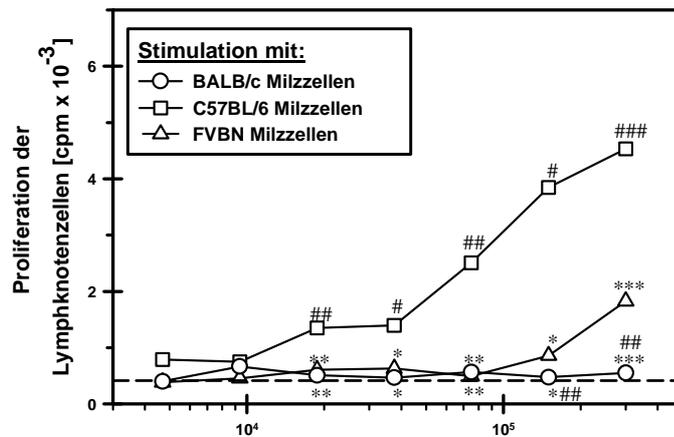
A

unstimulierte,
unbehandelte
BM-DCs



B

LPS-stimulierte
BM-DCs,
unbehandelt



C

LPS-stimulierte
BM-DCs,
Behandlung mit
NOS

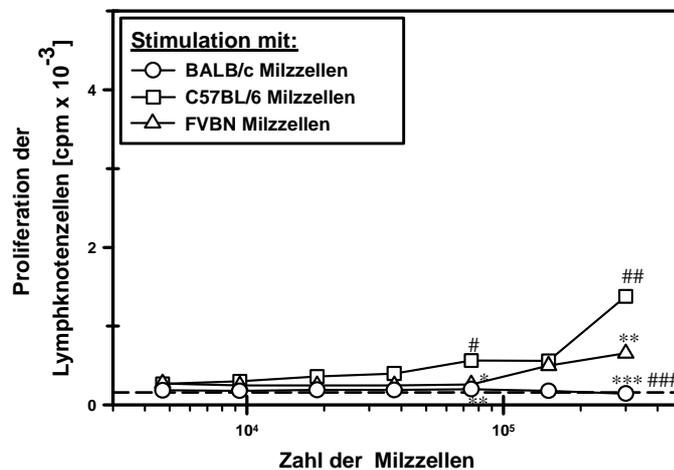


Abbildung 20: In Anwesenheit von NOS differenzierte BM-DCs besitzen ein geringeres T-Zell-stimulatorisches Potenzial *in vivo*. Jeweils drei bis vier BALB/c-Weibchen wurden pro Fußsohle der hinteren Extremitäten 2×10^5 unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs transferiert. Nach sieben Tagen erfolgte in Triplikatsansätzen die Stimulation von 3×10^5 Zellen der drainierenden Lymphknoten mit bestrahlten syngenen (BALB/c) oder allogenen (C57BL/6, FVB/N) Milzzellen. Die MLR wurde für 72 Stunden inkubiert, wobei die Proliferation durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin/Loch}$ für die letzten 16 Stunden der MLR bestimmt wurde. (A-C) Restimulation von 3×10^5 LNCs aus Mäusen, denen unstimulierte (A), LPS-stimulierte (B) bzw. NOS-behandelte LPS-stimulierte BM-DCs (C) transferiert wurden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten dargestellt. Die dargestellten Diagramme sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation der Lymphknotenzellen nach Stimulation mit C57BL/6 Milzzellen (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) bzw. mit FVB/N Milzzellen (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### $P < 0,001$).

3.2.6 Die Stimulation naiver T-Zellen durch BM-DCs, die unter dem Einfluß von NOS-Präparationen differenziert wurden, induziert Anergie in den T-Zellen

Wie in den bisherigen Abschnitten der Dissertation gezeigt werden konnte, haben NOS-Präparationen einen Einfluss auf den Phänotyp und die Funktion von BM-DCs. Nach deren Einfluss weisen diese einige Merkmale tolerogener DCs auf und können unter Umständen regulatorische T-Zellen induzieren. Zu den Merkmalen zählt die reduzierte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD86 oder MHC-Klasse-II-Molekülen auf den behandelten BM-DCs bzw. die Hypoproliferation der T-Zellen nach Kontakt mit behandelten BM-DCs.

Ein Charakteristikum von Tregs ist, dass sie auch nach Restimulation nicht proliferieren. Aus diesem Grund wurden T-Zellen, die in einer primären Kokultur mit unbehandelten bzw. NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, gewonnen und anschließend in einer sekundären Kokultur mit frischen Milzzellen, die als APCs fungieren, reaktiviert. Falls sich die T-Zellen in einem Stadium der Anergie befinden, sollten sie sich nicht mehr restimulieren lassen. Die BM-DCs wurden in diesem Experiment, so wie in den weiteren beschriebenen Experimenten, in serumhaltigen Medium generiert.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, proliferieren die durch unbehandelte, LPS-stimulierte BM-DCs induzierten T-Zellen, welche als 100% festgesetzt wurden und als weiße Balken dargestellt sind, nach Restimulation mit frisch isolierten Milzzellen, sehr gut. Im Gegensatz dazu, lassen sich T-Zellen, die aus einer Kokultur mit unstimulierten BM-DCs stammen (als schwarze Balken dargestellt), nicht restimulieren. Auch T-Zellen, die mit LPS-stimulierten BM-DCs, welche in Anwesenheit von NOS-Präparationen differenziert wurden, kokultiviert wurden (als graue Balken dargestellt), proliferieren im Vergleich zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurden, vermindert. Diese reduzierte Restimulierbarkeit deutet auf eine Anergieinduktion in diesen T-Zellen hin.

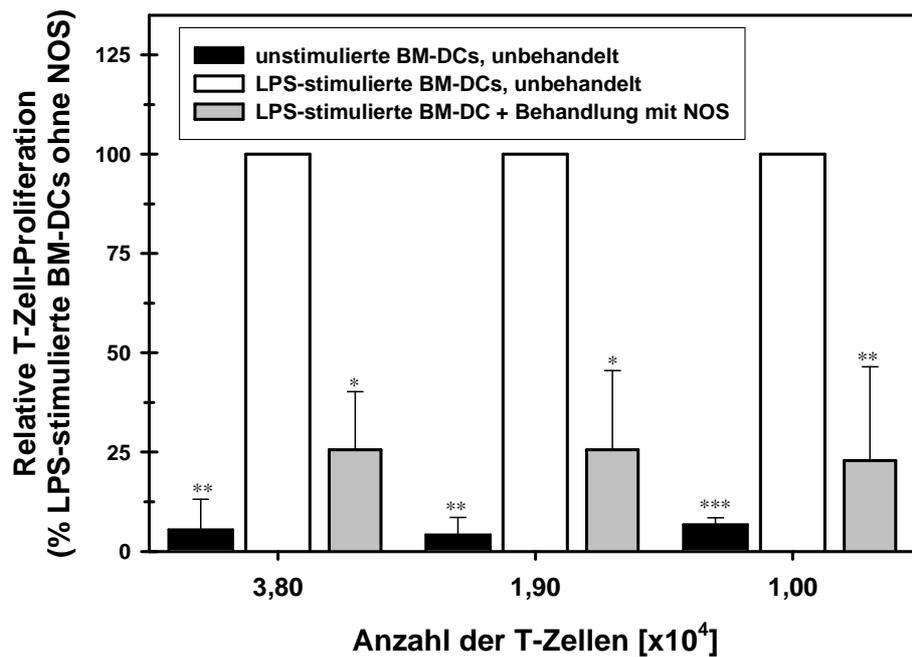


Abbildung 21: T-Zellen, die von mit NOS-Präparationen behandelten BM-DCs stimuliert wurden, sind anergisch. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und für sieben Tage mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$), die aus der Milz von BALB/c-Mäusen isoliert wurden, in einer MLR stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen geerntet und in abnehmender Zellzahl mit bestrahlten C57BL/6-Milzzellen (3×10^5) als APCs in 96-Loch-Platten in Triplikatanalysen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin und weiterer Kultur für 18 Stunden gemessen. In der Graphik ist die relative allogene T-Zell-Proliferation in Bezug zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurden (festgesetzt als 100%) dargestellt. In dieser Grafik wurden Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs stimuliert wurden (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

3.2.7 Auf funktioneller Ebene ist eine Treg-Induktion nach Stimulation von naiven T-Zellen mit NOS-behandelten BM-DCs nicht zu sehen

In einem weiteren Test sollte evaluiert werden, ob T-Zellen, die mit unter Zusatz von NOS-Präparationen differenzierten BM-DCs stimuliert wurden, ein Potenzial zur Inhibition naiver T-Zellen aufweisen. Dazu wurde ein Suppressions-Test durchgeführt, in welchem vorstimulierte BALB/c-T-Zellen, die aus einer Kokultur mit unterschiedlich ausdifferenzierten C57BL/6-BM-DCs stammen, in abgestuften Zellzahlen zu einer primären

MLR, bestehend aus naiven BALB/c-T-Zellen und frisch isolierten Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen, gegeben wurden.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des Suppressions-Tests dargestellt. Die schraffierten Balken zeigen die Proliferation der naiven T-Zellen, die in der einfachen und der doppelten Zellzahl, zusammen mit den bestrahlten Milzzellen, kultiviert wurden; wurden die T-Zellen in der doppelten Zellzahl kultiviert, so war auch ihre Proliferation ungefähr doppelt so hoch.

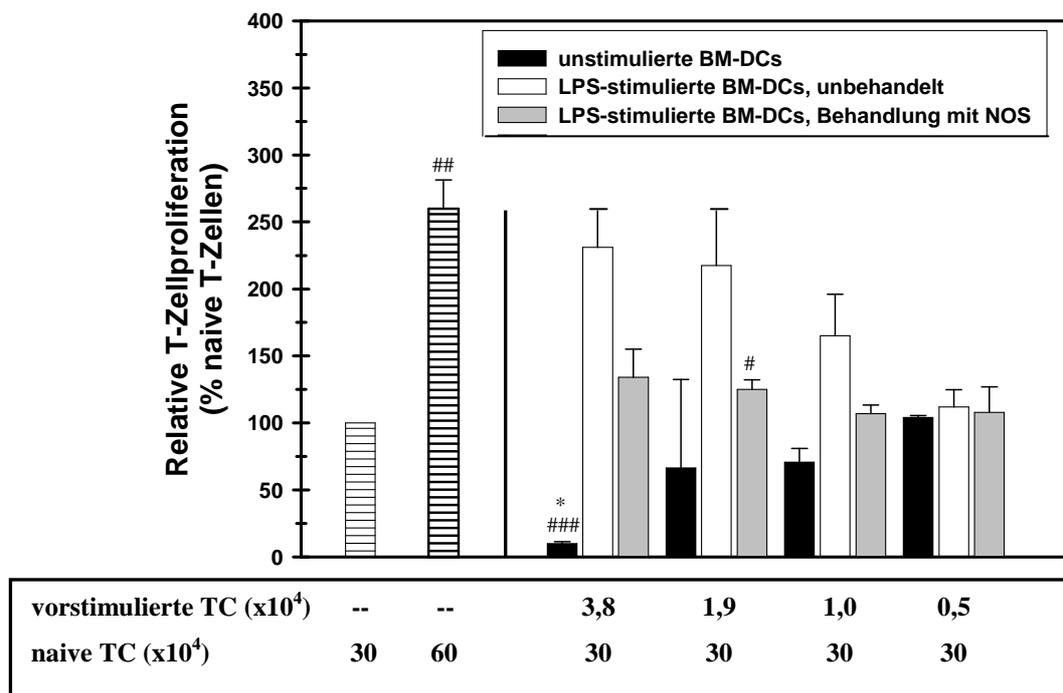


Abbildung 22: Eine Treg-Induktion ist nach Stimulation von naiven T-Zellen mit NOS-behandelten BM-DCs auf funktioneller Ebene nicht zu sehen. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und für sieben Tage mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$), die aus der Milz von BALB/c-Mäusen isoliert wurden, in einer MLR stimuliert. Anschließend wurden diese vorstimulierten T-Zellen in variierender Zellzahl mit naiven T-Zellen (3×10^5) sowie frisch isolierten C57BL/6-Milzzellen (3×10^5) als APCs in 96-Loch-Platten in Triplikationsansätzen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von 0,25 $\mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin und weiterer Kultur für 18 Stunden gemessen. In der Graphik ist die relative allogene T-Zell-Proliferation in Bezug zu 3×10^5 naiven T-Zellen, die als 100% festgesetzt wurden, dargestellt. In dieser Grafik wurden Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu 3×10^5 naiven T-Zellen (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$), bzw. zu T-Zellen, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs vorstimuliert wurden (* = $P < 0,05$).

T-Zellen, die mit LPS-stimulierten BM-DCs vorstimuliert wurden, weisen keine suppressiven Eigenschaften auf naive T-Zellen auf. Ihre Proliferation liegt deutlich höher, als die der

naiven T-Zellen alleine (3×10^5), welche auf 100% festgesetzt wurden. Im Gegensatz dazu, weisen T-Zellen, die unter Zusatz von unstimulierten, unbehandelten BM-DCs stimuliert wurden, ein Potenzial zur Inhibition der Proliferation naiver T-Zellen und somit suppressive Eigenschaften auf. Die T-Zell-Proliferation ist, im Vergleich zu der Proliferation der naiven T-Zellen alleine, vermindert.

T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, zeigen jedoch kein Potenzial zur Inhibition naiver T-Zellen auf und haben daher nicht die funktionellen Eigenschaften von Tregs. Hier lag die relative T-Zell-Proliferation nicht unterhalb der Proliferation naiver T-Zellen (3×10^5) alleine, wie dies vergleichsweise bei T-Zellen, die mit unstimulierten, unbehandelten BM-DCs vorstimuliert wurden, der Fall war.

3.2.8 T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor FoxP3

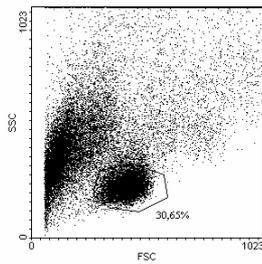
Die Mehrzahl der verschiedenen Treg-Subpopulationen exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3. Daher wurde mittels der Durchflusszytometrie die Expression von FoxP3, in, mit BM-DCs kokultivierten T-Zellen, intrazellulär analysiert.

Nachdem unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs, wie unstimulierte BM-DCs, LPS-stimulierte BM-DCs sowie LPS-stimulierte BM-DCs, die mit den NOS-Präparationen behandelt wurden, aus C57Bl/6-Mäusen im serumhaltigen Medium über eine Dauer von zehn Tagen generiert wurden, wurden diese mit allogenen T-Zellen für sieben Tage kokultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen gerntet und ihre FoxP3-Expression auf $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Kokultur von T-Zellen mit unstimulierten, unbehandelten BM-DCs, liegt der Anteil der $CD4^+$ T-Zellen, die FoxP3 exprimieren, bei 0,77% der Lymphozyten (Abb. 23-B); der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen ist hierbei noch geringer und liegt bei einem Wert von 0,17%.

Nach Kontakt von T-Zellen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs kann keine veränderte prozentuale Verteilung der $CD4^+FoxP3^+$ bzw. $CD8^+FoxP3^+$ T-Zellen an den Lymphozyten beobachtet werden.

A



B

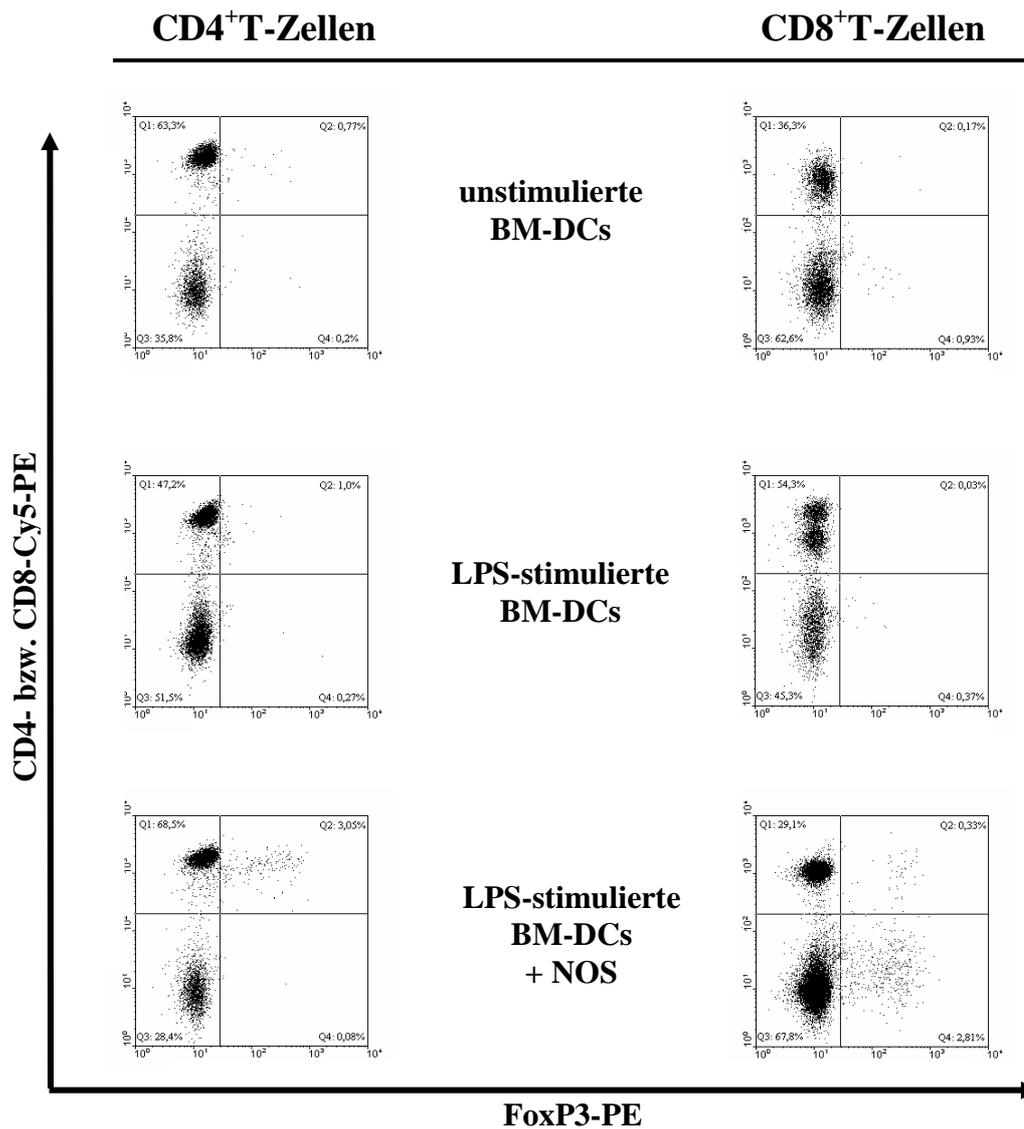


Abbildung 23: T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor FoxP3. C57BL/6-BM-DCs wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von NOS für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit LPS ausgereift. Jeweils 3×10^5 über Nylonwolle aufgereinigte BALB/c-T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit bestrahlten C57Bl/6-BM-DCs kokultiviert. Am siebten Tag der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet und die Expression der Moleküle CD4 bzw. CD8 sowie FoxP3 durchflusszytometrisch analysiert. Wie unter (A) dargestellt, wurden zuerst Lymphozyten im FSC/SSC-Diagramm eingegrenzt. Im zweiten Schritt wurden innerhalb dieser Population CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 analysiert (B). Die prozentualen Anteile der jeweiligen Subpopulationen sind im entsprechenden Quadranten (Q1 bis Q4) angegeben. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Bei Kokultur von T-Zellen mit LPS-stimulierten BM-DCs, welche mit NOS-Präparationen supplementiert wurden, erhöht sich der Anteil der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen auf über 3%; der Anteil der CD8⁺FoxP3⁺ T-Zellen steigt auf 0,33% an. Beide T-Zell-Populationen exprimieren somit verstärkt den Transkriptionsfaktor FoxP3. Der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen ist, im Vergleich zum prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Zellen, aber wesentlich geringer.

3.2.9 Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von NOS-Präparationen verändert das Zytokinprofil der Zellen nach deren Stimulation mit LPS

Im Genexpressionsprofil konnte gezeigt werden, dass LPS-stimulierte BM-DCs, welche während ihrer Kultur unter dem Einfluss der NOS-Präparationen standen, eher eine Typ2-, als eine Typ1-Polarisierung erfahren. Dies konnte anhand der beiden Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1 gezeigt werden. Nach der NOS-Supplementierung konnte eine signifikant-verminderte Delta-4-Expression und eine nicht signifikant-erhöhte Jagged-1-Expression beobachtet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich daher die Frage, ob die nach Interaktion mit NOS-behandelten BM-DCs induzierten T-Zellen, ein verändertes Zytokinmuster produzieren und somit eine, im Vergleich zur Stimulation mit unbehandelten BM-DCs, unterschiedliche T-Helfer-Zell-Polarisierung stattfindet. So wäre zu erwarten, dass sich die interagierenden T-Zellen zu Th2-Zellen entwickeln. Hierzu wurde die Produktion der beiden Zytokine IFN- γ und IL-4 sowohl im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA als auch unter Fokussierung auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen per intrazellulärer FACS-Analyse nachgewiesen; während IFN- γ hauptsächlich von Th1-T-Zellen sezerniert wird, produzieren Th2-T-Zellen hingegen IL-4.

Nach einer Dauer von 72 Stunden wurden in den Überständen der Kokulturen von unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs und T-Zellen die beiden Zytokine IFN- γ und IL-4 mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 24 ist dargestellt, dass die Produktion des Zytokins IFN- γ durch T-Zellen, die durch LPS-stimulierte BM-DCs aktiviert wurden, im Vergleich zu T-Zellen, die zusammen mit unstimulierten BM-DCs kultiviert wurden, signifikant erhöht ist. Diese bleibt nach Kontakt mit BM-DCs, die unter Zusatz von NOS-Präparationen kultiviert wurden, unverändert. Die Daten zu dem IL-4-Profil der T-Zellen müssen unter Vorsicht

interpretiert werden, da die sekretierten Mengen marginal sind. Bei den drei untersuchten Gruppen zeigen sich keine Unterschiede in der Produktion von IL-4.

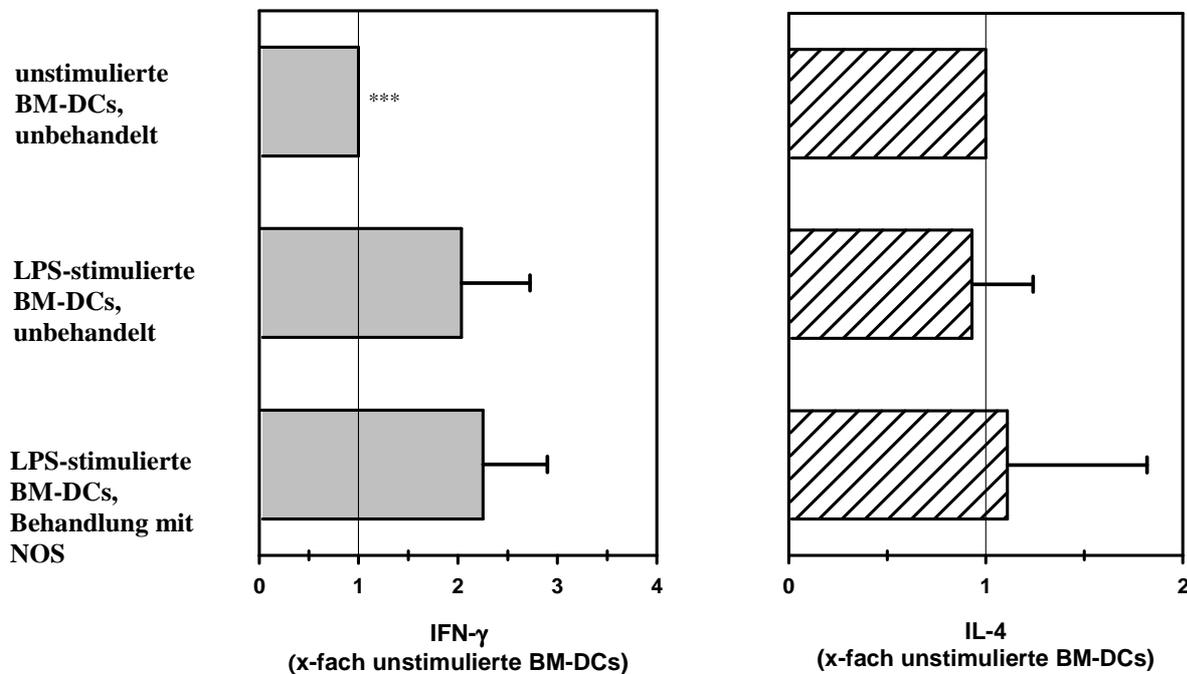


Abbildung 24: T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, zeigen kein verändertes Zytokinprofil. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von NOS-Präparationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden Kulturüberstände genommen und der Gehalt an IFN- γ und IL-4 mittels ELISA ermittelt; diese wurden zu der Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit unstimulierten BM-DCs (100% entsprechen 364 pg/ml IFN- γ bzw. 43 pg IL-4) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus acht (IFN- γ) bzw. vier (IL-4) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (***) = $P < 0,001$).

Diese Zytokindaten sind aber kein eindeutiger Nachweis, dass es sich hierbei um Zytokine handelt, die eindeutig von den T-Zellen gebildet wurden, da die Überstände aus der Kokultur von BM-DCs und T-Zellen stammen. Daher sollte eine weitere Nachweismethode Sicherheit geben, ob nicht doch, nach einer Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit NOS, eine Veränderung des Zytokinmusters der interagierenden T-Zellen in Richtung einer Th2-Antwort stattfindet. Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um eine intrazelluläre FACS-Färbung.

Hierzu wurden unterschiedlich ausdifferenzierte BM-DCs aus C57Bl/6-Mäusen im serumhaltigen Medium, über eine Dauer von zehn Tagen, generiert und anschließend mit allogenen T-Zellen für vier Tage kokultiviert. Am Ende der Kulturphase wurde den Kulturen für vier Stunden, zur weiteren Stimulierung der T-Zellen, 20 ng/ml PMA sowie 1 μ M Ionomycin zugesetzt. Parallel erfolgte eine Inkubation mit 10 μ g/ml Brefeldin A, damit Zytokine nicht von den Zellen sekretiert werden, sondern in der Zelle akkumulieren und somit intrazellulär nachweisbar sind. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet und die Expression von IFN- γ und IL-4 in CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert.

Abbildung 25 stellt die Ergebnisse der durchgeführten intrazellulären FACS-Färbung dar. Dabei kann aus Teilabschnitt A die Eingrenzung der gemessenen Lymphozyten im FSC/SSC-Diagramm sowie die der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen nachvollzogen werden. Der Teilabschnitt B stellt die Frequenz der IFN- γ - bzw. IL-4-produzierenden T-Zellen nach Kokultur mit BM-DCs, die in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von NOS-Präparationen kultiviert wurden, dar. Nach Kokultur von T-Zellen mit unstimulierten und unbehandelten BM-DCs beträgt die Frequenz der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen 3,27%, während die der CD8⁺ T-Zellen bei 8,36% liegt und somit deutlich höher ist, als die der CD4⁺ T-Zellen. Nach Kokultur der T-Zellen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs, ist die Frequenz der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, im Vergleich zur Kokultur mit unstimulierten BM-DCs, erhöht. Diese liegt bei CD4⁺ T-Zellen bei einem Prozentsatz von 4,29 und bei CD8⁺ T-Zellen bei 13,25. Nach Kokultur der T-Zellen mit LPS-stimulierten BM-DCs, die während ihrer Kultur mit NOS-Präparationen supplementiert wurden, nimmt die Frequenz der IFN- γ -produzierenden T-Zellen in beiden Subpopulationen, im Vergleich zur Kokultur mit BM-DCs, welche nicht in Anwesenheit von NOS-Präparationen kultiviert wurden, wieder ab. Diese liegt für CD4⁺ T-Zellen bei 2,75% und für CD8⁺ T-Zellen bei 6,46%.

