

Aus der Abteilung Prothetik
(Komm. Leiter: PD Dr. med. dent. N. Gersdorff)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Immunmodulierende Wirkung der probiotischen Bakterien
Lactobacillus salivarius und Lactobacillus rhamnosus GG
auf orale Keratinozyten in Bezug auf das humane Beta-Defensin-2

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Antonia Hellmann
aus Berlin

Göttingen 2013

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichtstatter/in:

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
1.1.	Mundschleimhaut	1
1.1.1.	Übersicht	1
1.1.2.	Keratinocyten	2
1.1.2.1.	OKF6/hTERT-2 Zellen	5
1.2.	Bakterien	6
1.2.1.	Prokaryoten	6
1.2.2.	Probiotika	7
1.2.3.	Laktobazillen	8
1.2.4.	Bakterienextrakte	9
1.3.	Immunreaktion	11
1.3.1.	Überblick	11
1.3.2.	Defensine	13
1.3.2.1.	humanes Beta-Defensin-2 (hBD-2)	14
1.3.3.	Wirkung von Probiotika auf das Immunsystem	14
1.4.	Aufgabenstellung/Ziel	16
2	Material und Methoden	17
2.1.	Zellkultur	17
2.1.1.	Überblick über die Kulturbedingungen von OKF6/hTERT-2 Zellen	17
2.1.2.	Auftauen der Zellen	18

2.1.3.	Kultivierung	19
2.1.4.	Passagieren	20
2.1.5.	Einfrieren	21
2.2.	Aussähen der Zellen und Stimulation	21
2.2.1.	Bakterienextrakte aufbereiten	24
2.3.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
2.3.1.	Methode	24
2.3.2.	ELISA-Durchführung	26
3	ELISA-Ergebnisse	30
4	Diskussion	42
4.1.	Methodik	45
4.2.	Ergebnisse	49
4.3.	Schlussfolgerung	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	59
7	Abbildungsverzeichnis	68
8	Tabellenverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
Avidin-HRP	Avidin Horse Rabbish Peroxidase
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celcius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cm ²	Quadratzentimeter
DMEM/Ham`s-F12	Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit Ham`s-F12 Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
h	Stunden
hBD-2	Humanes Beta-Defensin-2, humanes β -Defensin-2
H ₂ O	Wasser
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
LPS	Lipopolysaccharide
L. rhamnosus GG / L.gg	Laktobazillus rhamnosus GG
L. salivarius / L.s.	Laktobazillus salivarius
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Pikogramm
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Std.	Stunden
s.u.	siehe unten
T25, T75	25- oder 75-cm ² -Kulturflaschen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U/ml	Umdrehungen pro Milliliter

UpM
u.s.w.
vgl.
z.B.:

Umdrehungen pro Minute
und so weiter
vergleiche
zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. Mundschleimhaut

1.1.1 Übersicht

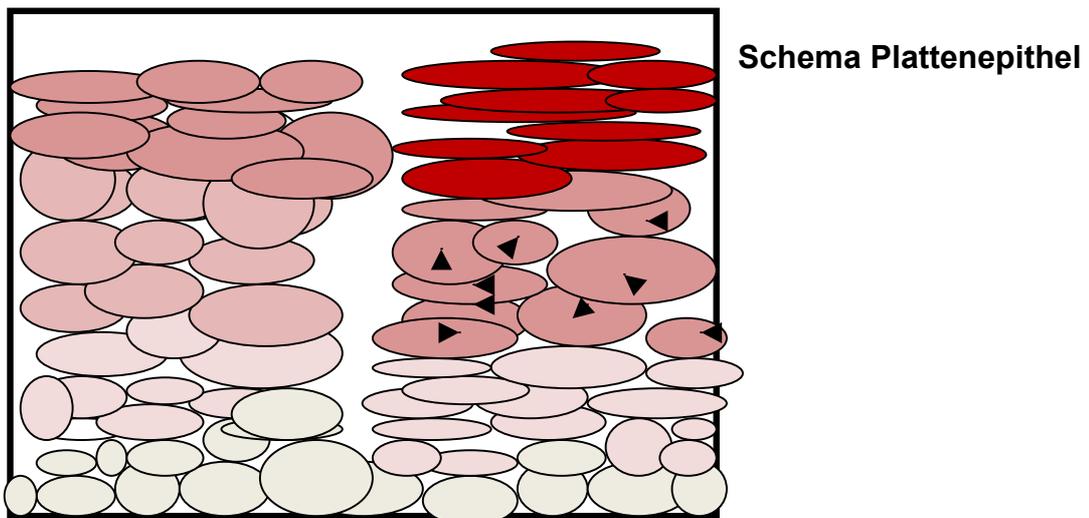
So wie der menschliche Körper außen durch die Haut geschützt ist, sind innere Hohlräume und Organe mit einer Schleimhaut ausgekleidet. Der Verdauungstrakt, der sich von der Mundhöhle über den Ösophagus und den Magen-Darm-Trakt bis zum After zieht, ist von einer solchen Schleimhaut überzogen. Diese Schleimhaut ist histologisch verschieden, je nachdem welcher Funktion sie in welchem Organ nachgehen muss. Im Allgemeinen handelt es sich stets um eine Schleimhaut, die jedoch regional ganz unterschiedlich ausgebildet ist.

Die Mundhöhle ist mit mehrschichtigem Plattenepithel, welches keratinisiert oder nicht-keratinisiert vorkommt, ausgekleidet. Ist die Region einer stärkeren mechanischen Belastung ausgesetzt, verhornen die Zellen an diesen Stellen, ohne starke Belastung bleibt das Epithel unverhornt. Außer den Keratinozyten, den typischen Plattenepithelzellen, sind im Epithel noch weitere Zelltypen, wie Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen, Melanozyten und Lymphozyten zu finden (Schroeder 1992). Darunter befindet sich eine Bindegewebsschicht, die Lamina propria, in der neben den Bestandteilen des Bindegewebes vor allem Abwehrzellen (Makrophagen und Lymphozyten) aufzufinden sind. Unter der Lamina propria findet sich zum Teil noch eine Submukosa, eine bindegewebige Schicht, die viele kleine Speicheldrüsen aufweist. Durch Drüsensekrete wird das Epithel ständig feucht gehalten. Beim unverhornten Plattenepithel befinden sich häufig mehr als 20 Zelllagen im Epithel, die in vier Schichten, je nach Reifegrad der Zellen, unterteilt werden können: an die Basalmembran grenzend das Stratum basale, darauf folgend das Stratum parabasale, das Stratum intermedium und das Stratum

Einleitung

superficiale. Beim verhornten Plattenepithel sind die Schichten folgendermaßen eingeteilt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Letzteres enthält die verhornten Keratinozyten. Allgemein werden die typischen Zellen der Epithelien als Keratinozyten bezeichnet (Lüllmann-Rauch 2006).

Graphik 1.1.1.



Hier sind schematisch die Schichten des Plattenepithels dargestellt. Links ist das unkeratinisierte und rechts das keratinisierte Plattenepithel zu sehen. Alle Zellen, außer den keratinisierten Zellen im keratinisierten Plattenepithel (rot), besitzen Zellkerne. Im Stratum granulosum des keratinisierten Epithels sind die Kerne der Zellen jedoch besonders deutlich im Mikroskop zu sehen (schwarze Dreiecke).