Insgesamt scheint also die Frequenz der IFN- γ -produzierenden T-Zellen in der CD8⁺ T-Zellpopulation größer zu sein, als in der CD4⁺ T-Zellpopulation; in beiden T-Zellpopulationen nimmt jedoch diese Frequenz nach Kokultur mit BM-DCs, die unter Zusatz von NOS-Präparationen kultiviert wurden, deutlich ab. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse, welche anhand der Notch-Liganden beobachtet wurden.

Der Anteil der IL-4-produzierenden T-Zellen ist für beide T-Zell-Subpopulationen, nach Kultur mit den unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs, marginal. Auffällig ist jedoch auch hier, dass die Frequenz der IL-4-produzierenden CD8⁺ T-Zellen, im Vergleich zu den

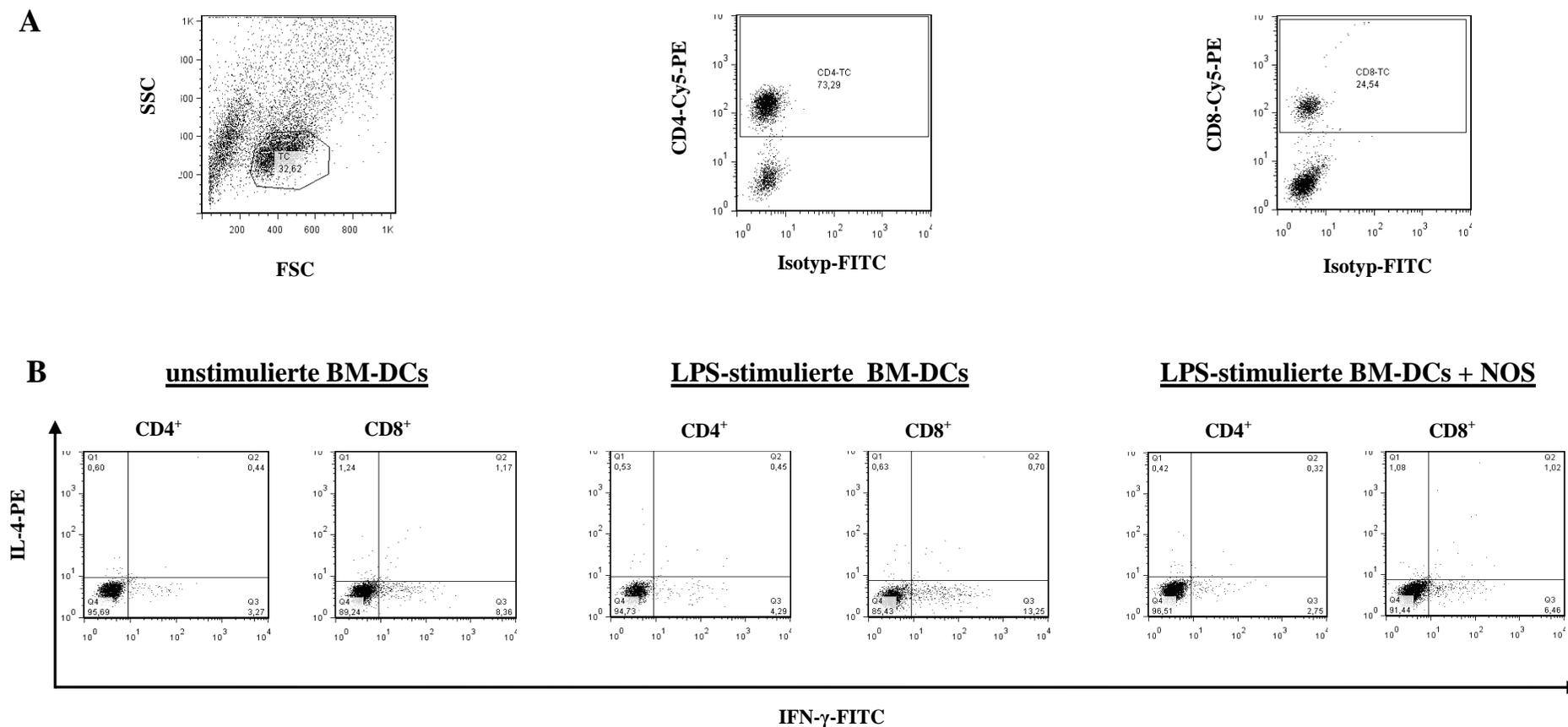


Abbildung 25: T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, zeigen eine verminderte IFN- γ -Produktion. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von NOS für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit LPS ausgereift. Jeweils $1,2 \times 10^6$ über Nylonwolle aufgereinigte BALB/c-T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 20:1 mit bestrahlten C57Bl/6-BM-DCs kokultiviert. Am vierten Tag der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet und eine intrazelluläre FACS-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Expression der Moleküle CD4 bzw. CD8, sowie der beiden Zytokine IFN- γ und IL-4 durchflusszytometrisch analysiert. Wie unter (A) dargestellt wurden zuerst Lymphozyten im FSC/SSC-Diagramm und im Anschluss daran die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen im entsprechenden Kanal eingegrenzt. Danach erfolgte die Analyse der Expression von IFN- γ und IL-4 nach Kontakt mit unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs (B). Die prozentualen Anteile der jeweiligen zytokinproduzierenden Zellen sind im entsprechenden Quadranten (Q1 bis Q4) angegeben.

CD4⁺ T-Zellen, erhöht ist. Während die Frequenz der IL-4-produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach Kultur mit den drei unterschiedlich behandelten BM-DC-Kulturen nahezu gleich ist, wird die Frequenz der IL-4-produzierenden CD8⁺ T-Zellen leicht verändert. Nach Kokultur mit unstimulierten und unbehandelten BM-DC-Kulturen liegt der Anteil der IL-4-produzierenden T-Zellen bei 1,24% und wird nach Kokultur mit LPS-stimulierten BM-DCs auf einen Anteil von 0,63% verringert. Eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit NOS-Präparationen führt, nach Kontakt mit T-Zellen, zu einem leichten Anstieg der IL-4-produzierenden CD8⁺ T-Zellen auf 1,08%.

Während also die IL-4-Produktion kaum verändert wird, zeigen T-Zellen, die mit LPS-stimulierten und NOS-behandelten BM-DCs kokultiviert wurden, im Vergleich zu unbehandelten, murenen Kulturen, eine verminderte IFN- γ -Produktion.

3.2.10 Verschiedene NOS-Präparationen zeigen unterschiedliche Aktivität bei der Differenzierung der BM-DCs

Im Verlauf der Entwicklung und Differenzierung von BM-DCs wurden, zur Analyse der Wirkung neutraler Humanmilch-analoger Oligosaccharide, unterschiedliche NOS-Präparationen verwendet. Diverse Versuche haben ergeben, dass diese unterschiedlichen NOS-Präparationen eine unterschiedliche Aktivität auf die BM-DCs aufzeigen. Abhängig von der verwendeten Konzentration der analysierten NOS-Präparation wurden unterschiedliche Effekte erzielt.

Insgesamt wurden vier verschiedene NOS-Präparationen verwendet, die in den nachfolgenden Abbildungen in Relation zueinander gesetzt werden.

In Abbildung 26 ist eine Übersicht der Expression des Oberflächenmoleküls CD86 nach Kultur der LPS-stimulierten BM-DCs unter Einfluss der vier verwendeten NOS-Präparationen dargestellt.

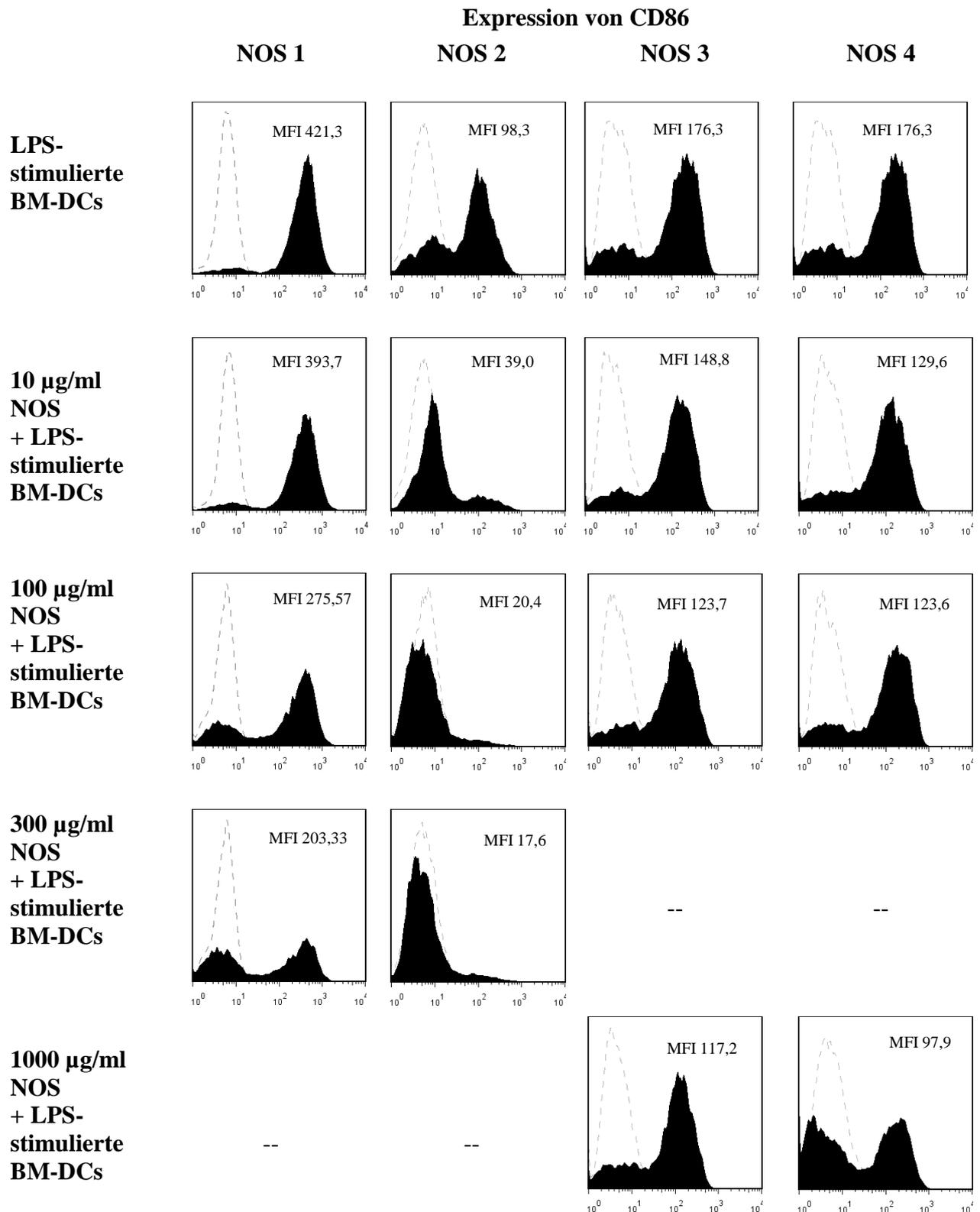


Abbildung 26: Expression des Oberflächenmoleküls CD86 bei Zugabe von vier unterschiedlichen NOS-Präparationen während der Generierung von BM-DCs. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Parallel wurden die Kulturen mit den vier verschiedenen NOS-Präparationen in unterschiedlichen Konzentrationen ab dem dritten Kulturtag supplementiert. Die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für fünf (NOS1), acht (NOS2) bzw. drei (NOS3 und NOS4) unabhängig von einander durchgeführte Experimente.

Während die NOS1-Präparation bei einer Konzentration von 10 µg/ml in der durchflusszytometrischen Analyse keinen inhibitorischen Einfluss auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 aufweist, zeigt sich nach Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit der NOS2-Präparation ein deutlicher Einfluss auf die CD86-Expression. Im Vergleich zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs wird das Molekül hier deutlich weniger stark exprimiert. Während die Expression des Moleküls nach Stimulation mit 100 µg/ml der NOS1-Präparation leicht vermindert wird, zeigt sich, unter Kultur der maximal verwendeten Konzentration von 300 µg/ml, eine stark verminderte Expression des Moleküls. Bei der NOS2-Präparation wird bereits bei der geringen Konzentration von 10 µg/ml eine stark verminderte Expression des Moleküls erreicht. Bei einer Konzentrationssteigerung auf 100 µg/ml kann die inhibierende Wirkung leicht erhöht werden. Die beiden NOS-Präparationen NOS3 und NOS4 zeigen wiederum ein abweichendes Wirkspektrum. NOS3 bewirkt sogar, nach Zusatz von 1 mg/ml, kaum eine verminderte Expression des Moleküls. Die NOS4-Präparation scheint bei dieser Konzentration, nach Zusatz zur BM-DC-Kultur, eine verminderte Expression des Moleküls zu induzieren. Um zu überprüfen, ob bei einer weiteren Konzentrationserhöhung der NOS4-Präparation die Expression des Moleküls weiter inhibiert werden kann, wurden die BM-DCs unter Zusatz von 3 mg/ml dieser Präparation kultiviert. Hierbei konnte keine weitere Abnahme der CD86-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Für weitere Oberflächenmoleküle, wie CD40, CD80 und MHC-Klasse-II, die der Übersicht halber nicht in die Graphik mit einbezogen wurden, konnte das gleiche Expressionsmuster gezeigt werden.

Auch anhand der durchgeführten MLRs (Abb. 27) konnte ein unterschiedliches Wirkspektrum der vier NOS-Präparationen aufgezeigt werden, welches dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse entspricht. Nach Kokultur der T-Zellen mit LPS-stimulierten BM-DCs, die unter Zusatz der vier NOS-Präparationen kultiviert werden, kann nicht für alle Präparationen eine verminderte T-Zell-Stimulationsfähigkeit beobachtet werden. Dies gilt besonders für die beiden NOS-Präparationen NOS3 und NOS4, die sogar nach Einsatz von hohen Konzentrationen, nach Kultur mit BM-DCs, nicht bzw. nur kaum zu einer verminderten T-Zell-Proliferation führen.

Die NOS1-Präparation spiegelt auch in der MLR eine Dosisabhängigkeit wieder, wie sie schon für die FACS-Analyse aufgezeigt werden konnte. Während BM-DC-Kulturen nach Zusatz von 10 µg/ml kaum die Fähigkeit besitzen, die T-Zell-Stimulation zu drosseln, wird

nach Kultur, unter Zusatz von 300 $\mu\text{g/ml}$, die T-Zell-Stimulation, im Vergleich zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs, auf ca. 40% gesenkt. Die NOS2-Präparation scheint in ihrer Wirkung wesentlich sensitiver zu sein und erreicht schon bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine Inhibition der T-Zell-Proliferation von ca. 44 %. Diese lässt sich mittels höherer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ noch etwas steigern und erreicht einen Wert von ca. 35%.

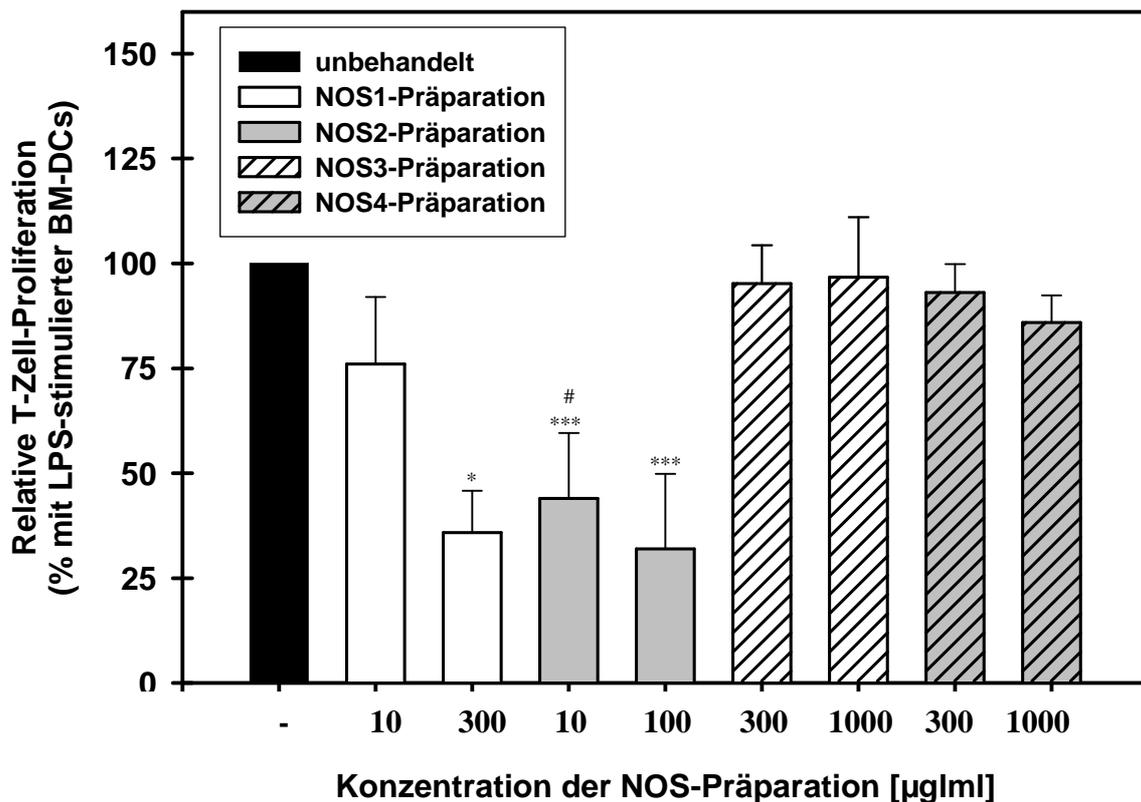


Abbildung 27: Graphische Übersicht der unterschiedlichen Wirkungsweise der vier verwendeten NOS-Präparationen. C57BL/6-BM-DCs wurden jeweils in Anwesenheit der vier NOS-Präparationen 1-4 in unterschiedlichen Konzentrationen für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden $1,6 \times 10^4$ BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und mit 3×10^5 allogenen T-Zellen aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von 0,25 $\mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin und weiterer Kultur für 18 Stunden gemessen. Dargestellt ist die relative allogene T-Zell-Proliferation in Bezug zur Proliferation von T-Zellen, die durch LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (festgesetzt als 100%). In dieser Grafik wurden Mittelwerte aus drei bis fünf (NOS1-Präparation), acht (NOS2-Präparation), zwei bis drei (NOS3-Präparation) bzw. zwei bis vier (NOS4-Präparation) unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zur Proliferation in Kokulturen mit LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$) bzw. signifikante Unterschiede zur Proliferation der Kokultur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ NOS1-Präparation behandelten BM-DCs (# = $P < 0,05$).

Zusammenfassend kann man demnach feststellen, dass die vier verschiedenen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit verwendeten NOS-Präparationen erheblich unterschiedliche Aktivitäten bei der Modifikation der BM-DC-Differenzierung aufweisen. Die Grundlage für die unterschiedliche Aktivität dieser NOS-Präparationen ist derzeit nicht bekannt und muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

3.3 Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Differenzierung von BM-DCs

3.3.1 Einfluss von *Lactobacillus rhamnosus* GG auf die Differenzierung von BM-DCs

Um den Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Differenzierung und Maturierung von DCs zu untersuchen, wurden BM-DC-Kulturen mit *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) supplementiert. Diese Supplementierung erfolgte ab dem dritten Tag der Kultur (d3, 6, 8) oder wurde nur während der zweitägigen Ausreifungsphase mit LPS (d8) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde den Kulturen, die zu Beginn der Differenzierung mit 2×10^6 Knochenmarkszellen pro Kulturschale ausgesät wurden, die 10-fache Menge an Bakterien, also 2×10^7 Bakterien pro Kulturschale, zugesetzt.

Von LGG wurden zwei auf unterschiedliche Weise inaktivierte Bakterienpräparationen verwendet. Zum einen wurden die Bakterien mittels Einfrieren bei -20°C ohne die Zugabe eines Frostschutzes inaktiviert („LGG gefroren“) zum anderen wurde eine Inaktivierung mittels Bestrahlung per UV-Licht für 5 min durchgeführt („LGG UV“). Zusätzlich wurde der Einfluss lebender LGG-Stämme („LGG lebend“) auf die BM-DC-Differenzierung untersucht und mit dem Effekt der beiden inaktivierten Bakterienformen verglichen.

3.3.1.1 Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss von *Lactobacillus rhamnosus* GG auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs

Die durchflusszytometrische Analyse von BM-DCs, die ab dem achten Tag der Kultur in Anwesenheit von „LGG gefroren“ (2×10^7) stimuliert wurden, ergab, dass solche Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 28, erste Reihe), eine erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen aufwiesen und somit Anzeichen einer Ausreifung zeigten (Abb. 28, zweite Reihe). Im Vergleich zur LPS-Stimulation ist diese Ausreifung aber nicht so stark; dies wird vor allem durch den Vergleich der MFI-Werte für die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 und des MHC-Klasse-II-Moleküls deutlich.

Mit LPS maturierte BM-DCs exprimieren, bei gleichzeitiger Anwesenheit von LGG, während der zweitägigen Ausreifungsphase, noch einmal schwach erhöhte Level an CD86 und MHC-Klasse-II-Molekülen (Abb. 28, fünfte Reihe). Somit induziert eine LGG-Stimulation ab Tag Acht der Kultur sowohl bei unstimulierten als auch bei LPS-stimulierten BM-DCs eine erhöhte Expression der Moleküle CD86 und MHC-Klasse-II.

Eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit LGG während der Differenzierungsphase ab Tag Drei hat dagegen tiefgreifende Auswirkungen auf die Entwicklung der BM-DCs und führt zu Veränderungen des Phänotyps immaturer sowie mit LPS aktivierter BM-DCs. Die Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle liegt nach LGG-Gabe (Abb. 28, dritte Reihe) deutlich unterhalb der Expression von unbehandelten BM-DCs (Abb. 28, erste Reihe) und zeigt somit einen reduzierten Reifungsgrad dieser Zellen an. Die Expression von CD86 ist dagegen nicht reduziert.

Weiterhin führt eine anschließende LPS-Stimulation, solcher in Gegenwart von LGG differenzierter Zellen (Abb. 28, sechste Reihe), nicht zu der, ohne LGG behandelten BM-DC-Kulturen (Abb. 28, vierte Reihe), beobachteten starken Erhöhung der CD86- und MHC-Klasse-II-Expression. Bezogen auf die mittlere Fluoreszenzintensität kann allerdings für die Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls, im Gegensatz zur Expression des Moleküls CD86, keine Verminderung nach LGG-Gabe gezeigt werden.

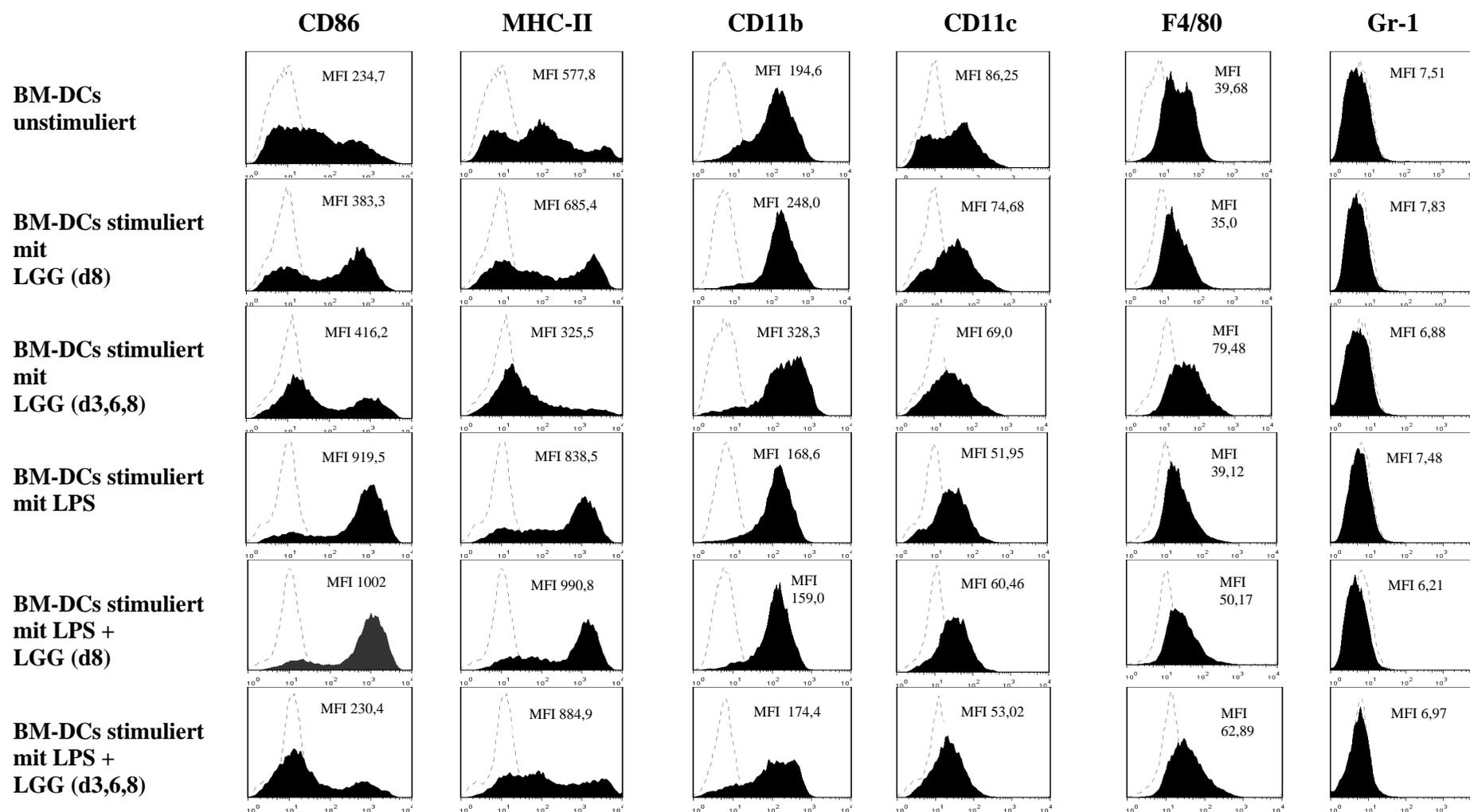


Abbildung 28: Einfluss von hohen LGG-Dosen auf die Differenzierung und Reifung von BM-DCs. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Parallel angelegte Kulturen wurden ab dem dritten Tag der Differenzierungsphase (LGG d3, 6, 8) bzw. lediglich während der Ausreifungsphase ab Tag Acht (LGG d8) mit „LGG gefroren“ (2×10^7 /Kulturschale) supplementiert. Die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für zehn (d8) bzw. fünf (d3, 6, 8) unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

Um zu untersuchen, ob die Knochenmarkszellen durch die Anwesenheit von LGG in DC-differente Zellen moduliert werden, wurde untersucht, ob andere Oberflächenmoleküle, wie das für Makrophagen charakteristische Molekül F4/80, die für DC-Subpopulationen kennzeichnenden Moleküle CD11b und CD11c sowie das Molekül Gr-1, welches Auskunft über die Anwesenheit myeloider Suppressorzellen gibt, verstärkt exprimiert werden. Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, ist die Expression der genannten Moleküle, nach Supplementierung mit LGG, weder auf unstimulierten noch auf LPS-stimulierten BM-DCs verändert. Die Oberflächenmoleküle CD11b und CD11c werden sowohl auf unbehandelten als auch auf LGG-behandelten BM-DCs gleichermaßen stark exprimiert, während die Expression von F4/80 unverändert gering bleibt. Weiterhin wird durch die Anwesenheit von LGG nicht die Expression von Gr-1 auf der Oberfläche der Zellen induziert. Die durchflusszytometrische Analyse der BM-DC-Kulturen hat also ergeben, dass es sich bei den, während der Kultur der Knochenmarkszellen generierten Zellen, aufgrund der unverändert hohen Expression der DC-spezifischen Moleküle CD11b und CD11c, um DCs handelt, die allerdings in reduzierten Ausmaß, die kostimulatorischen Moleküle CD86 sowie MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren.

BM-DC-Kulturen, welche mit lebenden LGG-Stämmen bzw. mit UV-Licht-inaktivierten Stämmen supplementiert wurden, ergaben analoge Ergebnisse, wie sie hier, unter dem Einfluss der gefrorenen Stämme, erbracht wurden (Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren durchflusszytometrischen Analyse wurde der Einfluss einer zehnfach geringeren LGG-Menge (2×10^6 Bakterien/Kulturschale) auf die Expression von CD86 sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen bestimmt. Wie in Abbildung 29 dargestellt, führt die Anwesenheit dieser geringeren Menge an LGG während der Differenzierungsphase oder der Ausreifungsphase nur zu einer schwachen Inhibition bzw. einer schwachen Induktion der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Aus diesem Grunde wurde für zukünftig durchgeführte Experimente, zur Supplementierung der BM-DC-Kulturen, die höhere LGG-Zellzahl von 2×10^7 Bakterien/Kulturschale gewählt.

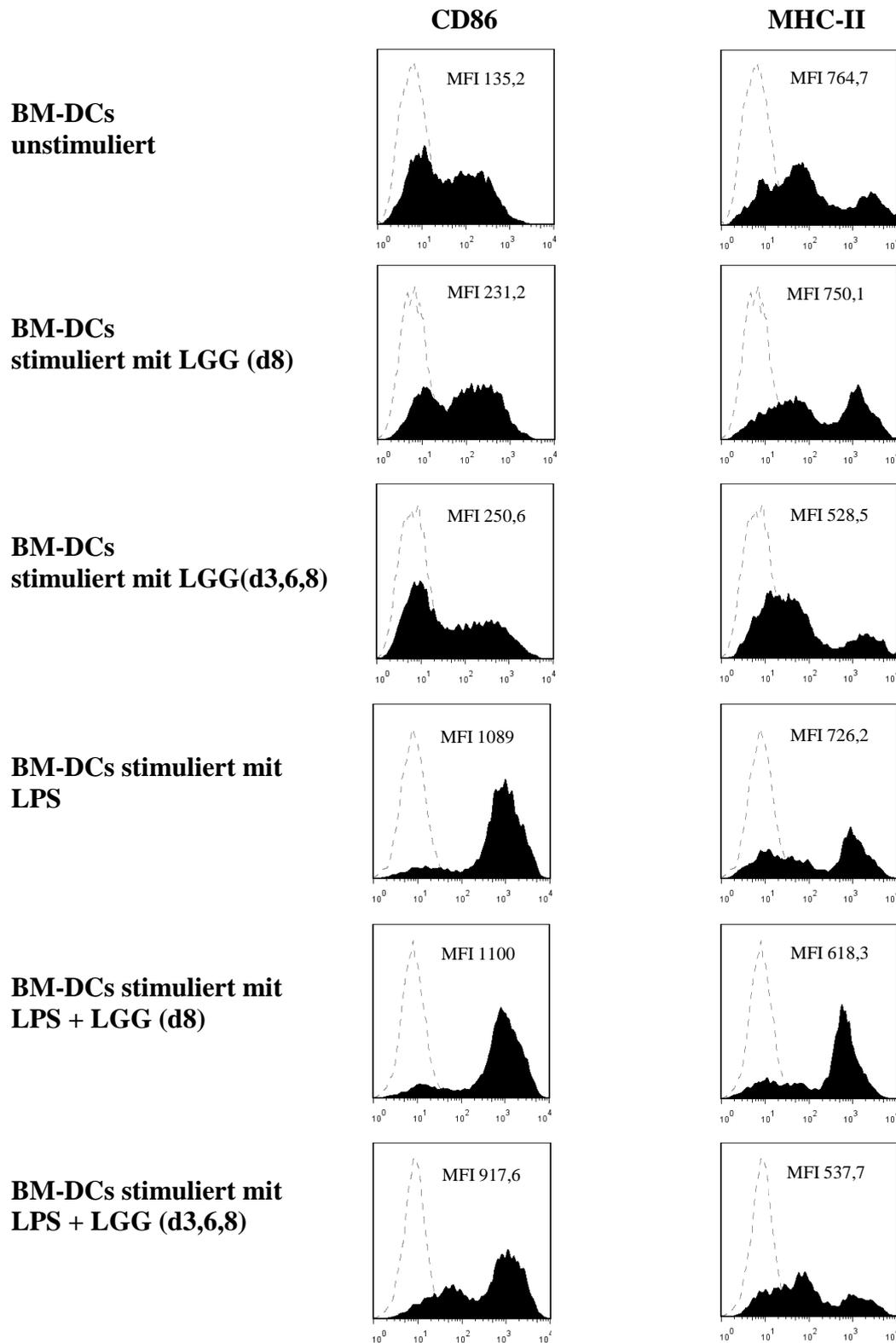


Abbildung 29: Einfluss von niedrigen LGG-Dosen auf die Differenzierung und Maturation von BM-DCs. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Parallel angelegte Kulturen wurden ab dem dritten Tag der Differenzierungsphase (LGG d3, 6, 8) bzw. lediglich während der Ausreifungsphase ab Tag Acht (LGG d8) mit „LGG gefroren“ (2×10^6 /Kulturschale) supplementiert. Die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

3.3.1.2 Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von *Lactobacillus rhamnosus* GG verändert das Genexpressionsprofil der Zellen

Zur Überprüfung der Genexpression von BM-DCs nach Kultur, unter Zusatz von LGG, wurden auf molekularer Ebene relative mRNA-Mengen mittels der Realtime-PCR bestimmt. Im Rahmen der Analyse wurde die mRNA-Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 sowie des Aktinbündelungsproteins Fascin, welches bei der Ausbildung der Dendriten eine zentrale Rolle spielt, quantifiziert. Weiterhin wurde die Expression der beiden koinhibitorischen Moleküle B7-H3 und FcγRIIB sowie der beiden Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1 untersucht.

Wie bereits anhand der FACS-Analyse gezeigt, wird die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 nach Stimulation der BM-DCs mit LGG am achten Tag der Kultur gesteigert (Abb. 30-A). Die mRNA-Expression dieser Moleküle ist auf einem ähnlichen Niveau wie die der LPS-stimulierten Kulturen. Auch die Expression von Fascin wird in Anwesenheit von LGG gesteigert, allerdings nicht signifikant. Der gleichzeitige Zusatz von LGG zu LPS-stimulierten BM-DCs führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Menge für CD40, CD80, CD86 und Fascin, im Vergleich zu LPS-stimulierten unbehandelten Kulturen.

Die Expression der mRNA für die koinhibitorischen Moleküle B7-H3 und FcγRIIB wird, im Vergleich zu unstimulierten BM-DCs, nach Stimulation mit LPS schwächer exprimiert. In BM-DCs wird in Anwesenheit von LGG ab Tag Acht der Kultur, sowohl in unstimulierten, als auch in LPS-stimulierten Kulturen, keine veränderte mRNA-Expression beobachtet.

Die Expression der beiden Notch-Liganden Delta-4 bzw. Jagged-1 wird nach Maturierung der BM-DCs mit LPS deutlich erhöht. Auch bei Zusatz von LGG zu BM-DC-Kulturen an Tag Acht, wird die mRNA-Expression beider Notch-Liganden erhöht und erreicht für Jagged-1 das Niveau der LPS-stimulierten Kulturen. Die Expression von Delta-4-mRNA wird bei gleichzeitigem Zusatz von LGG zu BM-DCs, die mit LPS stimuliert wurden, nicht-signifikant vermindert; im Falle von Jagged-1 bleibt die Expression dagegen nahezu unverändert.

Die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit LGG zu einem frühen Zeitpunkt der BM-DC-Differenzierung ergab weitestgehend andere Ergebnisse. Wie bereits anhand der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden konnte, wird die Expression

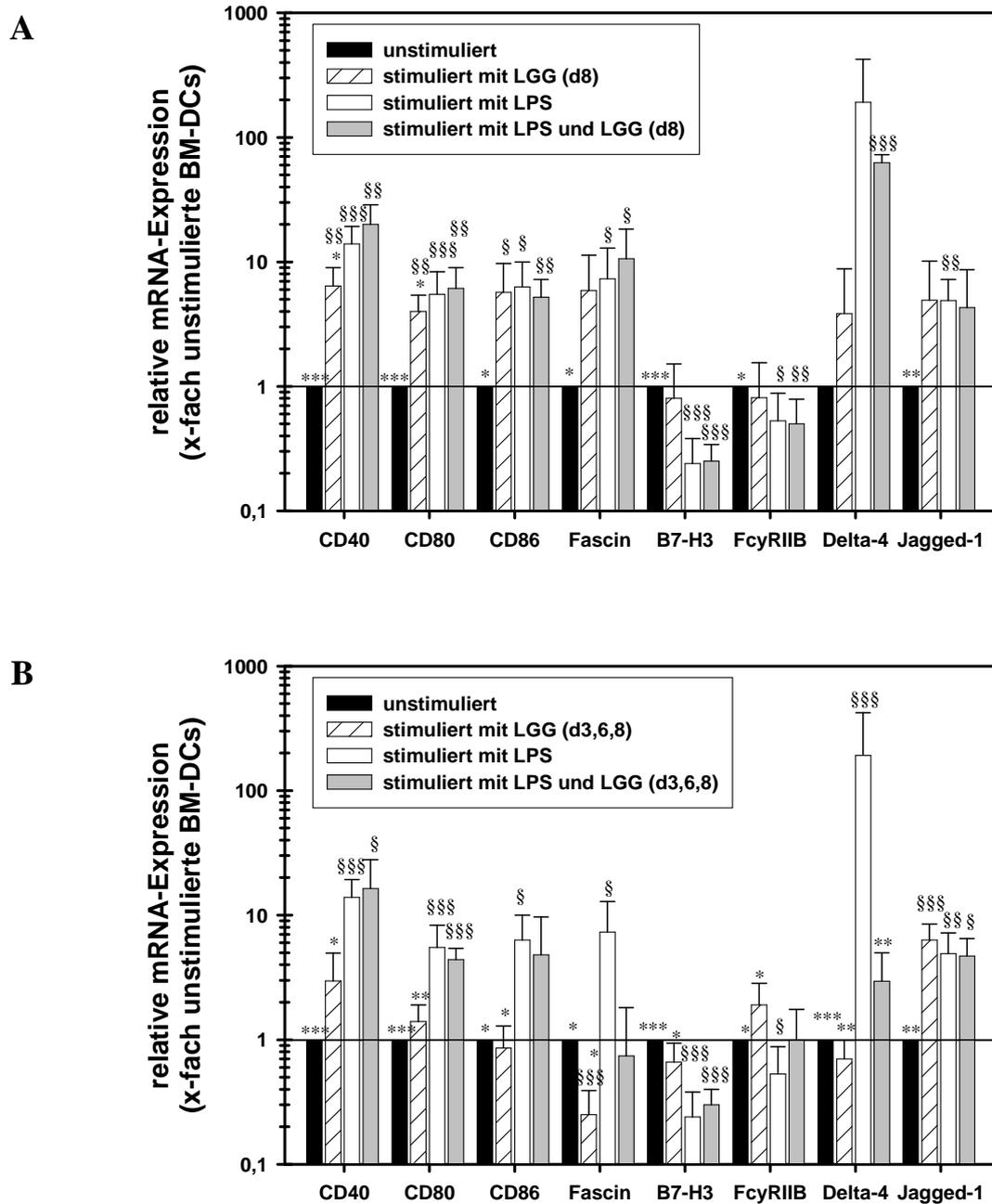


Abbildung 30: mRNA-Expression nach Supplementierung von BM-DC-Kulturen mit LGG. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von hohen LGG-Dosen (2×10^7 /Kulturschale) für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Abbildung (A) zeigt die Stimulation der BM-DCs mit hohen LGG-Dosen ab Tag Acht der Kultur, während Abbildung (B) eine LGG-Stimulation über die gesamte Kulturdauer beschreibt. Die BM-DCs wurden geerntet, ihre RNA wurde isoliert und die cDNA wurde hergestellt. In den verschiedenen Gruppen wurde die mRNA-Expression mittels Realtime-PCR ermittelt, die Expression der mit LPS stimulierten BM-DCs (in Ab- und Anwesenheit von LGG) bzw. der mit LGG stimulierten BM-DCs, wurde zu der Expression der unstimulierten BM-DCs in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus sechs (A) bzw. vier (B) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

von CD86, nach Stimulation der BM-DCs über den gesamten Zeitpunkt der Differenzierung mit LGG, vermindert. Die Graphik zur mRNA-Expression (Abb. 30-B) kann diese Beobachtung bestätigen. Die mRNA-Expression der Moleküle CD80 und CD86 ist nach LGG-Gabe, im Vergleich zu LPS-stimulierten Kulturen signifikant geringer und befindet sich auf dem Niveau der unstimulierten unbehandelten Kulturen. Die mRNA-Expression des Moleküls CD40 ist zwar ebenfalls geringer, befindet sich allerdings auf höherem Niveau, als die Expression in den unstimulierten Kulturen.

Nach Stimulation der BM-DC-Kulturen mit LPS und LGG wird die mRNA-Expression der Moleküle CD40, CD80 und CD86, im Vergleich zu maturierten unbehandelten Kulturen nicht verändert.

Die mRNA-Expression des Aktinbündelungsproteins Fascin erfährt durch die Supplementierung der BM-DCs mit LGG die größte Modulation. Sowohl bei unstimulierten als auch bei LPS-stimulierten Kulturen wird, nach Behandlung mit LGG, die mRNA-Expression des Fascins vermindert.

Die Expression des koinhibitorischen Moleküls B7-H3 bleibt nach LGG-Gabe über den gesamten Zeitraum der BM-DC-Differenzierung, wie auch nach der kurzen und späten Supplementierung ab Tag Acht der Kultur, unverändert. Im Gegensatz dazu, führt der Zusatz von LGG zu unstimulierten bzw. LPS-stimulierten Kulturen, zur Steigerung der mRNA-Menge für das Fc γ RIIB; was im Falle der kurzen LGG-Supplementierung nicht beobachtet werden konnte. Diese Steigerung ist allerdings nicht signifikant.

Die mRNA-Expression für Delta-4 wird im Gegensatz zur Jagged-1-Expression nach LGG-Zusatz zu unstimulierten BM-DC-Kulturen, vermindert. Die zusätzliche Gabe von LGG zu LPS-stimulierten Kulturen führt für Delta-4 ebenfalls zu einer verminderten Expression. Die mRNA-Expression für Jagged-1 wird nach LGG-Gabe zu unstimulierten Kulturen, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs signifikant erhöht und bleibt, nach Stimulation maturierter BM-DCs mit LGG, unverändert.

3.3.1.3 *Lactobacillus rhamnosus* GG moduliert die Zytokinproduktion nach Zusatz zu unstimulierten bzw. LPS-stimulierten BM-DC-Kulturen

Neben der phänotypischen Charakterisierung der LGG-behandelten BM-DCs anhand der Bestimmung der Expression von kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen, wurde

weiterhin die Produktion der Zytokine IL-10 und IL-12 sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene ermittelt. Abbildung 31-A zeigt eine signifikant erhöhte Expression von IL-10 nach Maturierung der BM-DCs mit LPS. Nach LGG-Gabe sowohl zu unstimulierten als auch zu LPS-stimulierten Kulturen, wird die Expression von IL-10-mRNA, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, gesteigert; diese ist allerdings bei unstimulierten Kulturen nicht signifikant. In Übereinstimmung mit diesen Daten ist auf Proteinebene, nach LGG-Gabe auch, eine signifikant verstärkte IL-10-Sekretion durch LPS-stimulierte BM-DCs zu beobachten (Abb. 31-B). Im Unterschied zur RT-PCR-Analyse, wurde nach Zusatz von LGG zu unstimulierten Kulturen keine erhöhte IL-10- Sekretion durch die BM-DCs gemessen.

Auf Transkript-Ebene wird die Expression der beiden Untereinheiten p35 und p40 von IL-12, durch die Stimulation mit LPS, im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, signifikant erhöht. Nach Zusatz von LGG ab dem achten Kulturtag zu unstimulierten BM-DCs wird die mRNA-Expression beider Untereinheiten ebenfalls erhöht. Diese Erhöhung kann auch auf Proteinebene für das IL-12p70 beobachtet werden: LGG-behandelte immature BM-DCs können im Vergleich zu unbehandelten, unstimulierten Kulturen, vermehrt IL-12 sekretieren. Hingegen bleibt nach Zusatz von LGG zu LPS-stimulierten Kulturen die mRNA-Expression für p35 und p40 von IL-12, im Vergleich zu unbehandelten LPS-stimulierten Kulturen, unverändert; dies konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Neben den Zytokinen IL-10 und IL-12 wurden in den BM-DC-Kulturüberständen auch die Konzentrationen an IL-2 und IL-6 analysiert (Abb. 32). Beide Zytokine wurden nach Stimulation der BM-DCs mit LPS signifikant vermehrt sekretiert. Auch die Stimulation mit LGG führte im Vergleich zu unstimulierten und unbehandelten Kulturen zu einer signifikanten Erhöhung der analysierten Zytokine. Eine gleichzeitige Stimulation mit dem Ausreifungsmarker LPS und LGG resultierte nicht in einer weiteren Steigerung des Zytokingehalts, im Vergleich zu singular LPS-stimulierten BM-DCs.

Die LGG-Supplementierung über den gesamten Zeitraum der BM-DC-Differenzierung verändert das Genexpressions- bzw. das Zytokinprofil der BM-DCs in anderem Maße, als die LGG-Gabe zu einem späten Zeitpunkt der Kultur. Auch für diesen Zeitraum der Supplementierung wurde die Produktion der Zytokine IL-10 und IL-12 sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene analysiert (Abb. 33-A und B). Nach Maturierung der

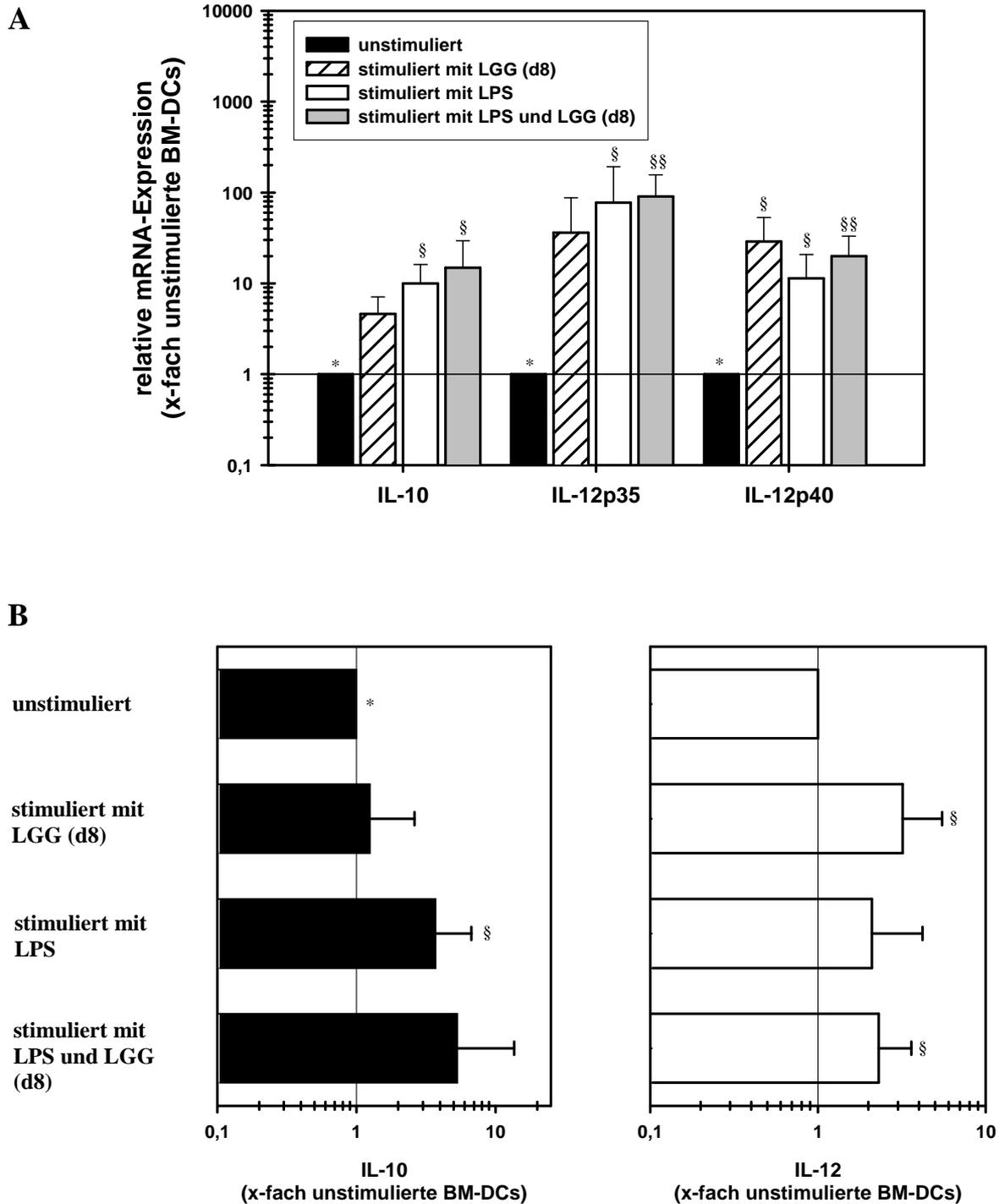


Abbildung 31: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von LGG (d8) auf die Produktion von IL-10 und IL-12. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von LGG (d8) für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die BM-DCs wurden geerntet, ihre RNA wurde isoliert und die cDNA wurde hergestellt. Die mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen wurde mittels Realtime-PCR ermittelt (A). Parallel wurden Überstände genommen und mittels ELISA wurde die Zytokinkonzentration von IL-10 und IL-12 ermittelt; diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (237 pg/ml IL-10 bzw. 123 pg/ml IL-12) in Relation gesetzt (B). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus sechs (A und B-IL-10) bzw. acht (B-IL-12) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$) bzw. zu unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$).

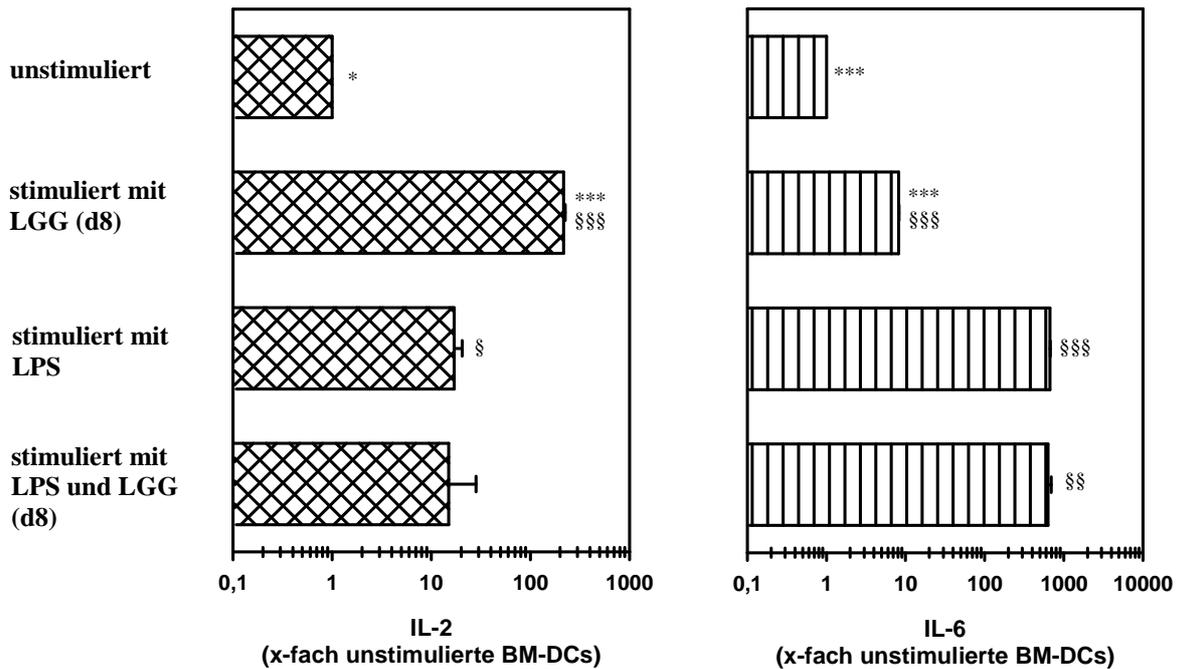


Abbildung 32: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von LGG (d8) auf die Produktion von IL-2 und IL-6. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. In parallelen Kulturen wurde zu unstimulierten bzw. LPS-stimulierten Kulturen LGG ab Tag Acht (d8) hinzugegeben. Anschließend wurden die Überstände genommen und die Zytokinkonzentration von IL-2 und IL-6 wurde mittels Radioaktivitätsbestimmung ermittelt; diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (0,19 U/ml IL-2 bzw. 1,27 U/ml IL-6) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus drei (IL-2) bzw. zwei (IL-6) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

BM-DCs wird die mRNA-Expression des IL-10, im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, signifikant erhöht. In unstimulierten Kulturen, die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung (d3, 6, 8) mit diesem Bakterium supplementiert wurden, nimmt die Menge der IL-10-mRNA tendenziell ab. Diese Abnahme entspricht somit nicht den Ergebnissen, die für den späten Zeitpunkt der LGG-Supplementierung (d8) beobachtet werden konnten. Bei dieser Art der LGG-Gabe konnte auf mRNA-Ebene eine erhöhte IL-10-Menge induziert werden, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

Im Gegensatz dazu, bleibt die Expression der IL-10-mRNA, nach LGG-Gabe zu LPS-stimulierten Kulturen, unverändert; diese Daten konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Die mRNA-Expression der Untereinheit p40 des IL-12 wird zwar nach Maturierung mit LPS signifikant erhöht, nicht jedoch die mRNA-Expression für p35. Da beide Untereinheiten