1.1.2. Keratinozyten

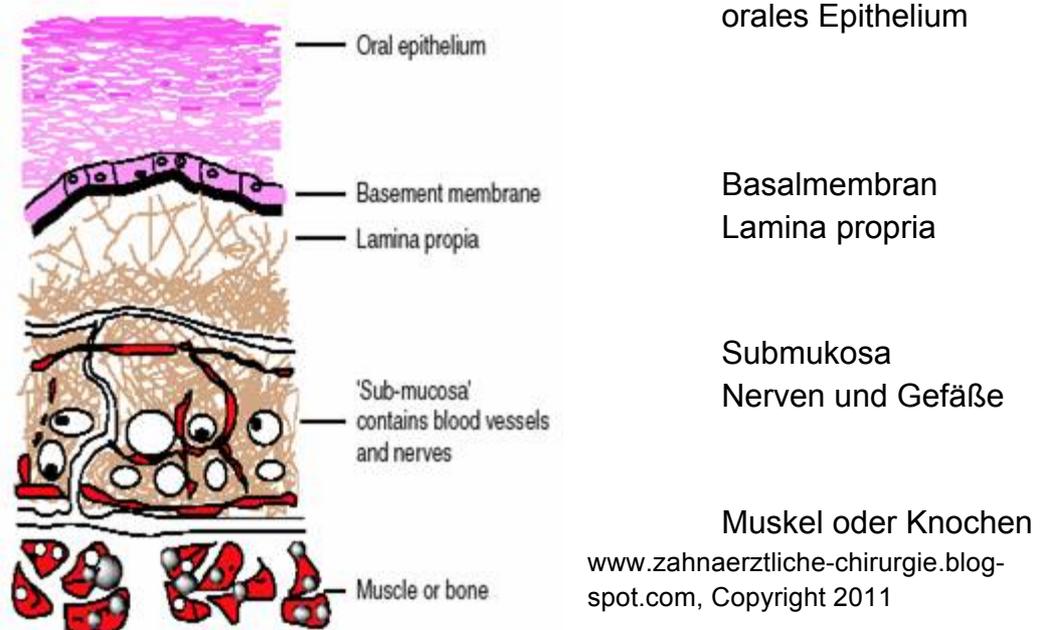
Die Keratinozyten beginnen in der untersten Schicht des Epithels, dem Stratum basale, sich zu differenzieren und durchlaufen somit die anderen

Einleitung

Schichten, bis sie als Endprodukt ihrer Differenzierung als Hornzellen beim verhornten Epithel im Stratum corneum zu liegen kommen. Sie produzieren fortwährend Keratin und lagern dieses ein. Keratin ist ein großes Protein, das sich aus vielen Filaggrin-Monomeren zusammensetzt. Die Hornzellen sind mit dem Keratin fast vollständig ausgefüllt und sollen so in der Hornschicht nämlich eine mechanische und chemische Abdeckung bilden und zusammen mit anderen Barrierefunktionen eine fast wasserdichte Diffusionsbarriere herstellen. Einen Kern und die meisten Organellen besitzen die Zellen in dieser Schicht nicht mehr. Bei der Zell-Lage im Stratum basale handelt es sich um eine kleine Schicht epidermaler Stammzellen, die sich differenzieren und somit ständigen Nachschub liefern können. Die Hornzellen ganz außen werden nämlich nach und nach abgeschilfert (Desquamation). In den übrigen Zellschichten sind nur mikroskopisch Unterschiede im Reifungsgrad der Zellen zu erkennen. Im unverhornten Plattenepithel bilden die Zellen kein Keratin, differenzieren sich jedoch auch in jedem Stratum und schilfern schließlich in der äußersten Lage ab (Lüllmann-Rauch 2006).

Graphik 1.1.2.

Schema Mundschleimhaut



Einleitung

Der Epithelzellumsatz ist sehr hoch, das Epithel erneuert sich ständig. Als Anhaltswert hierfür kann ein Epithelumsatz beim Affen von 8 bis 10 Tagen genommen werden (Schroeder 1992). Somit können alte und bakterienbesetzte Zellen durch Abschilferung und Abtransport beseitigt werden und eine gute Infektionsabwehr scheint in diesem Bereich gewährleistet (Plagmann 1998). Das Besondere am Epithel der Gingiva in der Mundhöhle ist, dass es hier mehrschichtiges Plattenepithel gibt, welches sowohl keratinisierte als auch nicht-keratinisierte Teile aufweist und damit parakeratinisiert ist. Parakeratinisiertem Epithel fehlt ein deutliches Stratum granulosum und in der obersten Schicht weisen die Zellen noch Kernreste auf, sind aber ansonsten den Hornzellen sehr ähnlich (Lüllmann-Rauch 2006).

Graphik 1.1.2.1.