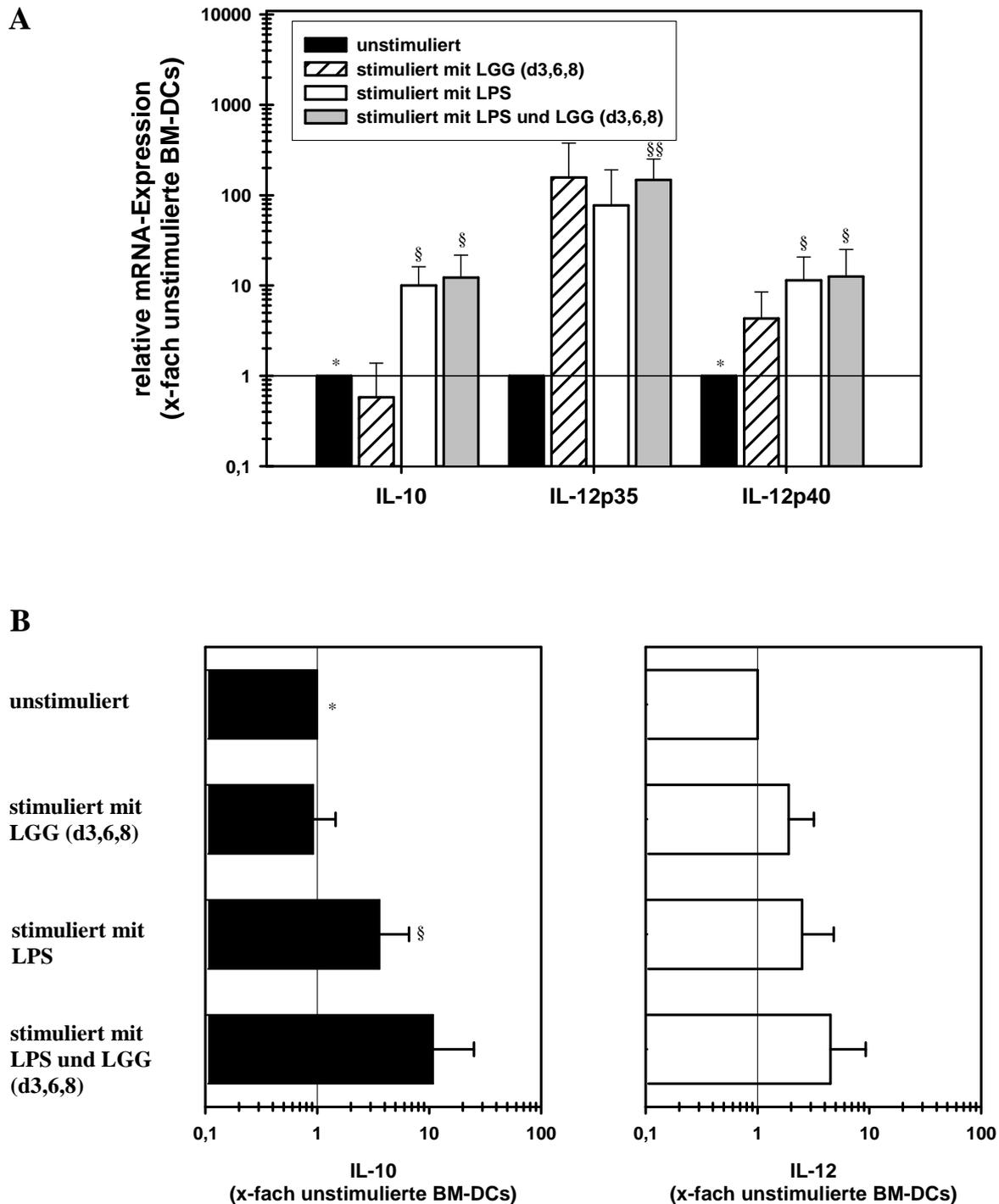


Abbildung 33: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von LGG (d3, 6, 8) auf die Produktion von IL-10 und IL-12. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von LGG (ab Tag Drei) für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die BM-DCs wurden geerntet, ihre RNA wurde isoliert und die cDNA wurde hergestellt. Die mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen wurde mittels Realtime-PCR ermittelt (A). Parallel wurden Überstände genommen und mittels ELISA wurde die Zytokinkonzentration von IL-10 und IL-12 ermittelt; diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (154 pg/ml IL-10 bzw. 16 pg/ml IL-12) in Relation gesetzt (B). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus jeweils vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$) bzw. zu unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$).

gleichermaßen reguliert werden müssen, kann auch auf Proteinebene, nach Stimulation mit LPS, keine erhöhte Zytokinmenge im Kulturüberstand gemessen werden. Nach Stimulation immaturer bzw. LPS-maturierter Kulturen mit LGG können sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen detektiert werden.

Die Zytokine IL-2 und IL-6 (Abb. 34) werden nach Kultur, unter Zusatz von LGG über die gesamte Kulturdauer (d3, 6, 8), ebenfalls in unterschiedlicher Weise, wie bei der späten LGG-Gabe ab Tag Acht der Kultur (d8), sekretiert. Nach LPS-Stimulation immaturer Kulturen wird die Produktion des IL-2 und IL-6, im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, erhöht; die Steigerung war im Falle des IL-6 allerdings nicht statistisch signifikant. Nach singularer Stimulation der Kulturen mit LGG bzw. nach gleichzeitiger Stimulation mit LPS und LGG konnten innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden.

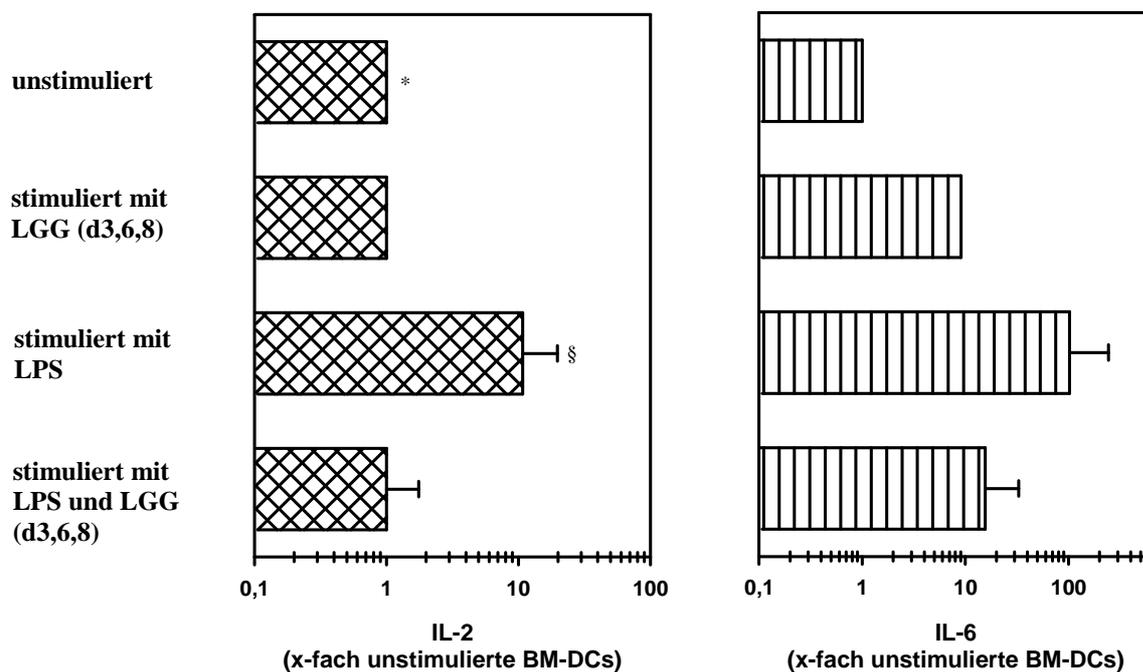


Abbildung 34: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von LGG (d3, 6, 8) auf die Produktion von IL-2 und IL-6. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 µg/ml LPS stimuliert. In parallelen Kulturen wurde zu unstimulierten bzw. LPS-stimulierten Kulturen LGG ab Tag Drei (d3, 6, 8) hinzugegeben. Anschließend wurden die Überstände genommen und die Zytokinkonzentration von IL-2 und IL-6 wurde mittels Radioaktivitätsbestimmung ermittelt; diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (0,023 U/ml IL-2 bzw. 1,2 U/ml IL-6) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus drei (IL-2) bzw. zwei (IL-6) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$) bzw. unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$).

3.3.1.4 Einfluss von *Lactobacillus rhamnosus* GG auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR)

Die veränderte Expression von kostimulatorischen CD86-Molekülen sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen durch BM-DCs, die in Anwesenheit von LGG differenziert und/oder maturiert wurden, lässt eine Modulation des T-Zell-stimulatorischen Potentials solcher BM-DCs vermuten. Mittels der gemischten Lymphozytenreaktion wurde daher untersucht, ob unstimulierte bzw. mit LPS stimulierte BM-DCs, die ab dem dritten Tag der Differenzierungsphase oder lediglich während der Ausreifungsphase mit LGG behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, eine unterschiedliche Kapazität zur Aktivierung von allophenen T-Zellen aufweisen.

Wie zuvor bereits gezeigt, besitzen BM-DCs, die an Tag Acht der Kultur mit LPS stimuliert wurden, im Vergleich zu unstimulierten BM-DCs, ein deutlich erhöhtes Potential, naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Abb. 35-A). Die Kultivierung von BM-DCs, mit durch Einfrieren inaktivierten LGG ab dem achten Tag der Kultur, steigert ebenfalls signifikant deren Kapazität zur Aktivierung naiver T-Zellen. Die Proliferation dieser T-Zellen liegt im Durchschnitt sogar 10 bis 30% über der Proliferation, die von LPS-stimulierten BM-DCs induziert wird (Abb. 35-B). Im Gegensatz dazu induzieren maturierte BM-DCs, welche zusätzlich zur Stimulation mit LPS mit LGG supplementiert wurden keine, weitere Steigerung der T-Zell-Proliferation, im Vergleich zu LGG-stimulierten Kulturen. Somit ist kein additiver Effekt der Stimulation vorhanden.

Im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, hat die Supplementierung der BM-DC-Kulturen zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierungsphase (ab Tag Drei der Kultur) mit „LGG gefroren“, nur eine geringe, statistisch nicht signifikante Steigerung der T-Zell-stimulatorischen Kapazität der BM-DCs zur Folge (Abb. 36-A). Im Gegensatz dazu, können BM-DCs, die bereits in der Differenzierungsphase mit LGG kultiviert wurden, nach anschließender Stimulation mit LPS, nur in signifikant erhöhtem Ausmaß allogene T-Zellen zur Proliferation anregen; die T-Zell-Proliferation ist jedoch im Durchschnitt um 40 bis 50%, im Vergleich zu der durch unbehandelte, LPS-stimulierte BM-DCs induzierten Proliferation, reduziert (Abb. 36-B).

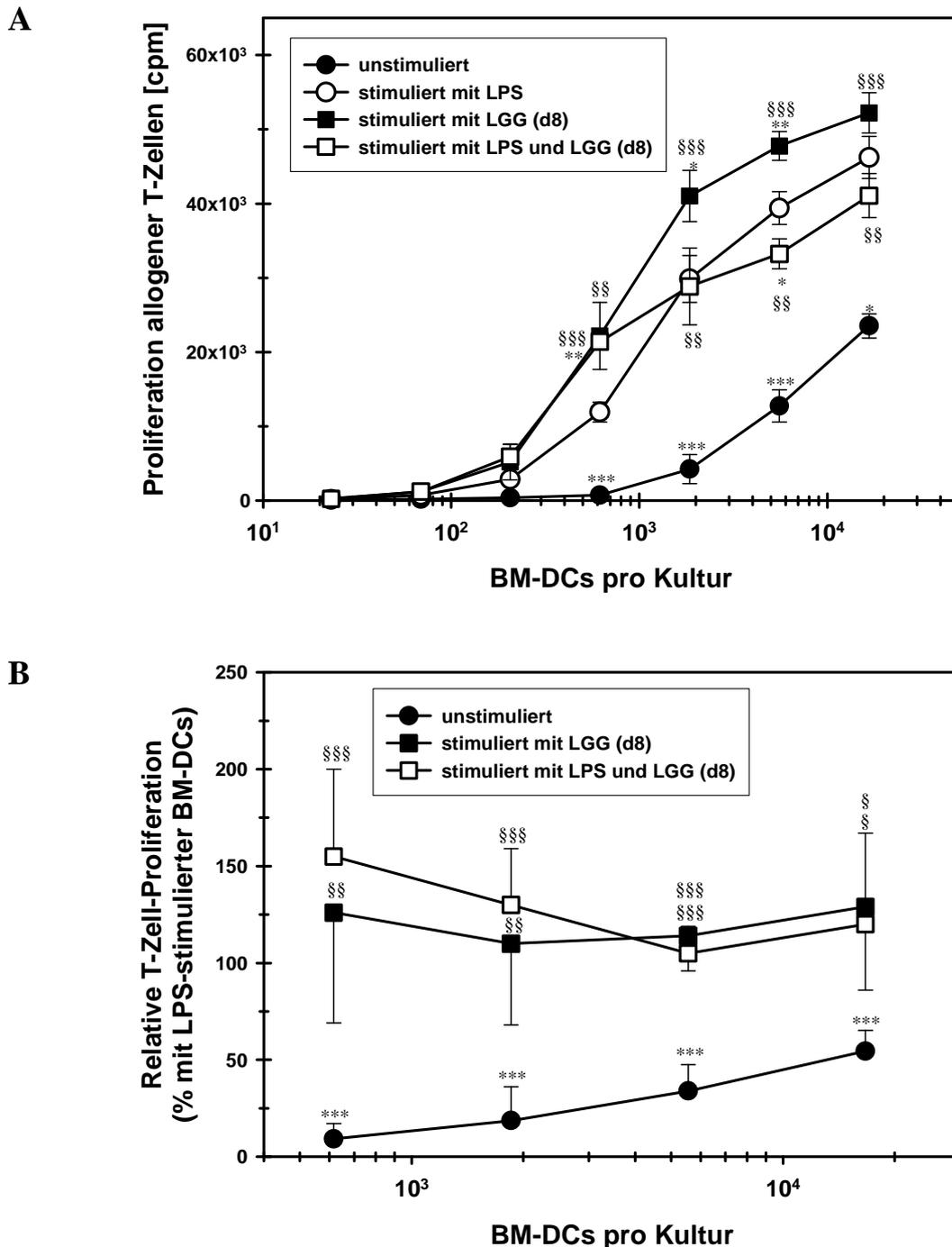


Abbildung 35: Die Stimulation immaturer BM-DCs mit hohen LGG-Dosen erhöht deren Kapazität zur Aktivierung naiver T-Zellen. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS und/oder 2×10^7 „LGG gefroren“/Kulturschale stimuliert oder verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, bei 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen (3×10^5 /Loch) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die proliferierenden Zellen durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin für weitere 18 Stunden radioaktiv markiert. **(A)** Die abgebildeten Daten, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten, sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als relative allogene T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Proliferation, die durch mit LPS stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (100%). Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs ($* = P < 0,05$; $** = P < 0,01$; $*** = P < 0,001$) bzw. unstimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde ($\$ = P < 0,05$; $\$\$ = P < 0,01$; $\$\$\$ = P < 0,001$).

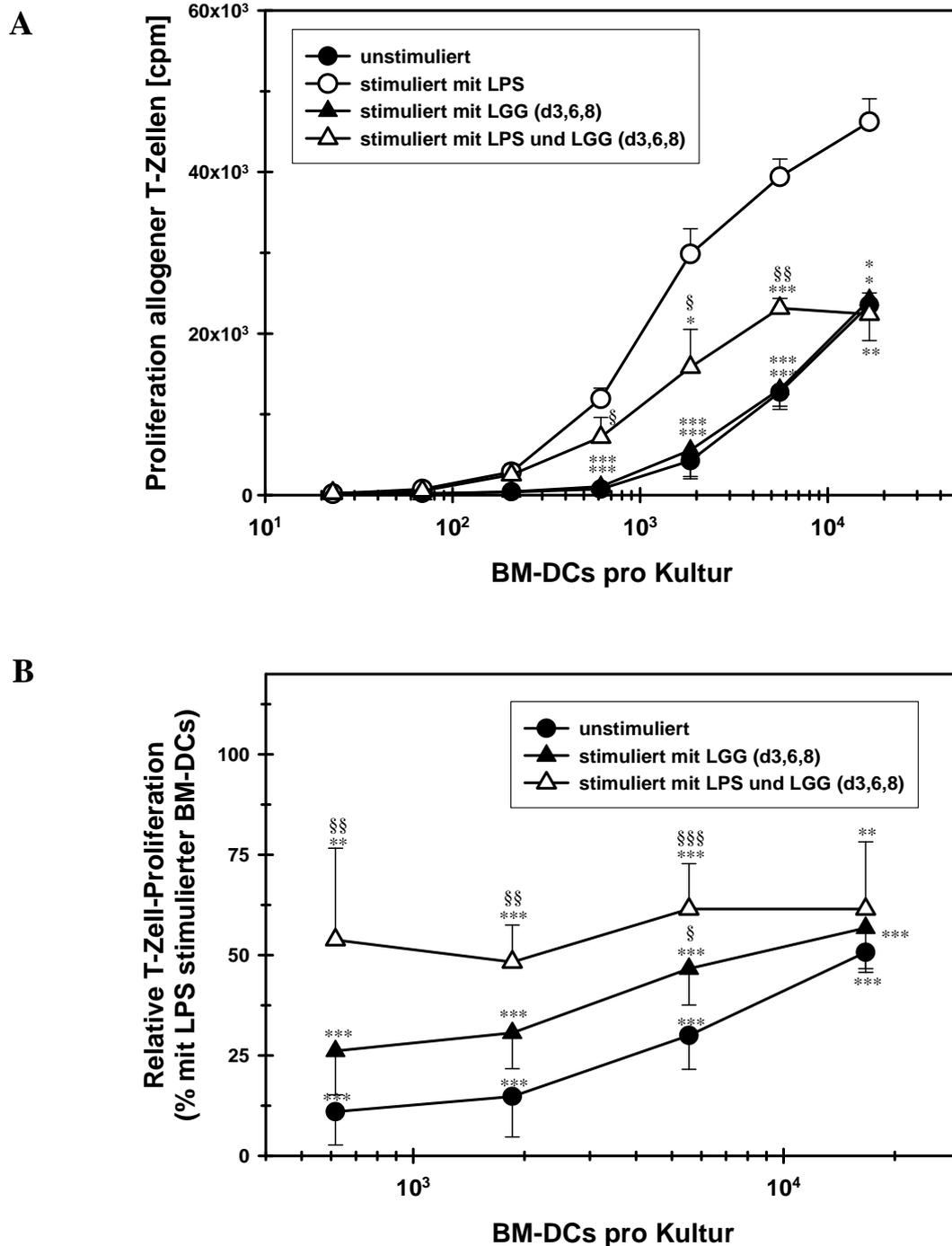


Abbildung 36: Eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit hohen LGG-Dosen über die gesamte Kulturdauer resultiert in einer reduzierten Proliferation naiver T-Zellen. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und/oder ab Tag Drei der Kultur mit 2×10^7 „LGG gefroren“/Kulturschale supplementiert. An Tag Acht erfolgte eine Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS oder die Kulturen verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, bei 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die proliferierenden Zellen durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci}/\text{Loch}$ ^3H -Thymidin für weitere 18 Stunden radioaktiv markiert. **(A)** Die abgebildeten Daten, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten, sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als relative allogene T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Proliferation, die durch, mit LPS stimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (100%). Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

Um den Einfluss einer geringeren Bakterienkonzentration auf die Funktion der BM-DCs zu untersuchen, wurden zusätzlich Experimente mit einer zehnfach geringeren LGG-Menge durchgeführt; diese lag bei einem Wert von 2×10^6 /Kulturschale. Wie man aus der Abbildung 37 entnehmen kann, induziert die Supplementierung unstimulierter BM-DCs mit 2×10^6 LGG im Vergleich zu unstimulierten unbehandelten BM-DCs (Abb. 37-A) zwar eine erhöhte T-Zell-Proliferation, diese liegt jedoch deutlich unterhalb der Proliferation naiver-T-Zellen, welche durch LPS-stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wird (Abb. 37-B).

Eine Supplementierung LPS-stimulierter BM-DCs mit LGG resultiert in einer gleich hohen Proliferation, wie sie mit LPS-stimulierten unbehandelten BM-DCs erzielt wurde. In der prozentualen Darstellung der Abbildung 37-B liegt die relative T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit LGG und LPS, wie auch nach singularer Stimulation mit LPS, bei 100%.

Eine BM-DC-Supplementierung über die gesamte Kulturdauer führt bei der niedrigeren LGG-Konzentration zu keinem Effekt (Abb. 38). Sowohl unstimulierte, als auch LPS-stimulierte Kulturen zeigen ein fast identisches Potential zur Induktion einer T-Zell-Proliferation, wie ihre unbehandelten Kontrollgruppen. Somit konnte dieser Versuch die Ergebnisse, die bei der durchflusszytometrischen Analyse gewonnen wurden, bestätigen.

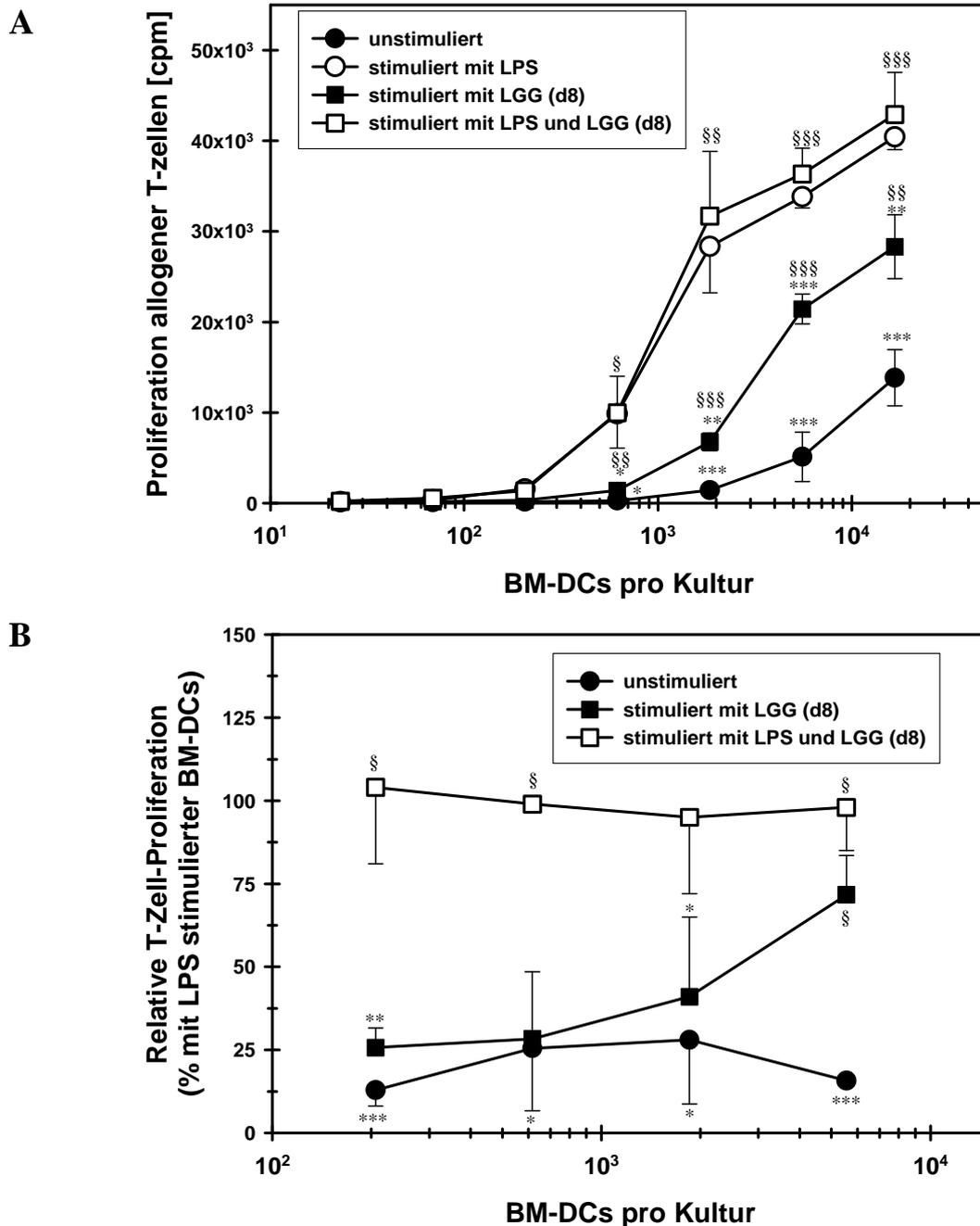


Abbildung 37: Die Stimulation immaturer BM-DCs mit niedrigen LGG-Dosen induziert keine Hyperproliferation naiver T-Zellen. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und/oder 2×10^6 „LGG gefroren“/Kulturschale kultiviert oder verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, bei 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen (3×10^5 /Loch) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die proliferierenden Zellen durch Zugabe von 0,25 $\mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin für weitere 18 Stunden radioaktiv markiert. **(A)** Die abgebildeten Daten, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten, sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als relative allogene T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Proliferation, die durch mit LPS stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (100%). Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

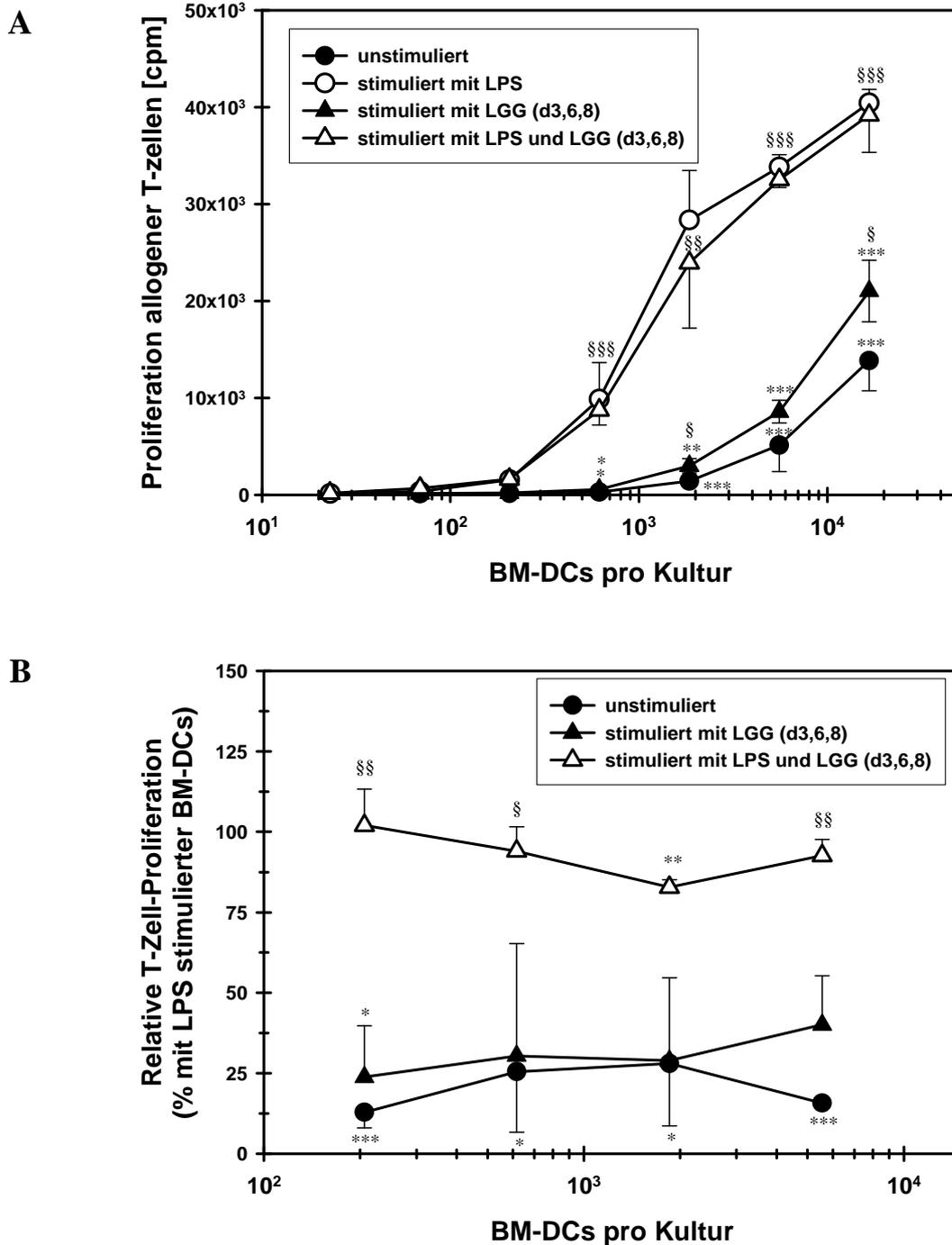


Abbildung 38: Eine Supplementierung der BM-DC-Kulturen über die gesamte Kulturdauer mit niedrigen LGG-Dosen induziert keine Reduktion der Proliferation naiver T-zellen. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und/oder ab Tag Drei der Kultur mit 2×10^6 „LGG gefroren“/Kulturschale supplementiert. An Tag Acht erfolgte eine Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS oder die Kulturen verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, bei 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen (3×10^5 /Loch) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die proliferierenden Zellen durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin für weitere 18 Stunden radioaktiv markiert. **(A)** Die abgebildeten Daten, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten, sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als relative allogene T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Proliferation, die durch mit LPS stimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (100%). Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

3.3.1.5 Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von *Lactobacillus rhamnosus* GG resultiert in einem veränderten Zytokinprofil kokultivierter naiver T-Zellen

Aufgrund der Modulation der beiden Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1 nach Supplementierung der BM-DC-Kulturen zu beiden untersuchten Zeitpunkten mit LGG, stellte sich die Frage, ob die nach Interaktion mit LGG-behandelten BM-DCs induzierten T-Zellen ein verändertes Zytokinmuster produzieren, und somit eine, im Vergleich zur Stimulation mit unbehandelten BM-DCs, unterschiedliche T-Helfer-Zell-Polarisierung stattfindet. Hierzu wurde die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-4 und TGF- β analysiert.

Die LGG-Supplementierung resultiert zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Abb. 39 und 40) für die Zytokine IFN- γ und IL-4 in einem differenten Zytokinprofil der T-Zellen, welche mit diesen unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs kokultiviert wurden. Für das dritte analysierte Zytokin TGF- β konnten, zu beiden Zeitpunkten, allerdings keine analogen Zytokinmuster festgestellt werden: innerhalb der Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. In den T-Zellen wird somit weder nach Kokultur mit LPS-stimulierten BM-DCs noch nach Kokultur mit LGG-behandelten Zellen, die TGF- β -Produktion signifikant moduliert.

Die Produktion des Zytokins IFN- γ wird in T-Zellen, nach Kokultur mit LPS-stimulierten BM-DCs, im Vergleich zu unbehandelten Kulturen, gering, aber signifikant erhöht. Eine Kokultivierung der T-Zellen mit unstimulierten LGG-behandelten BM-DCs resultiert bei einer späten LGG-Gabe ab Tag Acht der Kultur (Abb. 39), in einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der Zytokinproduktion. Im Gegensatz dazu, wird die Zytokinproduktion in den T-Zellen, die mit BM-DCs stimuliert wurden, welche über die gesamte Kulturdauer mit LGG supplementiert wurden, nicht verändert.

Eine gleichzeitige und späte (d8) Stimulation der BM-DCs mit LPS und LGG führt, nach anschließender Kokultur mit naiven T-Zellen, zu einem unveränderten Zytokinprofil, im Vergleich zur Kokultur mit LPS-stimulierten unbehandelten BM-DCs. Eine früh in der Differenzierungsphase andauernde LGG-Supplementierung (d3, 6, 8) hingegen, resultiert in einer signifikant verminderten IFN- γ -Ausschüttung (Abb. 40).

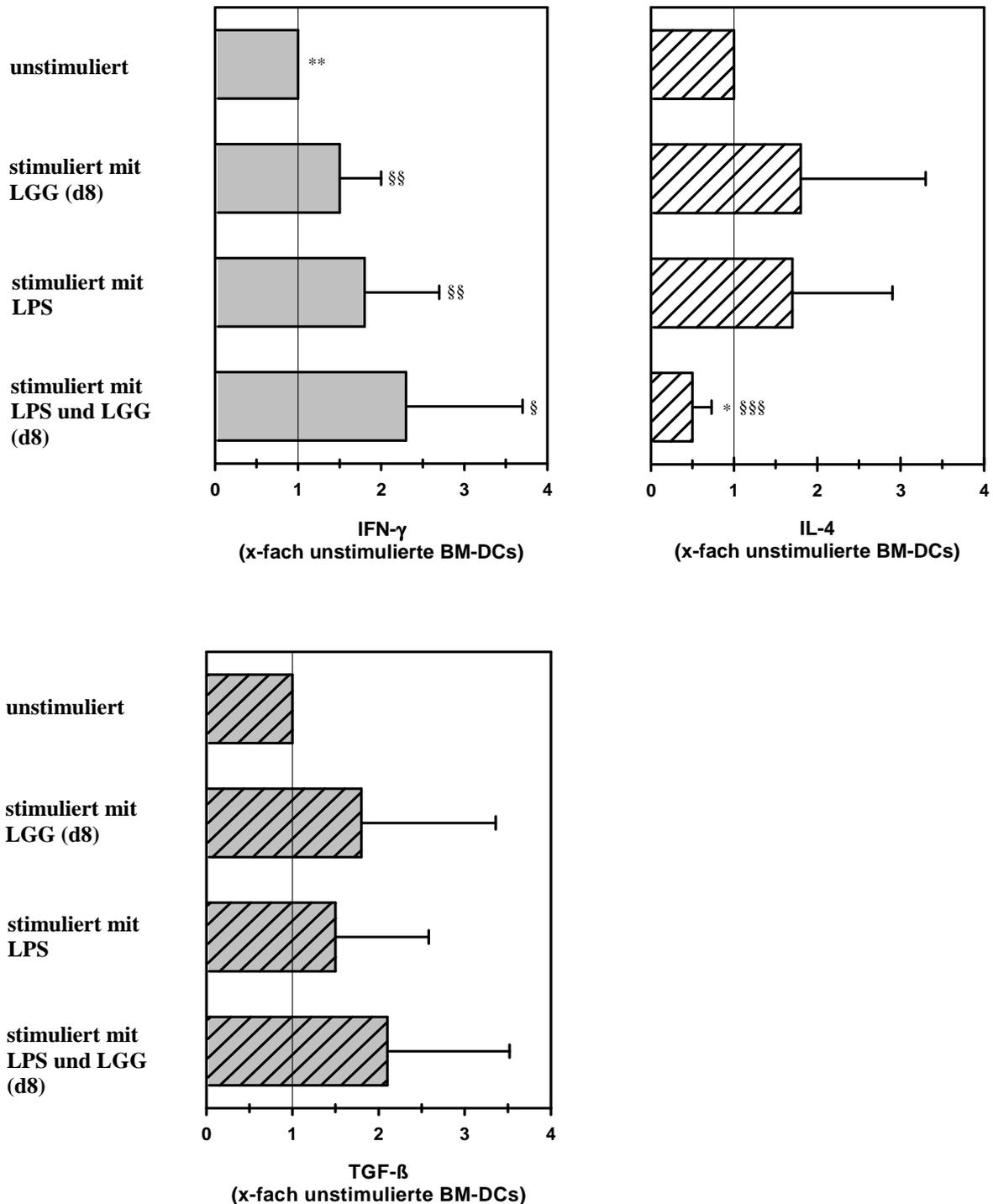


Abbildung 39: T-Zellen, die mit LGG-behandelten BM-DCs (d8) stimuliert wurden, verändern das Zytokinprofil. C57BL/6-BM-DCs wurden für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und/oder 2×10^7 LGG gefroren/Kulturschale kultiviert oder verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden Kulturüberstände genommen und der Gehalt an IFN- γ , IL-4 und TGF- β mittels ELISA ermittelt; dieser wurde zu der Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit unstimulierten BM-DCs (6030 pg/ml IFN- γ , 112 pg/ml IL-4 und 547 pg/ml TGF- β) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus acht (IFN- γ), sieben (IL-4) bzw. sechs (TGF- β) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$) bzw. unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

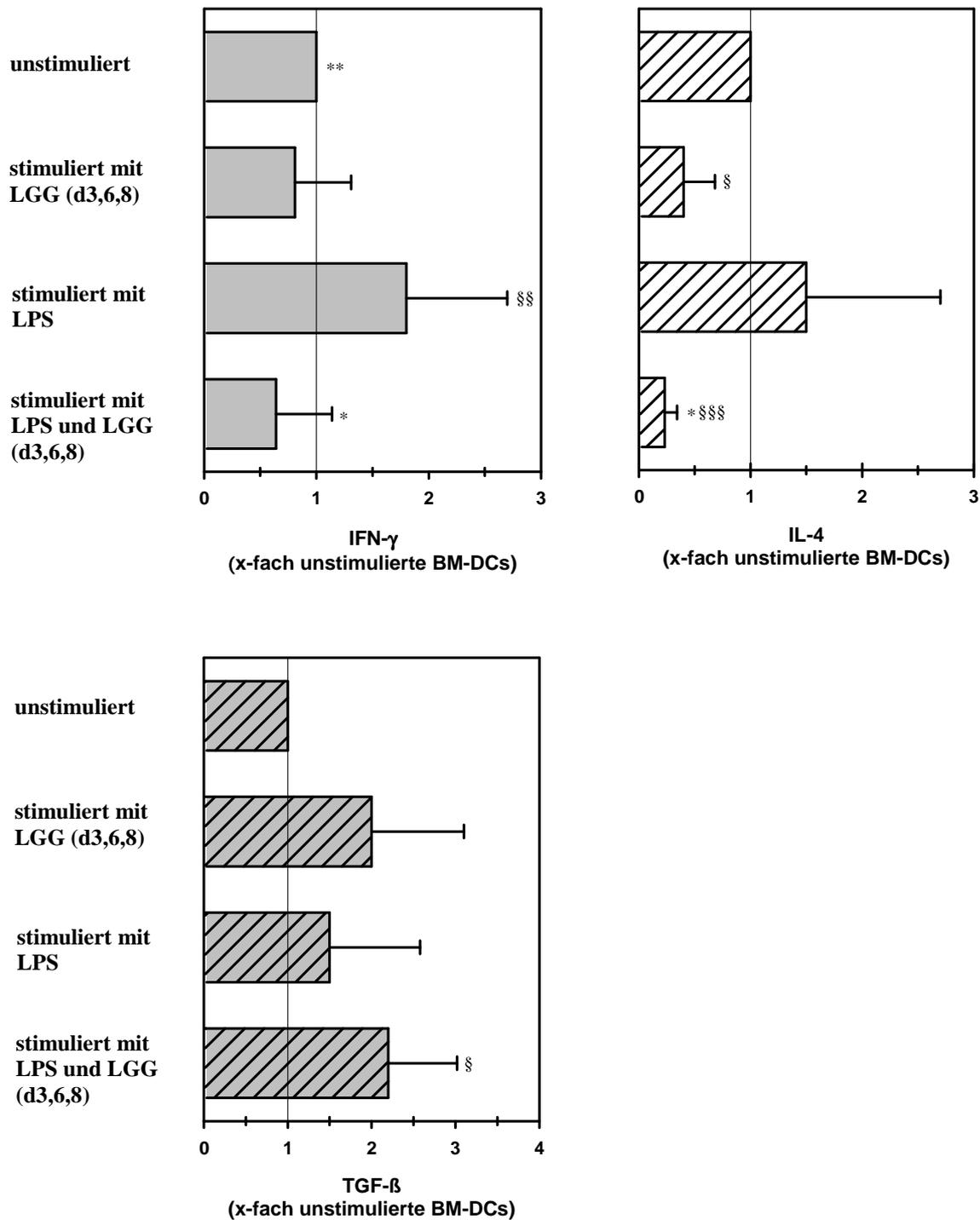


Abbildung 40: T-Zellen, die mit LGG-behandelten BM-DCs (d3, 6, 8) stimuliert wurden, verändern das Zytokinprofil. C57BL/6-BM-DCs wurden in Ab- oder Anwesenheit von LGG für acht Tage aus Vorläuferzellen generiert und für zwei weitere Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden Kulturüberstände genommen und der Gehalt an IFN- γ , IL-4 und TGF- β mittels ELISA ermittelt; dieser wurde zu der Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit unstimulierten BM-DCs (5330 pg/ml IFN- γ , 91 pg/ml IL-4 und 423 pg/ml TGF- β) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus fünf (IFN- γ), drei (IL-4) bzw. vier (TGF- β) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$) bzw. unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

T-Zellen, welche mit LPS-stimulierten BM-DCs kokultiviert wurden, zeigen, im Vergleich, nach Kokultur mit unstimulierten Zellen, kein differentes IL-4-Profil. Unstimulierte BM-DCs, welche ab Tag Acht der Kultur mit LGG stimuliert wurden, induzieren in T-Zellen kein verändertes Zytokinmuster, im Vergleich zu T-Zellen, welche mit unstimulierten unbehandelten Zellen kokultiviert wurden. Im Gegensatz dazu, resultiert die LGG-Gabe ab Tag Drei der BM-DC-Kultur, nach Kokultur mit T-Zellen, in einer signifikanten Abnahme des Zytokins. Eine gleichzeitige Stimulation der BM-DCs mit LGG und LPS induziert, nach Kontakt mit T-Zellen, eine signifikante Abnahme der IL-4-Produktion. Diese wurde zu beiden Zeitpunkten der LGG-Supplementierung beobachtet.

3.3.2 Einfluss von *Lactobacillus fermentum* auf die Differenzierung von BM-DCs

Neben dem Einfluss der probiotischen Bakteriesspezies *Lactobacillus rhamnosus* GG auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs wurde auch der Effekt der Kultur von BM-DCs in Anwesenheit von *Lactobacillus fermentum* (LF) untersucht; hierzu wurden zehn verschiedene Bakterien-Isolate aus afrikanischer Hirse verwendet.

Die Bakterien wurden mittels Einfrieren bei -20°C, ohne Zugabe eines Frostschutzes, inaktiviert. Sie wurden den BM-DC-Kulturen in einer Konzentration von 2×10^7 Bakterien/Kulturschale zugegeben. Die Supplementierung erfolgte, im Gegensatz zu den Versuchen mit LGG, an Tag Neun der Kulturperiode und dauerte, wie die Ausreifungsphase, 24 anstatt 48 Stunden an.

3.3.2.1 Durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss von *Lactobacillus fermentum* auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 41) der mit *Lactobacillus fermentum* kultivierten immaturren BM-DCs, wird ein Einfluss auf die Expression der

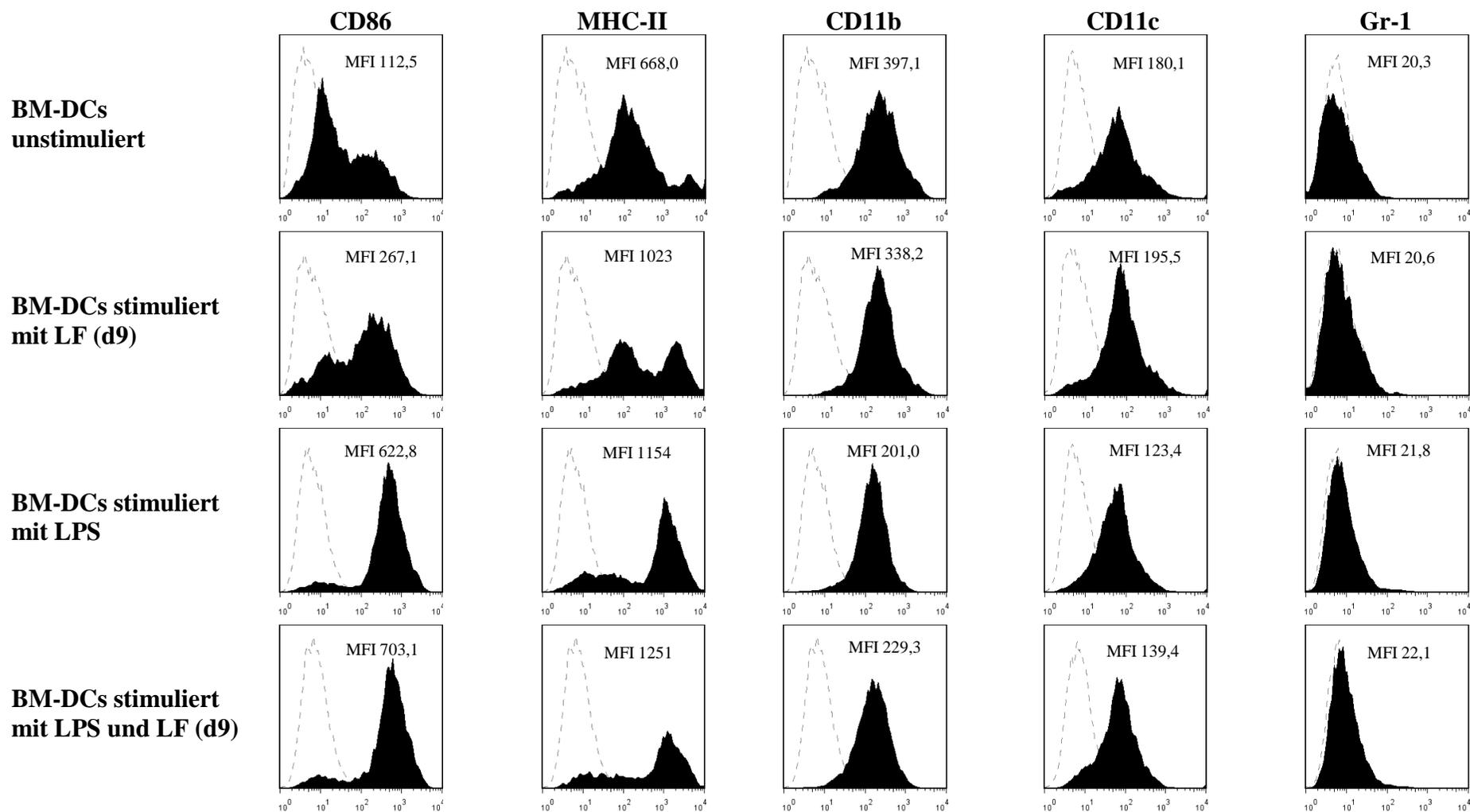


Abbildung 41: Einfluss von *Lactobacillus fermentum* auf die Differenzierung und Maturierung von BM-DCs. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für neun Tage aus Vorläuferzellen generiert und für die Dauer von 24 Stunden mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Parallel angelegte Kulturen wurden ab dem neunten Tag der Kultur (d9) für 24 Stunden mit zehn *Lactobacillus fermentum* (LF)-Isolaten in einer Konzentration von 2×10^7 /Kulturschale supplementiert; das Isolat K9-Lb3 ist repräsentativ für alle zehn analysierten Isolate dargestellt. Die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte, graue Linie dargestellt; weiterhin ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

Oberflächenmoleküle nach Supplementierung deutlich. Die Expression von CD86 sowie der MHC-Klasse-II-Moleküle auf mit *Lactobacillus fermentum* kultivierten Zellen ist deutlich erhöht. Die ausreifungsbedingte verstärkte Expression dieser Moleküle, nach Stimulation mit LPS, wird durch gleichzeitige Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit *Lactobacillus fermentum*, jedoch nur geringfügig, weiter verstärkt. Die Expression der für DCs charakteristischen Moleküle CD11b und CD11c sowie des bei myeloiden Suppressorzellen charakteristischen Moleküls Gr-1 ist, nach der Kultur mit *Lactobacillus fermentum* vergleichbar, mit der Expression der Moleküle auf unbehandelten BM-DCs.

Die in Abb. 41 für das Isolat K9-Lb3 dargestellten FACS-Analysen sind repräsentativ für alle zehn analysierten Isolate.

3.3.2.2 Einfluss von *Lactobacillus fermentum* auf die Zytokinproduktion von BM-DCs

Nach der phänotypischen Charakterisierung der BM-DCs wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Produktion der beiden Zytokine IL-10 und IL-12 durch die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit den unterschiedlichen Isolaten des *Lactobacillus fermentum* modifiziert wird.

Für das Zytokin IL-10 (Abb. 42-A) wurden lediglich marginale Konzentrationen in den unstimulierten Kulturen gemessen. Nach deren Supplementierung mit den einzeln analysierten Isolaten des *Lactobacillus fermentum*, wurde eine signifikante Abnahme der Zytokin-Produktion, nach Zusatz von K1-Lb6, K2-Lb4 bzw. K8-Lb1, festgestellt. Die anderen Isolate unterscheiden sich nicht in ihren Effekten auf die IL-10-Produktion.

Nach einer 24-stündigen Stimulation der BM-DC-Kulturen mit LPS, wurde die Produktion des IL-10 erhöht; diese Erhöhung war allerdings nicht signifikant. Eine gleichzeitige Stimulation der Kulturen mit LPS und den *Lactobacillus fermentum*-Isolaten resultiert nicht in einer veränderten Zytokinproduktion.

Die IL-12-Konzentration (Abb. 42-B) in den Überständen unstimulierter BM-DC-Kulturen wird nach Stimulation mit LPS signifikant vermindert. Durch eine Supplementierung der

unstimulierten Kulturen mit den einzelnen Isolaten, wird die IL-12-Produktion nicht moduliert. Allerdings erhöhen K1-Lb1 und K1-Lb6 die IL-12-Produktion bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS.

Schlussfolgernd ist es aufgrund der geringen Zytokin-Konzentrationen nicht möglich, nach Kultur, unter Zusatz der einzelnen Isolate, einen Polarisierungseffekt sowohl für IL-10 als auch für IL-12, festzustellen.

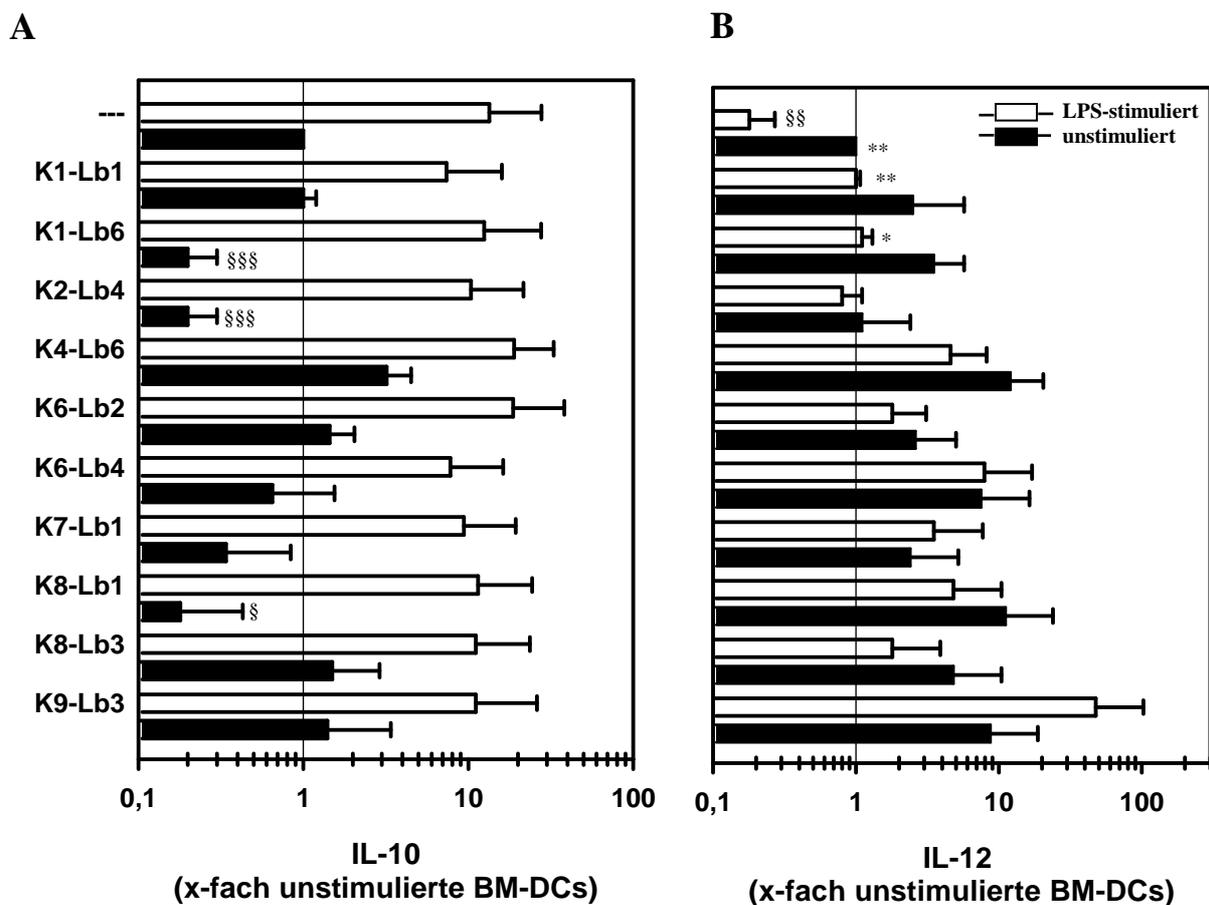


Abbildung 42: Einfluss der Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von *Lactobacillus fermentum* auf die Produktion von IL-10 und IL-12. C57BL/6-BM-DCs wurden für neun Tage aus Vorläuferzellen generiert und für die Dauer von 24 Stunden mit 1 µg/ml LPS stimuliert. In parallelen Kulturen wurden zu unstimulierten (schwarze Balken) bzw. LPS-stimulierten (weiße Balken) BM-DCs Isolate von *Lactobacillus fermentum* ab Tag Neun hinzugegeben. Anschließend wurden Kulturüberstände genommen und mittels ELISA wurde die Zytokinkonzentration von (A) IL-10 und (B) IL-12 in den Überständen ermittelt. Diese wurde zu der Zytokinproduktion unstimulierter BM-DCs (50 pg/ml IL-10 bzw. 80 pg/ml IL-12) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu LPS-stimulierten, unbehandelten BM-DCs (* = P<0,05; ** = P<0,01) bzw. zu unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§ = P<0,05; §§ = P<0,01; §§§ = P<0,001).

3.3.2.3 Einfluss von *Lactobacillus fermentum* auf die primärstimulatorische Kapazität von BM-DCs in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR)

Die veränderte Expression von CD86-Molekülen sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen durch BM-DCs, die in Anwesenheit von *Lactobacillus fermentum* ausgereift wurden, lässt eine Modulation des T-Zell-stimulatorischen Potenzials solcher BM-DCs vermuten. Mittels der gemischten Lymphozytenreaktion wurde daher untersucht, ob unstimulierte bzw. mit LPS stimulierte BM-DCs, die ab Tag Neun der BM-DC-Kultur mit den zehn Isolaten von *Lactobacillus fermentum* behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs, eine unterschiedliche Kapazität zur Aktivierung von allogenen T-Zellen aufweisen.

Wie schon mehrfach gezeigt werden konnte, haben LPS-stimulierte BM-DCs, im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, ein höheres Potential naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Abb. 43-A). Eine Supplementierung unstimulierter Kulturen mit *Lactobacillus fermentum* für eine Dauer von 24 Stunden erhöht deren T-Zell-stimulatorische Kapazität. Im Vergleich zur Proliferation naiver T-Zellen, welche durch LPS-stimulierte BM-DCs induziert wird, ergibt sich eine Steigerung der relativen T-Zell-Proliferation, die in Abhängigkeit von der Anzahl der BM-DCs in der Kokultur mit den allogenen T-Zellen zwischen 130% und 180% liegt (Abb. 43-B). Somit werden nach Stimulation mit *Lactobacillus fermentum*, höhere T-Zell-Proliferationsraten erreicht, als bei gleicher Dauer einer Stimulation mit LPS.

BM-DC-Kulturen, die gleichzeitig zur LPS-Stimulation mit *Lactobacillus fermentum*-Isolaten supplementiert wurden, weisen zwar ein höheres Potential zur Aktivierung der T-Zell-Proliferation auf, als nur LPS-stimulierte Kulturen, erreichen aber nicht die Proliferationsraten, wie sie bei unstimulierten LF-behandelten Kulturen erreicht werden. Somit konnte anhand der primärstimulatorischen Kapazität der BM-DCs gezeigt werden, dass *Lactobacillus fermentum* sowohl auf unstimulierte als auch auf LPS-stimulierte BM-DCs Einfluss hat und diese Daten in Korrelation zu der durchflusszytometrischen Analyse stehen; bei einer gleichzeitigen Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit *Lactobacillus fermentum* und LPS konnte die Expression der Oberflächenmoleküle gemäß der gemessenen MFI, im Vergleich zu LPS-stimulierten Kulturen, weiter verstärkt werden.

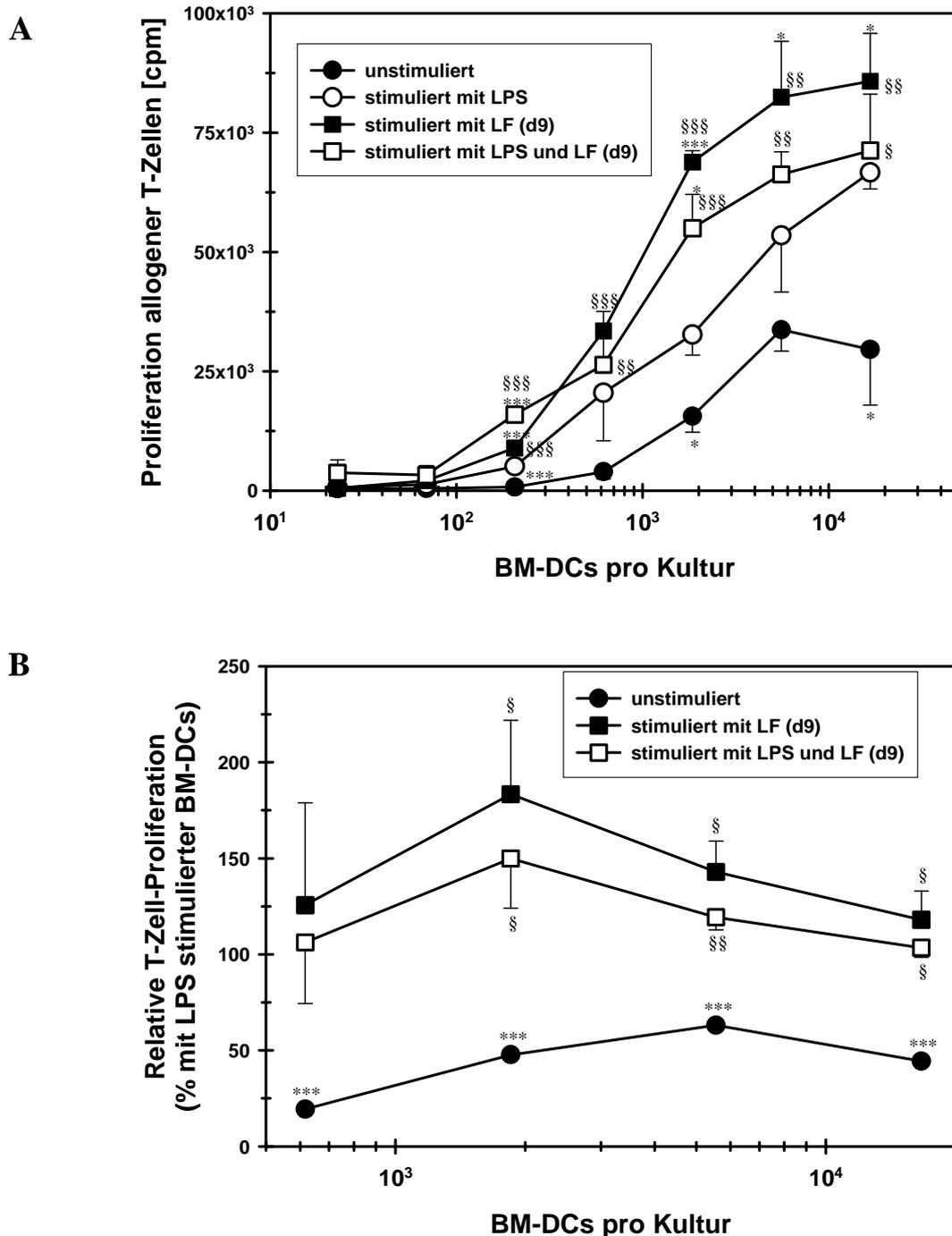


Abbildung 43: Die Stimulation immaturer BM-DCs mit *Lactobacillus fermentum* erhöht deren Kapazität zur Aktivierung naiver T-Zellen. Immature C57BL/6-BM-DCs wurden für neun Tage aus Vorläuferzellen generiert und für die Dauer von 24 Stunden mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS und/oder 2×10^7 LF/Kulturschale kultiviert oder verblieben unstimuliert. Anschließend wurden die BM-DCs geerntet, bei 30 Gy bestrahlt und in abgestuften Zellzahlen mit allogenen T-Zellen (3×10^5 /Loch) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die proliferierenden Zellen durch Zugabe von $0,25 \mu\text{Ci/Loch}$ ^3H -Thymidin für weitere 18 Stunden radioaktiv markiert. (A) Die abgebildete Graphik, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Radioaktivitätsbestimmung von Triplikaten, ist eine repräsentative Graphik zur durchgeführten MLR des Isolats K9-Lb3 von *Lactobacillus fermentum*. In der Abbildung (B) sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als relative allogene T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Proliferation, die durch mit LPS stimulierte unbehandelte BM-DCs induziert wurde (100%), dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu der Proliferation, die durch LPS-stimulierte, unbehandelte BM-DCs (* = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$) bzw. unstimulierte, unbehandelte BM-DCs induziert wurde (§ = $P < 0,05$; §§ = $P < 0,01$; §§§ = $P < 0,001$).

3.3.2.4 Die Differenzierung von BM-DCs in Anwesenheit von *Lactobacillus fermentum* verändert das Zytokinprofil kokultivierter naiver T-Zellen

Nachdem das Zytokinprofil der BM-DCs unter dem Einfluss der Kultur unter Zusatz von *Lactobacillus fermentum* untersucht wurde, wurde auch analysiert, ob das Zytokinmuster naiver T-Zellen, nach Kontakt mit *Lactobacillus fermentum*-behandelten BM-DCs, verändert wird. Hierzu wurde die Produktion der beiden Zytokine IFN- γ und IL-5 mittels ELISA ermittelt (Abb. 44).

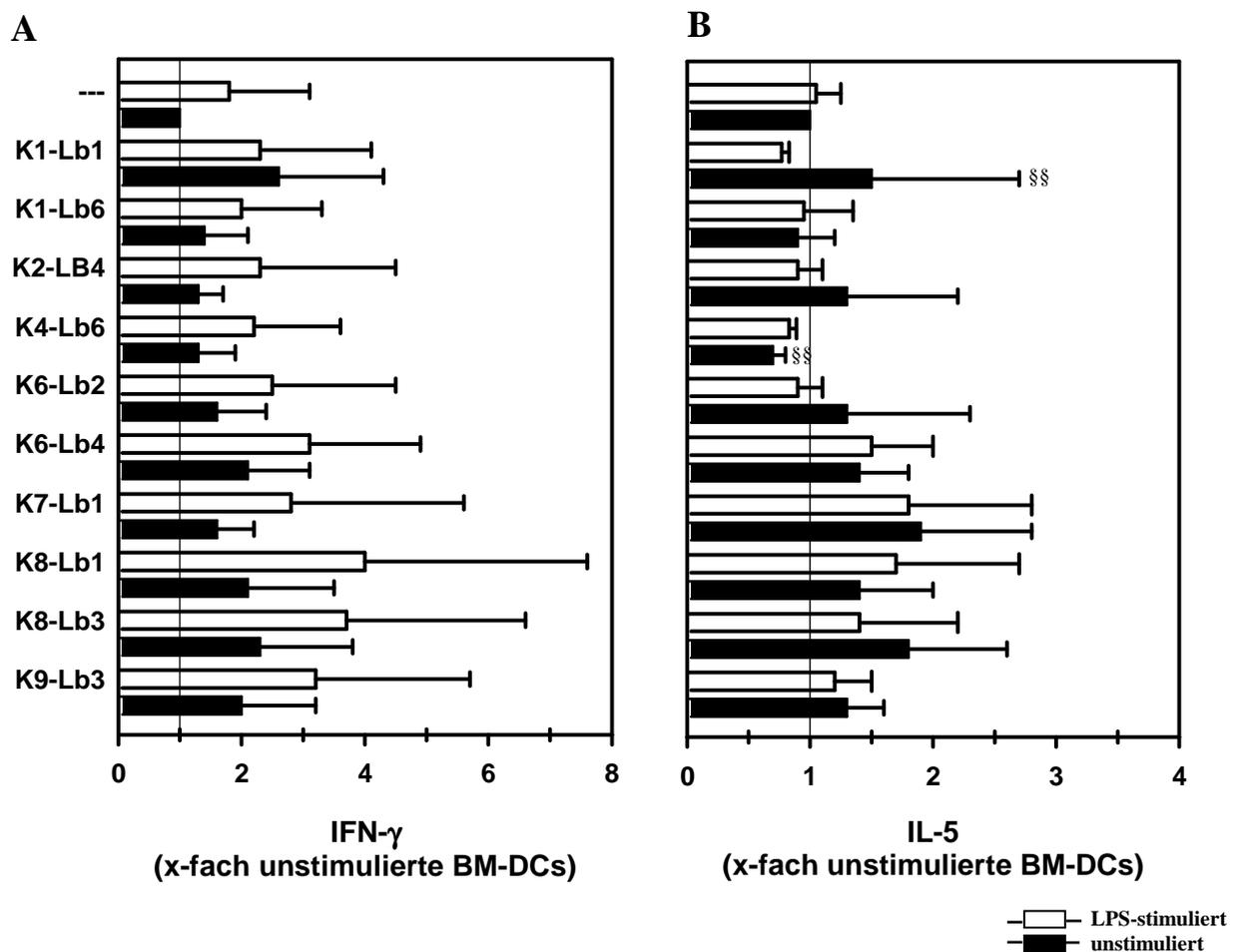


Abbildung 44: T-Zellen, die mit *Lactobacillus fermentum*-behandelten BM-DCs stimuliert wurden, verändern das Zytokinprofil. C57BL/6-BM-DCs wurden für neun Tage aus Vorläuferzellen generiert und für die Dauer von 24 Stunden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS stimuliert. In parallelen Kulturen wurden zu unstimulierten (schwarze Balken) bzw. LPS-stimulierten (weiße Balken) BM-DCs Isolate von *Lactobacillus fermentum* ab Tag Neun (d9) hinzugegeben. Anschließend wurden die BM-DCs bei 30 Gy bestrahlt und mit allogenen T-Zellen ($3 \times 10^5/\text{Loch}$) aus der Milz von BALB/c-Mäusen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden Kulturüberstände genommen und der Gehalt an IFN- γ (A) und IL-5 (B) mittels ELISA ermittelt; dieser wurde zu der Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit unstimulierten BM-DCs (15,1 ng/ml IFN- γ und 5,6 ng/ml IL-5) in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Symbole zeigen signifikante Unterschiede zu unstimulierten, unbehandelten BM-DCs (§§ = $P < 0,01$).

T-Zellen produzieren sowohl nach Kokultur mit unstimulierten als auch nach Kokultur mit LPS-stimulierten BM-DCs, gleiche Mengen des Zytokins IFN- γ (Abb. 44-A). Ihre Supplementierung mit den jeweiligen Isolaten des *Lactobacillus fermentum* resultiert nach Kokultur mit naiven T-Zellen, nicht in einem veränderten Zytokinmuster.

Ähnlich wie für IFN- γ gezeigt, produzieren T-Zellen, nach Kontakt mit unstimulierten BM-DCs, gleiche Mengen an IL-5, wie nach Kontakt mit LPS-stimulierten Kulturen (Abb. 44-B). Eine 24-stündige Stimulation immaturer BM-DCs mit K1-Lb1 induziert, nach Kokultur mit naiven T-Zellen, eine erhöhte Ausschüttung des Zytokins, während die Stimulation immaturer BM-DCs mit K4-Lb6 in T-Zellen zu einer signifikant verminderten IL-5-Produktion führt.

Schlussfolgernd ist, wie bereits für das Zytokinprofil der LF-behandelten BM-DCs, aufgrund der marginal gebildeten Zytokin-Konzentrationen und der geringfügigen Modulation, nach Stimulation mit *Lactobacillus fermentum*-Isolaten, nicht möglich, einen Polarisierungseffekt der T-Zellen, nach Kokultur mit diesen unterschiedlich ausdifferenzierten BM-DCs, festzustellen.

4. Diskussion

Um die Inzidenz und den Schweregrad allergischer Erkrankungen in der Bevölkerung zu verringern, gewinnen präventive Maßnahmen zur Vermeidung einer Sensibilisierung - neben der Entwicklung von effektiven Therapieformen - immer mehr an Bedeutung. Die Verabreichung von Probiotika bzw. Prebiotika repräsentieren zwei solch präventive Ansätze. Im Rahmen des Konzeptes der Verabreichung von Probiotika werden lebende, für die Gesundheit förderliche Bakterien der Nahrung zugefügt, wohingegen es sich bei dem prebiotischen Konzept um die Zuführung unverdaulicher Nahrungsbestandteile, meist Kohlenhydrate, handelt, welche aufgrund ihrer Eigenschaft als selektives Substrat für die gesundheitsfördernden Bakterien das Wachstum dieser Keime im Darm propagieren.

Obwohl der Einsatz von Pro- und Prebiotika auf dem Sektor der Lebensmittelindustrie oder als Therapieform bei zahlreichen Erkrankungen immer mehr auf dem Vormarsch ist, ist der Mechanismus ihrer Funktion noch nicht ausreichend charakterisiert und geklärt worden. Jedoch scheint die Annahme plausibel, dass DCs im Gastrointestinaltrakt, die in engem Kontakt mit der komplexen Mikrobiota stehen, hier eine zentrale Rolle übernehmen.

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten haben bereits gezeigt, dass probiotische Bakterienstämme die DCs in ihrer Reifung modulieren können [Christensen *et al.*, 2002; Drakes *et al.*, 2004]. Der Einfluss von prebiotischen Oligosacchariden ist dabei jedoch noch nicht untersucht worden. Im Mausmodell konnte zwar gezeigt werden, dass die Verfütterung von Prebiotika auf Bereiche des Immunsystems Auswirkungen hat [Vos *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2007b], ob ein Effekt dieser Prebiotika-Gabe allerdings alleine über die Verbreitung des Wachstums probiotischer Keime vermittelt wird oder ob Prebiotika nicht doch zusätzlich eine direkte Wirkung auf DCs ausüben, ist bisher nicht geklärt.

In den letzten Jahren wurde der bakteriellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota im Kontext mit dem Ernährungskonzept der Supplementierung mit Probiotika viel Aufmerksamkeit zugeschrieben. Einige Bakterien, hauptsächlich *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Spezies, prägen und definieren dieses Konzept. In großer Zahl sind sie in Lebensmitteln, meist in Form von Milchprodukten, wie Milchdrinks und Joghurt, aber auch im Bereich der Säuglings- und Kleinkindernahrung enthalten und werden zunehmend zur Prophylaxe und/oder Therapie diverser Krankheiten, wie der Antibiotika-assoziierten Diarrhoen [Shornikova *et al.*, 1997; Cruchet *et al.*, 2003], der Rotavirus-Infektionen oder den

allergischen Erkrankungen [Kalliomaki *et al.*, 2001; Rosenfeldt *et al.*, 2003; Viljanen *et al.*, 2005] eingesetzt.

Die meistverwendeten Probiotika sind diverse Milchsäurebakterien der Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ist neben *Lactobacillus casei* [Baba *et al.*, 2008] oder *Bifidobacterium breve* [Latvala *et al.*, 2008] einer der am häufigsten klinisch getesteten probiotischen Bakterienstämme und ist auch Teil dieser Dissertation. Dieses Bakterium wird hauptsächlich in der Behandlung von zahlreichen Durchfallerkrankungen erfolgreich eingesetzt; besonders bei Kindern sind diese Erkrankungen häufig und lang anhaltend vertreten. Positive Effekte wurden u.a. für die Prävention Antibiotika-assoziiierter Diarrhoen [D'Souza *et al.*, 2002] sowie die Behandlung akuter infektiöser Diarrhoen [Szajewska und Mrukowicz, 2001] beschrieben. Neben den Durchfallerkrankungen wird LGG jedoch auch in der Therapie der atopischen Dermatitis [Majamaa und Isolauri, 1997; Rosenfeldt *et al.*, 2003] oder zur Hemmung des Wachstums pathogener Mikroorganismen wie *Salmonella enterica* bzw. *E. coli* oder deren Anhaftens an Darmzellen eingesetzt [Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005].

Lactobacillus fermentum (LF) bildet ebenfalls die Grundlage meiner Arbeit. Dieses Bakterium war bisher eher rar in den diversen *in vitro* und *in vivo* Studien mit probiotischen Stämmen aufzufinden, scheint aber zunehmend eine zentrale Rolle in diesem Themengebiet einzunehmen. In einer von Zoumpopoulou [2008] veröffentlichten Studie wird dieser Keim als neuer probiotischer Kandidat für die Nahrungsmittelindustrie beschrieben.

Trotz der zahlreichen veröffentlichten Studien unter Einsatz von probiotischen Bakterien, ist die Auswahl an Studien mit *Lactobacillus rhamnosus* GG, besonders aber mit *Lactobacillus fermentum*, die in meiner Dissertation als Modell-Probiotika fungierten, begrenzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine 48-stündige (LGG) bzw. 24-stündige (LF) Supplementierung unstimulierter BM-DCs mit LGG oder LF in deren Ausreifung resultiert; diese wird als erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle sowie von MHC-Klasse-II charakterisiert. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen zweier Studien überein, die in der Arbeitsgruppe um Henri Braat [Braat *et al.*, 2004a und 2004b] mit humanen DCs unter Kultur mit LGG durchgeführt wurden. In einer Studie mit murinen Zellen konnte ebenfalls eine verstärkte Expression der analysierten Moleküle unter Einsatz von *Lactobacillus casei* [Christensen *et al.*, 2002] bzw. mit einem Gemisch (VSL#3) aus diversen *Lactobacillen* und *Bifidobakterien* aufgezeigt werden [Drakes *et al.*, 2004]. Parallel zur LGG- bzw. LF-induzierten Ausreifung konnte weder ein Einfluss auf DC-charakteristische Moleküle, wie

CD11c oder CD11b noch auf den Makrophagen-Marker F4/80 beobachtet werden. Eine gleichzeitige Stimulation der BM-DCs mit LPS und LGG bzw. LF führte zu einer weiteren Erhöhung der Expression analysierter Oberflächenmoleküle. Auch dieser Befund zeigt Parallelen zu der bereits erwähnten Studie an humanen DCs [Braat *et al.*, 2004]. Als Folge dieser verstärkten Ausreifung besitzen die BM-DCs ein erhöhtes Potential zur Stimulation naiver T-Zellen.

Für die nach Stimulation von BM-DCs mit LGG in Bezug auf deren Ausreifung beobachteten Effekte wurde eine Abhängigkeit von der Bakterienzahl ermittelt. Ein geringes Verhältnis von DCs und Bakterien (1:1) resultierte nicht in einer Ausreifung der unstimulierten BM-DCs. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten, die bei Verwendung der probiotischen Mischung VSL#3 [Drakes *et al.*, 2004], von *Lactobacillus casei* bzw. *Bifidobacterium animalis* [Baba *et al.*, 2008] oder von LGG [Pochard *et al.*, 2002] gezeigt wurden. In meiner Arbeit habe ich die Dosisabhängigkeit bzgl. der Ausreifung der BM-DCs nicht nur anhand der durchflusszytometrischen Analyse bestimmt, sondern diese auch durch T-Zell-Proliferationstests bestätigt. Hier wiesen mit einer niedrigen LGG-Dosis stimulierte BM-DCs ein nur halb so hohes Aktivierungspotential für T-Zellen auf, wie BM-DCs, die mit der hohen LGG-Partikelzahl konfrontiert wurden.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass mit probiotischen Bakterien behandelte DCs ein verändertes Zytokinmuster aufweisen. Die meisten Bifidusbakterien wie *B. animalis*, *B. lactis* oder *B. breve*, werden als potente IL-10-Induktoren beschrieben, weshalb ihnen ein anti-inflammatorisches Potential zugesprochen wird [Chung, 2001]. Unter den Lactobacillus-Stämmen scheint *Lactobacillus reuteri* eines der wenigen probiotischen Bakterien zu sein, welches in der Lage ist, in DCs eine erhöhte IL-10-Sekretion zu induzieren; so ist auch LGG kaum in der Lage, die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins zu induzieren [Zeuthen *et al.*, 2006]. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen aus meiner Dissertation: das Potential zur Produktion von IL-10 wird durch die Kultivierung mit LGG nicht erhöht. Dieses Phänomen konnte auch nach der Supplementierung der BM-DCs mit LF bestätigt werden. Somit stimmen die Daten nicht mit der Literatur überein, denn die Arbeitsgruppe um Zoumpoulou [2008] konnte in den peripheren mononukleären Zellen des humanen Blutes ein hohes Potential für die Produktion von IL-10 nach Kultur mit LF aufzeigen. Seine anti-inflammatorische Funktion wurde in einem präventiven Ansatz *in vivo* in Maus-Modellen der durch TNBS-induzierten Colitis sowie der Salmonellen-Infektion bestätigt.

Eine weitere Charakterisierung der LGG-induzierten Zytokine ergab für die Produktion des IL-12, nach Supplementierung unstimulierter BM-DC-Kulturen, eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung, wohingegen diese bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS und LGG sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nicht vorhanden war. In der Literatur wird LGG als ein Bakterium charakterisiert, welches die IL-12-Produktion kaum beeinflusst [Braat *et al.*, 2004]; dagegen verfügen *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus paracasei* über die stärkste Kapazität zur IL-12-Induktion [Zeuthen *et al.*, 2006].

Im Gegensatz zu LGG-supplementierten BM-DCs wurde in LF-behandelten Kulturen die IL-12-Produktion nicht beeinflusst; insgesamt wurden nur marginale Mengen dieses Zytokins nachgewiesen. In der Arbeitsgruppe um Takagi [2008] wurden diesbezüglich gegensätzliche Ergebnisse aufgezeigt; die Kultivierung mit *Lactobacillus fermentum* FERM P-13857 resultierte in höheren IL-12-Mengen, als die Supplementierung der BM-DC-Kulturen mit *Lactobacillus rhamnosus*. Diese gegensätzlichen Ergebnisse untermauern die Diskrepanzen, die zwischen den einzelnen *Lactobacillus*-Stämmen, im Hinblick auf deren Fähigkeit BM-DCs in ihrem Phänotyp zu modulieren, herrschen.

Inwieweit die erhöhte IL-12-Sekretion nach LGG-Gabe zu unstimulierten Kulturen eine zentrale Rolle in der Th1-Polarisierung einnimmt, wurde anhand der Induktion der Zytokine IFN- γ und IL-4 analysiert: in T-Zellen, welche in Kokultur mit LGG-behandelten unstimulierten BM-DCs gehalten wurden, ist eine signifikant erhöhte IFN- γ -Sekretion induziert worden. Die Produktion des IL-4 und des TGF- β wurde dabei durch die Stimulation mit LGG-behandelten Kulturen nicht beeinflusst. Somit konnte auch hier eine Th1-Polarisierung der T-Zellen als erhöhte IFN- γ -Produktion und unveränderte IL-4-Produktion aufgezeigt werden; dies stimmt mit den Daten einiger Publikationen überein [Sutas *et al.*, 1996; Pohjavuori *et al.*, 2004; Pochard *et al.*, 2002]. Nach Kokultur von T-Zellen mit LF-behandelten BM-DCs blieb die IFN- γ -Produktion, im Vergleich zu unbehandelten Kulturen, unverändert und korreliert mit den Daten der Studie um Zoumpopoulou [2008].

Ein neuer, bislang in der Literatur noch nicht beschriebener Ansatzpunkt für die Analyse der Effekte von LGG auf die Differenzierung von DCs stellt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Supplementierung der BM-DC-Kulturen bereits zu einem frühen Zeitpunkt ihrer Differenzierung (ab Tag Drei) dar. Die Wirkung, die in diesem Fall auf die Expressionsstärke der Oberflächenmoleküle CD86 und MHC-Klasse-II festgestellt wurde, ist konträr zu den Effekten, die bei später LGG-Gabe (ab Tag Acht) zu den BM-DC-Kulturen beobachtet wurde. Aufgrund des frühen Zeitpunktes und der langen Dauer hat die

Supplementierung der Kulturen mit LGG eine Expression von CD86 und MHC-Klasse-II-Molekülen zur Folge, die unter der Expression unbehandelter immaturer BM-DCs liegt. Weiterhin hat die Stimulation der frühzeitig mit LGG behandelten Zellen mit LPS keine Verstärkung der Expression dieser Moleküle zur Folge; somit wird phänotypisch keine vollständige Ausreifung induziert und die Entwicklung der DCs ist auf einem immaturren Status arretiert. Allerdings konnte der anhand der FACS-Analyse ermittelte Unterschied in der CD86-Expression zwischen den LGG-behandelten und den unbehandelten Zellen nicht auf mRNA-Ebene nachvollzogen werden. Die CD86-mRNA-Expression wird - ähnlich wie die CD80-mRNA-Expression - durch die Kultur in Anwesenheit von LGG nicht signifikant modifiziert. Ein weiteres Molekül, das als Reifungsmarker für DCs herangezogen werden kann, ist das Aktinbündelungsprotein Fascin [Ross *et al.*, 1998 und 2000]. Tatsächlich ist die Fascin-mRNA-Expression sowohl in den unstimulierten als auch in den LPS-stimulierten BM-DCs, unter gleichzeitiger Gabe von LGG, signifikant reduziert, was ebenfalls auf eine verminderte Differenzierung und Maturierung der Zellen hindeutet. Die inhibierte Ausreifung der mit LGG behandelten BM-DCs nach Stimulation mit LPS konnte auf funktioneller Ebene verifiziert werden, da das T-Zell-stimulatorische Potenzial der Zellen in der MLR stark vermindert ist.

Und obwohl der Einfluss von LGG auf den Phänotyp oder die Funktion von BM-DCs, aufgezeigt als verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle oder als verminderte Kapazität zur Stimulation naiver T-Zellen, so augenscheinlich ist, bleibt ihr Zytokinmuster unverändert. Sowohl die Produktion von IL-10 als auch die von IL-12 wird durch die Supplementierung mit LGG nicht moduliert. Diese Indizien sprechen also nicht für die Generierung tolerogener DCs. Eine Charakterisierung der Zytokine, die von T-Zellen nach deren Kokultur mit LGG-behandelten BM-DCs sekretiert wurden, ergab eine signifikant verminderte IL-4-Produktion, im Vergleich zu T-Zellen, die nach Kokultur mit unstimulierten unbehaltene bzw. LPS-stimulierten unbehandelten BM-DCs produziert wurden. Wegen der nicht gesteigerten IFN- γ -Produktion kann nicht von einer Th-1-Polarisierung ausgegangen werden. Hierzu sind noch weitere detaillierte Analysen notwendig.

Neben dem Feld der Probiotika stellen prebiotische Oligosaccharide das natürlichere Konzept in der Säuglingsernährung dar, um sich der optimalen Ernährungsweise, welche durch das Stillen erzielt wird, zu nähern [Vandenplas, 2002]. Muttermilch ist ein echtes Prebiotikum und ihr Haupt-Inhaltsstoff, die HMOS, sind in der Lage, eine von Bifidusbakterien dominierte Mikrobiota im Darm von gestillten Neugeborenen zu induzieren [Kunz *et al.*, 2000; Boehm *et*

al., 2003a]; sie fungieren als selektives Substrat für ihr Wachstum. Die Supplementierung der Säuglingsnahrung mit HMOS ist technisch sehr aufwendig und teuer und somit von der Nahrungsmittelindustrie kaum realisierbar. Eine mögliche Alternative dazu stellt der Zusatz von prebiotischen Oligosacchariden dar, die aus pflanzlichen Produkten (Fructo-Oligosaccharide; Inulin) extrahiert werden oder in fermentierten Milchprodukten (Galacto-Oligosaccharide) vorkommen.

Die zur Zeit im Bereich der Säuglings- und Kinderernährung am besten untersuchte prebiotische Mischung besteht zu 90% aus kurzkettigen Galacto-Oligosacchariden (scGOS) und zu 10% aus langkettigen Fructo-Oligosacchariden (lcFOS), die, hinsichtlich des hohen Gehaltes an Galactose und der Molekulargewichtsverteilung, den HMOS sehr ähnlich sind und diese somit auf physiologischem Wege nachgeahmt werden können [Boehm *et al.*, 2003a].

Während scGOS aus Laktose gewonnen werden, werden lcFOS hauptsächlich aus dem Inulin-Speicherkohlenhydrat von Nahrungsmitteln wie Zichorien isoliert. Der prebiotische Effekt dieser beiden Komponenten wurde sowohl einzeln als auch, insbesondere als Mischung, bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen. Der Fokus dieser Studien lag auf der Induktion eines bifidogenen Effektes bei flaschenernährten Säuglingen, deren Nahrung mit der prebiotischen Ballaststoffmischung scGOS/lcFOS angereichert wurde. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass sowohl nach Supplementierung der Nahrung von Frühgeborenen [Boehm *et al.*, 2002] als auch von Reifgeborenen [Schmelzle *et al.*, 2003], deren intestinale Flora, im Hinblick auf die Anzahl der Bifidusbakterien, der bifidusdominanten Mikroflora gestillter Säuglinge glich. Darüber hinaus wurde das Wachstum potenziell pathogener Keime, wie Bacteroides, Clostridien und Coliforme nach Fütterung mit scGOS/lcFOS angereicherter Säuglingsnahrung gehemmt [Boehm *et al.*, 2003b; Knol *et al.*, 2003].

Neben ihrer bifidogenen Eigenschaft sind scGOS und lcFOS auch in Bezug auf andere gesundheitsfördernde Funktionen untersucht worden. Die Ernährung mit scGOS/lcFOS beeinflusste die Stuhlkonsistenz und Frequenz positiv; der Stuhl bekam eine weiche Konsistenz ähnlich der von gestillten Kindern [Weaver *et al.*, 1988; Boehm *et al.*, 2002; Moro *et al.*, 2002]. Verantwortlich dafür sind die bei der Fermentation der prebiotischen Oligosaccharide entstehenden kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat [Van Loo *et al.*, 1999]. Die Bildung dieser Fettsäuren führte auch zur Absenkung des pH-Wertes im Stuhl, wodurch das Wachstum pathogener Keime im Darm unterdrückt wird

[Moro *et al.*, 2002]. In einer klinischen Studie wurde berichtet, dass bei Säuglingen mit einem erhöhten Allergierisiko die Inzidenz einer Erkrankung an atopischer Dermatitis, durch die Fütterung eines mit scGOS/lcFOS-angereicherten Muttermilchersatzproduktes, signifikant herabgesetzt wurde [Moro *et al.*, 2006; van Hoffen *et al.*, 2009].

Weitere Studien legen nahe, dass die Supplementierung der Nahrung mit Prebiotika zu veränderten Immunantworten führt. Im Tiermodell wurde beispielsweise gezeigt, dass die Fütterung von Mäusen mit der prebiotischen Mischung scGOS/lcFOS die Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort fördert [Vos *et al.*, 2006 und 2007b]. In dieser Studie wurde jedoch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei dem Th1-propagierenden Effekt um einen zusätzlichen direkten Einfluss der scGOS/lcFOS-Mischung auf Immunzellen handelt oder ob das von den Oligosacchariden geförderte Wachstum bestimmter Bakterienspezies die einzige Grundlage für den immunmodulierenden Effekt darstellt. Bestimmte Lactobacillen beispielsweise induzieren in DCs die Produktion großer Mengen IL-12 [Mohamadzadeh *et al.*, 2005] und können auf diese Weise die Differenzierung von Th1-Zellen herbeiführen. Allerdings variiert das Th1-polarisierende Potenzial innerhalb der verschiedenen Bakterienstämme, deren Ansiedlung und Wachstum im Darm durch prebiotische Oligosaccharide, wie scGOS/lcFOS, gefördert wird, sodass bisher auch noch keine allgemeingültige Aussage über die Wirkung der Prebiotika auf Immunzellen getroffen wurde.

Saure Oligosaccharide (AOS) stellen eine weitere Gruppe von prebiotischen Oligosacchariden dar, die mit 15-25% einen kleinen Anteil der Oligosaccharide in der Muttermilch ausmachen [Fanaro *et al.*, 2005]. Diese wurden von Guggenbichler *et al.* [1997] als wichtige Bestandteile der Karottensuppe identifiziert, deren positive Wirkung bereits vor einem Jahrhundert erkannt wurde und in der Therapie von gastrointestinalen Infektionen erfolgreich eingesetzt wurde [Moro, 1908]. AOS hemmen die Anhaftung von unterschiedlichen darmpathogenen Keimen an humane Darmepithelzellen und die Epithelzelllinie Hep-2 [Kastner *et al.*, 2002]. Heute werden spezifische saure Oligosaccharide mittels Hydrolyse aus Pektin (Pektin = p) gewonnen (pAOS); ihre Struktur basiert im Wesentlichen auf dem Monosaccharidbaustein Galacturonsäure.

In einer Studie von Fanaro *et al.* [2005] wurde gezeigt, dass pAOS im Gegensatz zu scGOS/lcFOS bereits in geringer Konzentration gesundheitsfördernde Funktionen wie eine weichere Stuhlkonsistenz und die Absenkung des pH-Wertes induzieren können. Eine verbesserte Stuhlfrequenz konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden.

Neben den in dieser Arbeit analysierten scGOS/lcFOS und pAOS wurden Humanmilch-analoge Neutrale Oligosaccharide (NOS) hinsichtlich ihres Effektes auf den Phänotyp und die Funktion von DCs untersucht; diese werden, ausgehend von Laktose, mittels metabolisch veränderter *E.coli*-Bakterien nach der Methode von Priem *et al.* [2002] generiert. Im Unterschied zu scGOS/lcFOS bzw. pAOS sind die NOS in der Lage, die durch Stimulation mit LPS induzierte Ausreifung der BM-DCs zu supprimieren; die reifungsbedingte verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 sowie von MHC-Klasse-II-Molekülen wird inhibiert. Auch die primär-stimulatorische Kapazität maturer BM-DCs ist nach Kultivierung unter der Supplementierung mit NOS-Präparationen für allogene T-Zellen signifikant schwächer. Folglich resultiert die Gabe von NOS zu den BM-DC-Kulturen nach deren Kontakt mit naiven T-Zellen in deren Hypoproliferation. Im Gegensatz dazu scheinen scGOS/lcFOS bzw. pAOS auch auf funktioneller Ebene keinen Einfluss zu zeigen, da eine Supplementierung der BM-DCs in keinem veränderten T-Zell-Stimulationspotential resultiert. Die gezeigten Ergebnisse könnten bedeuten, dass der Einsatz der NOS die Schaffung eines anti-inflammatorischen Milieus im Darm des Neugeborenen, nach Kontakt mit Mikroorganismen oder deren Bestandteilen, wie LPS, begünstigt und Schutz vor überschießenden Immunantworten bietet. Gerade dieser Zustand von DCs, der eine reduzierte Aktivierbarkeit aufweist, scheint für die Ausbildung der Toleranz von wesentlicher Bedeutung zu sein. Durch den Nachweis der HMOS im Urin gestillter Säuglinge konnte indirekt der Nachweis über ihren Zugang zum Blutkreislauf gebracht werden [Obermeier *et al.*, 1999]; somit ist es wahrscheinlich, dass sie nicht nur auf DCs bestimmter Regionen, z.B. des Gastrointestinaltraktes Einfluss haben, sondern im Allgemeinen DCs in ihrer Differenzierung modulieren können.

Auf der anderen Seite konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach einer Behandlung der DCs mit NOS-Präparationen die kokultivierten T-Zellen schlechter restimuliert werden konnten, als nach Kontakt mit NOS-unbehandelten DCs; dies zeigt, dass die prebiotischen Oligosaccharide die DCs in ihrer Funktion modulieren können. Die Tatsache jedoch, dass die Restimulierbarkeit dieser T-Zellen nur vermindert und nicht völlig aufgehoben war, gewährleistet weiterhin ihre immunologische Funktion nach einer Bakterieninfektion. Somit scheinen diese Substanzen, im Hinblick auf eine mögliche Allergieprävention, von besonderem Interesse zu sein.

Die Interaktion zwischen Darmbakterien und DCs, die als potenteste antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems charakterisiert und beschrieben sind, ist Gegenstand zahlreicher

Untersuchungen. Sowohl in der Entwicklung einer Immunität gegenüber schädlichen Pathogenen als auch in der Ausübung einer Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen wird ihnen eine große Bedeutung beigemessen. Mehrfach konnte bereits für diverse *Lactobacillus*- und *Bifidus*bakterien ein Einfluss auf DCs oder T-Zellen gezeigt werden, resultierend zum Beispiel in der Produktion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 [Rigby *et al.*, 2005; Di Giacinto *et al.*, 2005] und TGF- β [Di Giacinto *et al.*, 2005] oder in einer verminderten T-Zell-Proliferation [Braat *et al.* 2004; Drakes *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2004]. Eine verminderte T-Zellproliferation resultierte in der vorliegenden Arbeit nach Kokultur naiver T-Zellen mit BM-DCs, die unter Anwesenheit von NOS-Präparationen kultiviert wurden. Unter Berücksichtigung der auf Transkriptebene untersuchten Moleküle fällt auf, dass die Expression des inhibitorischen Moleküls B7-H3, auch bekannt als PD-L3 oder CD276 [Greenwald *et al.*, 2005], nach gleichzeitiger Stimulation der BM-DCs mit LPS und NOS, signifikant erhöht wird. Die Arbeitsgruppe um Prasad [2004] konnte zeigen, dass dieses Molekül bei der verminderten T-Zell-Proliferation eine wichtige Funktion zu haben scheint.

Eine verminderte Ausreifung der DCs, wie sie in dieser Arbeit nach Kultur mit NOS-Präparationen beobachtet wurde, konnte auch nach Stimulation mit diversen *Lactobacillus*- und *Bifidus*bakterien-Stämmen beobachtet werden; diese wurde durch eine moderate Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 charakterisiert [Christensen *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2004; Foligne *et al.*, 2007]. Die erhöhte Expression des Fc γ RIIB, welche nach Stimulation der BM-DCs mit NOS hervorgerufen wurde, scheint auch Indiz für eine verminderte Ausreifung zu sein. Dieses Molekül ist bekanntermaßen für die Suppression der humanen und murinen ITAM-induzierten (ITAMs, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) DC-Ausreifung bekannt [Boruchov *et al.*, 2005]. Als begleitendes Resultat einer verminderten Ausreifung, sind, laut Literatur, proinflammatorische Zytokine nur wenig bis gar nicht nachweisbar [Veckman *et al.*, 2004; Reis, 2006; Zeuthen *et al.*, 2006; Villadangos *et al.*, 2007]. Dies konnten meine Daten zur Zytokinproduktion nach Stimulation mit NOS-Präparationen bestätigen: das Potential zur Produktion des Zytokins IL-12 wurde durch die Kultivierung mit NOS nicht beeinflusst.

Die Beeinträchtigung der DC-Maturierung, welche durch eine moderate Expression der kostimulatorischen Moleküle manifestiert wurde, deutet auf einen semi-maturen Entwicklungsstatus der DCs hin; solche DCs können in die Induktion der Toleranz involviert sein. Der Begriff der semi-maturen DCs wurde von Lutz und Schuler [2002] als drittes Stadium von DCs, neben unreifen und voll-ausgereiften DCs, definiert.

Die Induktion von Tregs ist eine weitere Möglichkeit, ein anti-inflammatorisches Milieu im Darm zu erzeugen. Dies kann mittels der Sekretion des Zytokins IL-10 durch die DCs erfolgen [Akbari *et al.*, 2001; Mc Guirk *et al.*, 2002]. IL-10 ist ein wichtiges Zytokin, welches die Produktion von IL-12 sowie IFN- γ und TNF- α unterdrückt [Cavani *et al.*, 2000]. Im Darm ist IL-10 als Schlüsselmolekül für die Induktion von Tregs und für die Prävention der Colitis in der Maus von zentraler Bedeutung [Asseman *et al.*, 1999; Van Montfrans *et al.*, 2002]. Einige Probiotika, wie *Lactobacillus reuteri* und *Lactobacillus casei* [Smits *et al.*, 2005] oder *Bifidobacterium bifidum* [Niers *et al.*, 2007] sind in der Lage, die Produktion von IL-10 durch DCs zu induzieren und somit die Generierung von Tregs auszulösen. Bei den Tregs handelt es sich um eine heterogene Population von T-Zellen, die als zentrales Charakteristikum eine besondere Kapazität zur Inhibition von Immunantworten aufweisen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen [Roncarolo und Levings, 2000] und bieten Schutz vor der Entwicklung von Atemwegshyperreaktivität und Asthma [Akbari *et al.*, 2001]. Bezug nehmend auf die Literatur, kann in unserem System nicht von einer Entstehung tolerogener DCs, nach Kultivierung von BM-DCs mit den NOS-Präparationen, gesprochen werden. Die DCs sind zwar in ihrer Differenzierung inhibiert, eine signifikante Erhöhung des IL-10 ist sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene jedoch nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu, ergab die Charakterisierung der T-Zellen, die mit NOS-behandelten BM-DCs kokultiviert wurden, eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3; auf funktioneller Ebene konnte eine Treg-Induktion allerdings nicht bestätigt werden. In einem weiteren Nachweisverfahren konnte in diesen T-Zellen aber eine reduzierte Restimulierbarkeit nachgewiesen werden, welche auf eine Anergieinduktion hindeutet. Weitere detaillierte Analysen sind jedoch von Nöten, um eventuelle regulatorische Eigenschaften dieser T-Zellen zweifelsfrei belegen zu können.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die nach Interaktion mit NOS-behandelten BM-DCs induzierten T-Zellen ein verändertes Zytokinmuster produzieren und somit eine, im Vergleich zur Stimulation mit unbehandelten BM-DCs, unterschiedliche T-Helfer-Zell-Polarisierung stattfindet. Hierzu wurde die Expression der noch wenig charakterisierten Notch-Liganden überprüft [Ritz *et al.*, 2005]. Sowohl der Notch Rezeptor als auch die Liganden Delta und Jagged gehören zur Familie der Transmembranproteine, welche direkte Zell-Zell-Kontakte benötigen, um ein aktives Signal entstehen zu lassen. Während die Bindung von Notch an Jagged die Ausbildung einer Th2-Polarisierung erlaubt, induziert die Bindung an Delta die Ausbildung einer Th1-gerichteten Immunantwort. Nach Analyse der

beiden Liganden Delta-like-4 (DII-4) und Jagged1 fällt auf, dass die Expression des DII-4, nach Kultur mit den NOS-Präparationen, signifikant vermindert wird, die Expression des Jagged1 aber nahezu unverändert bleibt. Somit könnte die Analyse der Notch-Liganden eher eine Polarisierung der Effektorzellen in Th2 als in Th1 unterstützen. Zu diesem Resultat tendieren ebenfalls die Daten der intrazellulären FACS-Färbung, die unter Fokussierung auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen eine verminderte IFN- γ -Produktion nach Kokultur mit NOS-behandelten BM-DCs induzieren.

Der Befund, dass die verschiedenen NOS-Präparationen unterschiedliche Wirkungen auf die Differenzierung von BM-DCs aufweisen, könnte darauf beruhen, dass nicht die NOS selbst für diesen Effekt verantwortlich sind, sondern Substanzen, die während der NOS-Produktion gebildet werden. Weitere ausführliche Analysen bei der Herstellung der NOS-Präparationen sind somit nötig, um fälschliche Ergebnisse und Schlussfolgerungen diesbezüglich zu vermeiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sowohl Prebiotika als auch Probiotika einen direkten Einfluss auf die Differenzierung der DCs ausüben können. Obwohl zahlreiche weitere Studien notwendig sind, um diesen komplexen Mechanismus zu analysieren und zu verstehen, der sich hinter diesem immunmodulatorischen Effekt verbirgt, lassen die in dieser Dissertation gewonnenen Daten eine gesundheitsfördernde Wirkung der Pre- und Probiotika vermuten. Da sich jedoch probiotische Keime in ihrer Wirkungsweise stark unterscheiden, ist eine sorgfältige Auswahl, ob einzeln oder als Kombination, vor dem Einsatz in therapeutischen Studien unumgänglich.

Bei der Vielzahl verwendeter Bakterienstämme oder bestimmter Stammkombinationen, die in der heutigen Literatur anzutreffen sind, ist es sehr wichtig zu erwähnen, dass keine Analogieschlüsse von einem Probiotikum auf ein anderes gezogen werden dürfen. Denn die Wirkung hängt meist vom verwendeten Bakterium ab und dieser erreichte Effekt muss nicht bei einem anderen Bakterium identisch sein [Meier, 2007]. Auch die Form der Darreichung kann letztlich über die Wirkung entscheiden. Somit muss jedes Probiotikum für jede Indikation einzeln geprüft und analysiert werden, denn es gibt auch zahlreiche Studien, die keinen positiven Einfluss zeigen. Anscheinend lassen sich nur einige allergische Symptome präventiv verbessern, so die atopische Dermatitis, während für andere Erkrankungen, wie das allergische Asthma, durch den Einsatz der Probiotika keine Verbesserung der Symptomatik festgestellt werden kann [Vliagoftis *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2009]. Nur nach Durchführung

von sorgsam kontrollierten Studien können bestimmte Stämme, wie z.B. *Lactobacillus rhamnosus* GG oder *Lactobacillus fermentum*, in Zukunft zur Prävention und Komplementierung der Therapie weiterer zahlreicher Erkrankungen eingesetzt werden. Neben dem stark erforschten Feld der Probiotika, gibt es aktuell nur wenig publizierte Daten von prebiotisch aktiven Oligosacchariden in der Säuglingsnahrung. Eine Anreicherung der Mikroflora mit Bifidusbakterien und Lactobacillen sowie eine weichere Stuhlkonsistenz konnten zwar zahlreich nachgewiesen werden, ob diese Modifikationen der Darmflora auch weitere klinische Auswirkungen haben, ist bisher kaum untersucht worden.

Das Feld der funktionellen Lebensmittel, gerade auch im Segment der Säuglingsnahrung, ist und bleibt ein wichtiges Thema, welches weiterhin präklinischer und klinischer Untersuchungen bedarf.

5. Zusammenfassung

Neben der Therapie allergischer Erkrankungen, wie dem allergischen Asthma oder der atopischen Dermatitis, nehmen präventive Maßnahmen zur Vermeidung einer Sensibilisierung in der heutigen Bevölkerung vor dem Hintergrund ständig wachsender allergischer Erkrankungen einen immer höheren Stellenwert ein. Hierbei scheint der Einsatz von Pre- und Probiotika vielversprechend zu sein. Während man beim Konzept der Probiotika lebende apathogene Mikroorganismen der Nahrung zusetzt und direkt gesundheitsfördernde Effekte erzielt, versucht man mittels Prebiotika, über die Zufuhr unverdaulicher Nahrungsbestandteile, durch eine indirekte Verbesserung der Wachstumsbedingungen probiotischer Keime, das gleiche Ziel zu erreichen.

Pre- und Probiotika zählen zu den sogenannten funktionellen Lebensmitteln, mit denen man, gerade auch im Segment der Kleinkindernahrung, insbesondere im Bereich des Magen-Darm-Trakts, gezielt bestimmte Funktionen beeinflussen möchte; hierzu zählen unter anderem die Keimbesiedlung im Darm oder die Entwicklung von Infektionen und Allergien. Davon ist direkt oder indirekt vor allem auch das Immunsystem betroffen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss von Pre- und Probiotika auf den Phänotyp und die Funktion von DCs untersucht; hierzu wurden unreife DCs aus Vorläuferzellen im Knochenmark von Mäusen differenziert (BM-DCs). Nach Behandlung der Kulturen während der Differenzierung der BM-DCs mit neutraler Humanmilch-analoge Oligosaccharide-enthaltenden Präparationen (NOS-Präparationen), konnte ein Einfluss auf die Zellen nachgewiesen werden; diese sind in der Lage, die durch LPS induzierte Ausreifung der BM-DCs zu supprimieren, was anhand der verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bzw. von MHC-Klasse-II-Molekülen aufgezeigt wurde. Im Gegensatz dazu induzierte die prebiotische Ballaststoffmischung aus kurzkettigen Galacto-Oligosacchariden und langkettigen Fructo-Oligosacchariden (scGOS/lcFOS) bzw. saure Oligosaccharide (pAOS), die aus Pektin isoliert wurden, keinen Effekt auf DCs.

Die Beeinträchtigung der DC-Maturierung durch Kontakt mit NOS-Präparationen deutet auf einen semi-maturen Entwicklungsstatus hin. Diese DCs sind zwar in ihrer Differenzierung inhibiert, eine signifikante Erhöhung der IL-10-Produktion ist jedoch sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nicht nachweisbar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die primärstimulatorische Kapazität LPS-stimulierter BM-DCs, die in Anwesenheit von NOS-

Präparationen differenziert wurden, sowohl für allogene T-Zellen in der MLR, als auch für syngene OVA-TCR-transgene OT-II-T-Zellen signifikant vermindert war. Die Charakterisierung der T-Zellen, welche mit NOS-behandelten BM-DCs kokultiviert wurden, ergab zwar eine verstärkte Expression des für regulatorische T-Zellen (Tregs) charakteristischen Transkriptionsfaktors FoxP3, auf funktioneller Ebene konnte jedoch keine Induktion von Tregs beobachtet werden. Allerdings wurde in diesen T-Zellen eine Anergie induziert.

Das Zytokinmuster der kokultivierten T-Zellen, charakterisiert durch eine verminderte IFN- γ -Produktion, deutet eine Th2-Polarisierung an, welche mit der verminderten Expression der Delta-like-4-mRNA nach Kultur der BM-DCs mit den NOS-Präparationen in Einklang steht. Der Befund, dass verschiedene NOS-Präparationen unterschiedliche Wirkungen auf die Differenzierung von BM-DCs aufweisen, muss weitergehend untersucht werden.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kultivierung der BM-DCs mit den beiden probiotischen Bakterien *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) und *Lactobacillus fermentum* (LF) analysiert. Hier induzierte eine 48-stündige (LGG) bzw. 24-stündige (LF) Stimulierung unreifer BM-DCs mit den Bakterien eine Ausreifung der Zellen, welche durch eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Klasse-II sowie einem erhöhten Aktivierungspotential für T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur charakterisiert war. Eine gleichzeitige Stimulation der BM-DCs mit LPS und LGG bzw. LF führte zu einer weiteren Erhöhung der Expression der analysierten Oberflächenmoleküle. Für diese Effekte wurde eine Dosisabhängigkeit aufgezeigt; geringe LGG-Dosen resultierten nicht in einer Ausreifung der unreifen BM-DCs. Diese Abhängigkeit von der Bakterienzahl konnte nicht nur mittels der FACS-Analyse, sondern auch in der gemischten Lymphozytenkultur bestätigt werden. Hier wiesen BM-DCs, die lediglich mit niedrigen LGG-Dosen stimuliert wurden, nur ein halb so hohes Aktivierungspotential für T-Zellen auf, wie BM-DCs, die mit den hohen LGG-Dosen behandelt wurden.

In DCs, welche mit den beiden probiotischen Bakterien stimuliert wurden, wurde das Potential zur Produktion von IL-10 nicht erhöht. Die LGG-Supplementierung unreifer DCs resultierte in einer geringen, jedoch signifikanten Erhöhung des Zytokins IL-12; in kokultivierten T-Zellen wurde eine signifikant erhöhte IFN- γ -Produktion induziert. Im Gegensatz dazu blieb nach Kokultur von T-Zellen mit LF-behandelten BM-DCs die IFN- γ -Produktion unverändert.

Ein bislang nicht beschriebener Ansatzpunkt in der Analyse der Effekte von LGG war die hier ebenfalls durchgeführte Supplementierung der Kulturen während der Differenzierungsphase der DCs. Der Einfluss einer LGG-Gabe zu diesem frühen Zeitpunkt ist konträr zu den Effekten, welche bei einer späten Supplementierung während der Ausreifungsphase beobachtet wurden. Die LGG-Gabe während der DC-Differenzierung resultierte in einer geringen Expression der analysierten Oberflächenmoleküle und in einer unvollständigen Ausreifung der DCs. Dies konnte auch auf funktioneller Ebene als stark vermindertes Potential zur T-Zellstimulation bestätigt werden. Trotz dieser augenscheinlichen Effekte blieb das Zytokinmuster solch LGG-behandelter DCs unverändert; sowohl die IL-10, als auch die IL-12-Produktion wurde durch die Supplementierung mit LGG nicht moduliert. Inwieweit die mit LGG behandelten DCs Tregs induzieren, muss weiter analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

Akbari O, DeKruyff RH and Umetsu DT. 2001. Pulmonary DC producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunol.*; 2: 725-731.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*; 190: 995-1004.

Baba N, Samson S, Bourdet-Sicard R, Rubio M, Sarfati M. 2008. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J. Leukoc. Biol.*; 84: 468-476.

Bacchetta R, Gambineri E and Roncarolo MG. 2007. Role of regulatory T cells and Foxp3 in human diseases. *J. of Allergy and Clin. Immunol.*; 120: 227-35.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, and Hafler DA. 2001. CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.*; 167: 1245-1253.

Banchereau J and Steinmann RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 392: 245-252.

Barnden MJ, Allison J, Heath WR and Carbone FR. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology*; 76: 34-40.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T-cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.*; 195: 603-616.

Bernet M-F, Brassart D and Neeser J-R. 1994. *Lactobacillus acidophilus* La1 binds to cultured human intestinal epithelial cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*; 35: 483-489.

Björkstén B, Naaber P, Sepp E and Mikelsaar M. 1999. The intestinal microflora in allergic estonian and swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy*; Volume 29: 342-346.

Björkstén B. 2001. The epidemiology of food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*; 1: 225-227.

Björkstén B. 2004. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin. Immun.*; 25: 257-270.

Björkstén, B. 2005. Evidence of probiotics in prevention of allergy and asthma. *Cur. Drug Targets - Inflammation & Allergy*; 4: 599-604.

- Boehm G, Lidestri M, Casetta P, Jelinek J, Negretti F, Stahl B, Marini A. 2002.** Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*; 86: F178-181.
- Boehm G, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Marini A. 2003a.** Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatr.*; Suppl 441: 64-7.
- Boehm G, Lidestri M, Casetta P, et al. 2003b.** Effect of increasing number of intestinal bifidobacteria on the presence of clinically relevant pathogens. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 36: 578.
- Boehm G and Stahl B. 2003c.** Oligosaccharides. *Functional Dairy Products*. Cambridge: Woodhead; 203-43.
- Boehm G, Jelinek J, Stahl B, Van Laere K, Knol J, Fanaro S, Moro G, Vigi V. 2004.** Prebiotics in infant formulas. *J. Clin. Gastroenterol.*; 38: S76-S79.
- Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. 2005.** Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.*; 115: 2914-2923.
- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. 2003.** The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: Report on the Danone Symposium. *Am. J. Clin. Nutr.*; 78: 675-683.
- Braat H, de Jong EC, van den Brande JMH, Kapsenberg ML, Peppelenbosch MP, van Tol EAF, van Deventer SJH. 2004a.** Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J. Mol. Med.*; 82: 197-205.
- Braat H, van den Brande J, van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M and van Deventer S. 2004b.** *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4-T cells via modulation of dendritic cell function. *Am. J. Clin. Nutr.*; 80: 1618-1625.
- Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E. 2002.** Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.*; 347: 869-877.
- Braun-Fahrländer C. 2003.** Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April 2002. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*; 3: 325-329.
- Bros M, Jahrling F, Renzing A, Wiechmann N, Dang NA, Sutter A, Ross R, Knop J, Sudowe S, Reske-Kunz AB. 2007.** A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood*; 109: 3820-3829.
- Broussard EK, Surawicz CM. 2004.** Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutr. Clin. Care*; 7: 104-113.

- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I and Banchereau J. 1994.** Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. *J. Exp. Med.*; 180 (4): 1263-1272.
- Cavani A, Nassori F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. 2000.** Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J. Investig. Dermatol.*; 114: 295-302.
- Chang C.H., Furue M, Tamaki K. 1995.** B7-1 expression of epidermal Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon- γ or Interleukin-10. *Eur. J. Immunol.*; 25: 394.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. 1994.** Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*; 265: 1237-1240.
- Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. 1987.** Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med.*; 1,166(5):1229-44.
- Christensen H, Frøkiær H and Pestka JJ. 2002.** Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*; 168: 171-178.
- Chung F. 2001.** Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm.*; 10: 51-59.
- Coombs and Gell. 1968.** Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell, Oxford; S. 587-592.
- Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A and Giorgi PL. 1993.** Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*; 91: 637-641.
- Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. 1999.** Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica*; 88: Suppl. 430: 89-94.
- Coppa GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. 2004.** The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *J. Clin. Gastroenterol.*; 38: S80-S83.
- Cruchet S, Obregon MC, Salazar G, Diaz E, Gotteland M. 2003.** Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition*; 19(9): 716-21.
- Cummings JH. 1983.** Fermentation in the large intestine: evidence and amplications for health. *Lancet*; 1206-1209.
- De Waal M, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. 1992.** Interleukin-10. *Curr. Opin. Immunol.*; 4: 314-331.

- Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. 2005.** Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J. Immunol.*; 174: 3237-3246.
- Drakes M, Blanchard T and Czinn S. 2004.** Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity*; 72, 6: 3299-3309.
- D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. 2002.** Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ*; 324: 1361.
- Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. 2000.** Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*; 71 (6): 1589-96.
- Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G, Kock R and Vigi V. 2005.** Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new content for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41: 186-190.
- Favier CF, Vanghan EE, De Vos WM, Akkermans AD. 2002.** Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*; 68 (1): 219-26.
- Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2005.** PH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71(10): 6008-13.
- Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Younes AB, Chareyre F, Sirard JC, Pot B, Grangette C. 2007.** A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS one*; 2(3): e313.
- Fölster-Holst R, Müller F, Schnopp N, Abeck D, Kreiselmaier I, Lenz T, von Räden U, Schrezenmeir J, Christophers E, Weichenthal M. 2006.** Prospective, randomized controlled trial on *Lactobacillus rhamnosus* in infants with moderate to severe atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*; 155(6): 1256-61.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003.** Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*; 4 :330-336.
- Fukaura H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. 1996.** Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.*; 98: 70-77.
- Fuller R. 1989.** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*; 66: 365-378.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*; 125: 1401-1412.
- Gibson GR. 2004.** Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. Vol. 18, No 2: 287-298.

- Gillis S and Smith KA. 1977.** Long-term culture of tumorspecific cytotoxic T cells. *Nature*; 268: 154.
- Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. 2000.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*; 130: 3014-20.
- Goldin BR. 1998.** Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.*; 80: S203-7.
- Grajek W, Olejnik A and Sip A. 2005.** Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*; Vol. 52, No. 3/2005, 665-671.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005.** The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.*; 23: 515-548.
- Groeneveld M. 2009.** Probiotika - Wirkungen auf die Gesundheit und Einsatz in der Praxis. *Yakult Deutschland GmbH*; 1-23
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997.** A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*; 389: 737-742.
- Guggenbichler JP, De Bettignies-Dutz A, Meissner P, et al. 1997.** Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *E. coli* on uroepithelial cells. *Pharm. Pharmacol. Lett.*; 7: 35-8.
- György P, Norris RF, Rose CS. 1954.** Bifidus factor: a variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Biochem Biophys.*; 48: 193-201.
- Harmsen HJM, Wildeboer ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JC, Welling GW. 2000.** Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 30: 61-67.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchette P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. 2004.** Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*; 53: 1602-1609.
- Hidaka H, Tashiro Y, Eida T. 1991.** Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobact. Microflora*; 10 (1): 65-79.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*; 299:1057-1061.
- Hosoya D, Dhorraintra B, Hidaka H. 1988.** Utilization of (U14-C) fructooligosaccharides in man as energy resources. *J. Clin. Biochem. Nutr.*; 5: 67-74.
- Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. 2002.** Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.*; 47: 2625-2634.

- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock K.A., Sakuta H, Azuma M, Yakita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. 1994.** The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J. Exp. Med.*; 180: 1849.
- Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. 2000.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy.*; 30: 1604-10.
- Iwasaki A and Medzhitov R. 2004.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*; 5: 987-995.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002.** Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin*: 5. Auflage: 1-777.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. 2000.** Induction of Interleukin-10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.*; 192: 1213-1222.
- Kalliomäki M, Kirjavainen P, Earola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. 2001a.** Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 107: 129.
- Kalliomäki M, Salminen S, Kero P. 2001b.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*; 357: 1076-1079.
- Kalliomäki M, Isolauri E. 2003a.** Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin. Allergy Clin. Immunol.*; 3: 15-20.
- Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H and Isolauri E. 2003b.** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*; 361: 1869-1871.
- Kasper H. 2001.** Die Balance - funktionelle Aspekte der Darmflora. Ein Überblick der wissenschaftlichen Literatur. *Yakult*; 1-47.
- Kastner U, Glasl S, Follrich B, Guggenbichler JP and Jurenitsch J. 2002.** Acidic oligosaccharides as active principle of aqueous carrot extracts in the prophylaxis and therapy of gastrointestinal infections. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152 (15-16): 379-381.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mouse to endotoxin. *Immunity*; 11: 115-122.
- Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewski K. 1979.** A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.*; 1979 Oct; 123(4): 1548-50.
- Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M. 2005.** Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol.*; 71(6): 3158-62

- Knol J, Steenbakkers J, van der Linde E, et al. 2002.** Bifidobacteria species that are present in breast fed infants are stimulated in formula fed infants by changing to a formula containing prebiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*; 34: 477.
- Knol J, van der Linde EGM, Wells JCK, Böckler HM. 2003.** An infant formula containing prebiotics changes the intestinal microflora of term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 36: 566.
- Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A, Urbanek R. 2008.** Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*; 121, 4: e850-e856
- Kopp MV, Salfeld P. 2009.** Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*; 12 (3): 298-303.
- Kullen MJ, Bettler J. 2005.** The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Current Pharmaceutical Design*; 11: 55-74.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. 2000.** Oligosaccharides in human milk: structural functional and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.*; 20: 699-722.
- Latvala S, Pietilä TE, Veckman V, Kekkonen RA, Tynkkynen S, Korpela R, Julkunen I. 2008.** Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J. Gastroenterol.*; 14 (36): 5570-5583.
- Lee MG, Borowski TA, Udey MC. 1993.** Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*; 101: 883-886.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. 2002.** The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; 129: 263-276.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965.** Probiotics: growth promotion factors produced by microorganisms. *Science*; 147:747-8.
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. 1994.** Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *Immunol. Med. Microbiol.*; 10: 55-64.
- LoCascio RG, Ninonuevo MR, Freeman SL, Sela DA, Grimm R, Lebrilla CB, Mills DA, German JB. 2007.** Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J. Agric. Food Chem.*; 31; 55(22): 8914-8919.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie A, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999.** An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*; 223: 77-92.
- Lutz MB and Schuler G. 2002.** Immature, semi-mature and fully mature DC: which signals induce tolerance or immunity. *Trends Immunol*; 23(9): 445-9.

- Lyons AB. 2000.** Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods.*; 243(1-2): 147-54.
- Majamaa H, Isolauri E. 1997.** Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.*; 99: 179-85.
- Masurier S, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, Guigon M. 1999.** Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology*; 96: 569-577.
- Matentzoglou S, Müller S-D. 2004.** Prebiotische Ballaststoffe: Neue Entwicklungen in der Säuglingsernährung. *Zschr. Ganzheits Medizin*; 16: 368-370.
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R and Saarela M. 2002.** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*; Vol. 12, Issues 2-3: 173-182.
- McGuirk P, McCann C, Mills KHG. 2002.** Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates IL-10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.*; 195: 221-231.
- Medzhitov R, Janeway CA. 1997.** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*; 91: 295-298.
- Medzhitov R, Preston-Huriburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA. 1998.** MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signalling pathways. *Mol. Cell*; 2: 253-258.
- Meier R. 2007.** Probiotika - Die Bedeutung der intestinalen Flora für die Genese und Therapie gastrointestinaler Erkrankungen. Irrungen und Wirrungen. *Forum Med Suisse*; 7: 184-191.
- Mellor AL and Munn D. 2004.** Policing pregnancy: Tregs helps keep the peace. *Trends Immunol.*; 25: 563-565.
- Metchnikoff E. 1907.** The prolongation of life. *London: Butterworth-Heinemann*, 1907.
- Mikkelsen TL, Bakman S, Sorensen ES, Barholt V. 2005.** Sialic acid-containing milk proteins show differential immunomodulatory activities independent of sialic acid. *J. Agric. Food Chem.*; 53: 7673-7680.
- Miller TL, Wolin MJ. 1996.** Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 1589-92.
- Miniello VL, Moro G, Armenio L. 2003.** Probiotics in infant milk formulas: new perspectives. *Acta Paediatr Suppl.*; 91 (441): 68-76.
- Mitsuoka T. 1992.** Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.*; 50 (12): 438-46.

- Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. 2005.** Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 102: 8: 2880-2885.
- Mommaas AM, Mulder AA, Out CJ, Girolomoni G, Koerten HK, Vermeer BJ, Koning F. 1995.** Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cell in situ. *Eur. J. Immunol.*; 25: 520-525.
- Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. 2001.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*; 19: 683-765.
- Moro E. 1908.** Karottensuppe bei Ernährungsstörungen der Säuglinge. *München Med. Wschr.*; 31: 1637-40.
- Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. 2002.** Dosage related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*; 34: 291-295.
- Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. 2006.** A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch. Dis. Child*; 91: 814-819.
- Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. 2002.** Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *British Journal of Nutrition*; 87: 405-420.
- Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. 1998.** The human toll signalling pathway : divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.*; 187: 2097-2101.
- Nagler-Anderson C. 2001.** Man the barrier: strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat. Rev. Immunol.*; 1: 59.
- Newburg DS. 1996.** Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defence. *Journal of Mammary Gland biology and Neoplasia*; 1: 271-283.
- Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H. 1997.** Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in west compared with east germany. *Clin. Exp. Allergy*; 27: 886-892.
- Niers LEM, Hoekstra MO, Timmerman HM, van Uden NO, de Graaf PMA, Smits HH, Kimpen JLL, Rijkers GT. 2007.** Selection of Probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*; 149: 344-352.
- Obermeier S, Rudloff S, Pohlentz G, Lentze MJ, Kunz C. 1999.** Secretion of ¹³C-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral [¹³C]galactose load. *Isotype Environ. Health Stud.*; 35: 119-125.
- Parkin J, Cohen B. 2001.** An overview of the immune system. *Lancet*; 357: 1777-89.

- Picciano MF. 2001.** Nutrient composition of human milk. *Pediatric Clinics in North America*; 48: 53-67.
- Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel A-B, Pestel J, Mercenier A. 2002.** Lactic acid bacteria inhibit Th2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 110: 617-23.
- Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tittanen M, Vaarala O, Savilahti E. 2004.** *Lactobacillus GG* effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 114: 131-136.
- Prasad DV, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, Dong C. 2004.** Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.*; 173: 2500-2506.
- Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A and Samain E. 2002.** A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology*; Vol. 12, No. 4: 235-240.
- Puccetti P and Grohmann U. 2007.** IDO and regulatory T cell: a role for reverse signalling and non-canonical NF- κ B activation. *Nat. Rev. Immunol.*; 7: 817-823.
- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, and Noelle RJ. 2004.** CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.*; 22: 307-328.
- Randolph GJ. 2001.** Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.*; 13: 267-274.
- Reis e Sousa C. 2004.** Tol-like-receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls" *Seminars in Immunology*; 16: 2734.
- Reis e Sousa C. 2006.** Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.*; 6: 476-483.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Cstagnoli P. 2001.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*; 2: 361.
- Resta-Lenert S and Barrett KE. 2003.** Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli*. *Gut*; 52: 988-97.
- Rey J, Garin N, Spertini F, Corthesy B. 2004.** Targeting of secretory IgA to peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J. Immunol.*; 172: 3026.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Nowak D, von Mutius E. 2001.** Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*; 358: 1129-33.
- Rigby RJ, Knight SC, Kamm MA and Stagg AJ. 2005.** Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. *Clin. Exp. Immunol.*; 139(2): 245-256.

- Ritz S, Mordmüller B, Sakano S, Scheffold A. 2005.** Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur. J. Immunol.*; 35: 2443-2451.
- Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. 2001.** Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*, 65 suppl.: S43-S52.
- Roberfroid M. 2007.** Prebiotix: the concept revisited. *J. Nutr.*;137: 830S-837S.
- Roncarolo MG and Levings MK. 2000.** The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*; 12: 676-683.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A. 2003.** Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 111: 389-395.
- Ross R, Ross XL, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB. 1998.** The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.*; 160: 3776.
- Ross R, Jonuleit H, Bros M, Ross X-L, Yamashiro S, Matsumura F, Enk AH, Knop J, Reske-Kunz AB. 2000.** Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation. *J. Invest. Dermatol.*; 115: 658-663 .
- Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. 2000.** Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.*; 165: 4910-4916.
- Saavedra JM and Tschernia A. 2002.** Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*; 87, Suppl. 2: 241-246.
- Sabharwal H, Sjoblad S, Lundblad A. 1991.** Affinity chromatographic identification and quantification of blood group A-active oligosaccharides in human milk and faeces of breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 12: 474-9.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995.** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expression IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*; 155: 1151-1164.
- Sakaguchi S. 2000.** Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*; 101: 455-458.
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. 1998.** Demonstration of safety of probiotics - a review. *J. Food Microbiol.*; 44: 93-106.
- Sartor RB. 2004.** Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*; 126: 1620-33.

- Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K. 1992.** Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Journal of Immunological Methods*; 154: 253.
- Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. 1995.** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*;78: 491-7
- Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H, Radke M, Knol J, Böckler HM, Brönstrup A, Wells J, Fusch C. 2003.** Randomised double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partly hydrolysed protein, a high β -palmitic acid level and non-digestible oligosaccharides. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*; 36: 343-351.
- Scholtens P, Alles M, Linde van der E, Knol J. 2003.** Introduction of solid weaning foods with added prebiotic oligosaccharides affects the composition of the intestinal microflora. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 36: 566.
- Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. 2002.** Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Br. J. Nutr.*; 87 (Suppl 2): 179-186.
- Shevach EM. 2002.** CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*; 2: 389-400.
- Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkänen H, Vesikari T. 1997.** *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 24(4): 399-404.
- Siigur U, Ormiston A, Tamm A. 1993.** Faecal short-chain fatty acids in breast-fed and bottle-fed infants. *Acta Paediatrica*; 82: 536-538.
- Simon GL, Gorbach SL. 1984.** Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*; 86: 174-93.
- Smith DW, Nagler-Anderson C. 2005.** Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *The Journal of Immunology*; 174: 3841-3857.
- Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, Zaat BAJ, Yazdanbakhsh M, Wierenga EAA, van Kooyk Y and Kapsenberg ML. 2005.** Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 115: 1260-7.
- Spitalny GL and Havell EA. 1984.** Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.*; 159(5): 1560-5.
- Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. 2004.** Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 18, No 2: 255-270.

- Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. 1997.** Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.*; 159: 4772-4780.
- Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. 2002.** CD4⁺ and CD8⁺ anergic T cells induced by Interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*; 99: 2468-2476.
- Steinmann RM and Cohn ZA. 1973.** Identification of novel cell type in lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*; 137: 1142.
- Strachan DP. 1989.** Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*; 299: 1259-1260.
- Suciu-Foca N, Manavalan JS, Scotto L, Kim-Schulze S, Galluzzo S, Naiyer AJ, Fan J, Vlad G, Cortesini R. 2005.** Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int. Immunopharmacol.*; 5: 7-11.
- Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. 1996.** Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4-production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus GG*-derived enzymes. *Scand J. Immunol.*; 43: 687-689.
- Szajewska H and Mrukowicz JZ. 2001.** Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 33 (Suppl 2): S17-25.
- Szajewska H, Ruszcynski M, Radzikowski A. 2006.** Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.*; 149: 367-372.
- Takagi A, Ikemura H, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T. 2008.** Relationship between the in vitro response of dendritic cells to *Lactobacillus* and prevention of tumorigenesis in the mouse. *J. Gastroenterol.*; 43: 661-669.
- Tannock GW. 1983.** The effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In: Hentges DJ (ed.). *Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Academic Press, New York*: 517-539.
- Tissier H. 1900.** Recherches sur la flore intestinale des nourissons. *Paris: G. Calle et C. Naud*, 1900.
- Unger S. 1999.** Die Bedeutung von Pro- und Präbiotika in der Ernährung. *J. Ernährungsmed.*; 1: 22-29.
- Unkeless JC. 1979.** Characterization of a monoclonal antibody directed specifically against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.*; 150: 580.
- Van den Heuvel EG, Muys T, van Dokkum W, Schaafsma G. 1999.** Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.*; 69: 544-8.
- Vandenplas Y. 2002.** Oligosaccharides in infant formula. *British Journal of Nutrition*; 87, Suppl. 2: S293-S296.

- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV and Young RJ. 1999.** *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *Journal of Paediatrics*; 135: 564-568.
- Van Hoffen E, Ruiter B, Faber J, M'Rabet L, Knol EF, Stahl B, Arslanoglu S, Moro G, Boehm G, Garssen J. 2009.** A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy*; 64 (3): 484-487.
- Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M. 1999.** Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project. *BJN*; 81: 121-32.
- Van Montfrans C, Hooijberg E, Rodriguez Pena MS, De Jong EC, Spits H, Te Velde AA, Van Deventer SJ. 2002.** Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo interleukin 10 gene transfer. *Gastroenterology*; 123: 1877-1888.
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. 2002.** Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*; 109: 678-684.
- Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie P, Rubira M, Simpson R. 1986.** Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Immunology*; 83: 9679-9683
- Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S and Julkunen I. 2004.** *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J.Leukoc. Biol.*; 75: 764-771.
- Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. 2005.** Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*; 60(4): 494-500.
- Villadangos JA, Schnorrer P. 2007.** Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.*; 7: 543-555.
- Vliagoftis H, Kouranos VD, Betsi GI, Falagas ME. 2008.** Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*; 101 (6): 570-9.
- Von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. 2000.** Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy*; 30: 1230-4.
- Vos AP, Haarman M, Buco A, Govers M, Knol J, Garssen J, Stahl B, Boehm G, M'Rabet L. 2006.** A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model. *Int. Immunopharmacol.*; 6: 1277-1286.
- Vos AP, Haarman M, van Ginkel J-WH, Knol J, Garssen J, Stahl B, Boehm G, M'Rabet L. 2007a.** Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatr. Allergy Immunol.*; 18: 304-312.

- Vos AP, van Esch BC, Stahl B, M'Rabet L, Folkerts G, Nijkamp FP, Garssen J. 2007b.** Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *Int. Immunopharmacol.*; 7: 1582-1587.
- Wada J, Ando T, Kiyohara M, Ashida H, Kitaoka M, Yamaguchi M, Kumagai H, Katayama T, Yamamoto K. 2008.** *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.*; 74(13): 3996-4004.
- Warncke M, Doderer A, Dierbach H, Follo M, Veelken H. 2006.** Murine dendritic cells generated under serum-free conditions have a mature phenotype and efficiently induce primary immune responses. *J. Immunol Methods*; 310: 1-11.
- Warner JA, Jones CA, Jones AC and Warner JO. 2000.** Prenatal origins of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 105: S493-6.
- Weaver LT, Gail E, Taylor LC. 1988.** The bowel habit of milk-fed infants. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.*; 7: 568-71.
- Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA. 1994.** Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.*; 12: 809-837.
- Weiner HL. 2001.** Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.*; 3: 947-954.
- Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R. 2002.** Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*; 296: 490-494.
- Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. 1983.** Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*; 72: 317-321.
- Young J. 1998.** European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition*; 80, Suppl., 231-233.
- Zal T, Volkmann A, Stockinger B. 1994.** Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med.*;180(6): 2089-99.
- Zeuthen LH, Christensen HR and Frøkiær H. 2006.** Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clinical Vaccine Immunology*; 13(3): 365-375.
- Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou E. 2008.** *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and salmonella infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology*; 121: 18-26.

D Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
³HTdR	Tritium-markiertes Thymidin
Abb.	Abbildung
AOS	„ <i>acid oligosaccharides</i> “, saure Oligosaccharide
APC	„ <i>antigen presenting cells</i> “, Antigenpräsentierende Zellen
BFA	Brefeldin A
BM-DC	„ <i>bone-marrow derived dendritic cell</i> “, Knochenmark-abgeleitete DCs
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	„ <i>Cluster of differentiation</i> “
cDNA	„ <i>copy DNA</i> “, komplementäre DNA
CFSE	„ <i>carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester</i> “
cfu	„ <i>colony forming units</i> “, Kolonie-bildende Einheiten
Cl	Chlorid
ConA	Concanavalin A
cpm	„ <i>counts per minute</i> “
CTLA	„ <i>Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen</i> “
d	„ <i>day</i> “, Tag
DC	„ <i>dendritic cell</i> “, Dendritische Zelle
DC-SIGN	„ <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i> “
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DII	„ <i>Delta-like</i> “
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleosidphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> “, Enzymgekoppelter Immunadsorptions-Test
EMEM	„ <i>Eagle´s minimum essential medium</i> “
FACS	„ <i>fluorescence activated cell sorter</i> “, fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	„ <i>fetal calf serum</i> “, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	„ <i>Forkhead Box P3</i> “
FSC	„ <i>foreward scatter</i> “, Vorwärtsstreuung
g	Gramm
GALT	„ <i>gut-associated-lymphoid-tissue</i> “, darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GITR	Glucocorticoid-induzierter Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GOS/FOS	Galacto-Oligosaccharide/Fructo-Oligosaccharide
Gy	Gray
HMOS	„ <i>Human Milk Oligosaccharides</i> “, Humane Milch-Oligosaccharide
iDC	immature dendritische Zellen
IDO	Indolamine-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
icF	intrazelluläre FACS-Färbung
IL	Interleukin
ILT	„ <i>immunoglobulin-like transcript</i> “
IMDM	„ <i>Iscoe´s Modified Dulbecco´s Medium</i> “
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
K	Kalium
l	Liter
lc	„ <i>long-chain</i> “, langkettig
LF	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LNC	„ <i>Lymph node cells</i> “, Lymphknoten Zellen

LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	„ <i>microfold</i> “, Mikrofalten
MACS	„ <i>magnetic cell sorter</i> “, Magnetische Zellseparation
MAP	Mitogenaktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MDB	„ <i>Membrane Desalting Buffer</i> “
MFI	„ <i>mean fluorescence intensity</i> “, durchschnittliche Fluoreszenzintensität
Mg	Magnesium
MHC	„ <i>major histocompatibility complex</i> “, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	„ <i>Mixed lymphocyte reaction</i> “, Gemischte Lymphozytenkultur
mRNA	„ <i>messenger</i> “-RNA
mu	murin
Na	Natrium
NaPyr	Natriumpyruvat
NOS	Mischung Neutraler Humanmilch-analoger Oligosaccharide
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
Ø	Durchmesser
OPD	o-Phenylendiamin
OVA	Ovalbumin
p	Pektin
PAMP	„ <i>pathogen-associated molecular pattern</i> “
PBMC	„ <i>peripheral blood mononuclear cells</i> “
PBS	„ <i>Phosphate buffered saline</i> “
PCR	„ <i>Polymerase chain reaction</i> “, Polymerase-Kettenreaktion
PD-L	„ <i>programmed death ligand</i> “
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR	„ <i>pattern-recognition receptor</i> “
QPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

rh	rekombinantes humanes
rm	rekombinantes murines
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	„ <i>soluble</i> “, löslich
sc	„ <i>short-chain</i> “, kurzkettig
SC	„ <i>spleen cells</i> “, Milzzellen
SCFA	„ <i>short chain fatty acids</i> “, kurzkettige Fettsäuren
scGOS/lcFOS	kurzkettige Galacto-Oligosaccharide/langkettige Fructo-Oligosaccharide
SD	„ <i>standard deviation</i> “, Standardabweichung
sek	Sekunde
SSC	„ <i>sideward scatter</i> “, Seitwärtsstreuung
T_{act}	aktivierte T-Zelle
TCR	„ <i>T cell receptor</i> “, T-Zell-Rezeptor
TGF	„ <i>Transforming growth factor</i> “
T_H	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
T_{naive}	naive T-Zelle
TNF	„ <i>Tumor necrosis Factor</i> “
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Unit
UBC	Ubiquitin C
UV	ultraviolett