Bild von abgeschilferten Mundschleimhautzellen unter einem Lichtmikroskop



Quelle Abbildung: Landesbildungsserver Baden-Württemberg 2013

Normale humane Keratinozyten unterliegen ihrem Lebenszyklus, wie fast alle somatischen Zellen, durch den Vorgang des Alterns und gehen durch den Vorgang der Apoptose zu Grunde, wenn sich ihre Telomere an den Chromosomen soweit verkürzt haben, dass sie nicht mehr repliziert werden können (Karp 2005). Damit man mit Zellen in Kultur arbeiten kann, hat man sich zu Nutze gemacht, Zellen dahingehend zu verändern, dass sie sich

Einleitung

ungehindert immer weiter teilen und vermehren. Diese Zellen sind immortalisiert. Das Prinzip beruht darauf, die Zellen zu Tumorzellen zu machen. Veränderungen in bestimmten Genen sind für die Bildung von Tumorzellen verantwortlich: Mutationen in Proto-Oncogenen und/oder Tumorsuppressor-Genen. Letztere wirken normalerweise bremsend auf das Zellwachstum und verhindern das ungehinderte Teilen. Proto-Oncogene lassen Proteine entstehen, die normales Zellwachstum gewährleisten. Tritt eine Mutation in diesen Genen auf, entstehen zum Beispiel Oncogene und veränderte Tumorsuppressor-Gene und daraus resultiert ein Verlust der Wachstumskontrolle der Zellen (Karp 2005).

1.1.2.1. OKF6/hTERT-2 Zellen

Die Zelllinie der oralen Keratinozyten OKF6/hTERT-2 wurde im Rheinwald Laboratory des Brigham and Women`s Hospital der Harvard Medical School im Harvard Skin Disease Research Center, Boston, Massachusetts, USA, hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden speziell immortalisiert, das heißt sie können sich ohne Alterung und Absterben unentwegt teilen. So kann man die Zellen kultivieren und mit ihnen arbeiten. Die Zellen exprimieren, nach Transfektion, eine katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT und produzieren deshalb weniger von einem Protein des Zellzyklus- Kontrollmechanismus, nämlich pRB/p16^{INK4a}; dadurch sind sie immortalisiert (Dickson et al. 2000). Die Telomerase ist ein Enzym, eine Reverse Transkriptase, welches stetig dafür sorgt, dass sich die Telomere an den Chromosomenenden nicht verkürzen. Die Telomerase verlängert die Telomerabschnitte der Chromosomen und gewährleistet so, dass diese immer wieder komplett während der Replikation abgelesen werden. Telomerasen besitzen normalerweise nur Keimzellen und eben Tumorzellen im menschlichen Körper. Alle anderen Zellen gehen nach einer bestimmten Anzahl an Teilungen durch Verlust ihrer Telomere zu Grunde

Einleitung

(Harley et al. 1990). pRB/p16^{INK4a} sind Proteine, die von den Tumorsuppressor-Genen RB und CDKN2A codiert werden (Stone et al. 1995, Nobori et al. 1994). Sie spielen eine Rolle in der Regulierung des Zellzyklus und verhindern das unentwegte Teilen und Replizieren der Zellen. Sind diese Gene mutiert, gehen die Zellen ohne Hinderung immer wieder in die S-Phase des Zellzyklus über. Die S-Phase ist die Synthesephase, in welcher die Replikation und Chromosomenverdoppelung stattfindet, so dass die Zellen in die weiteren Phasen des Zellzyklus eintreten und die Mitose, also die komplette Zellteilung, durchführen können. Die Zellen teilen sich unbegrenzt, sie haben dann Tumoreigenschaften (Karp 2005).

1.2. Bakterien

1.2.1 Prokaryoten

Bakterien gehören neben der Gruppe der Archaea zu den Prokaryoten, den Einzellern, die keinen Kern um ihre DNA besitzen und sich in vielerlei Hinsicht von eukaryotischen Zellen unterscheiden. Sie sind strukturell einfacher gebaut und phylogenetisch gesehen wahrscheinlich viel älter, als komplexere, eukaryotische Lebewesen, welche erst aus der Endosymbiontentheorie heraus entstanden. Abgesehen von der Organismusgruppe der Archaea sind alle übrigen Prokaryoten Bakterien (Karp 2005). Diese findet man überall und in jedem Lebensraum und natürlich zu großer Anzahl auch am und im menschlichen Körper. Gerade im menschlichen Verdauungstrakt sind etliche Bakterienspezies angesiedelt und spielen eine große Rolle für die Gesundheit, aber auch bei Erkrankungen (Zoetendal et al. 2006).

1.2.2 Probiotika

Probiotika sind bestimmte Mikroorganismen, die zur natürlichen Flora des Menschen gehören und für die Gesundheit und das mikrobielle Gleichgewicht im menschlichen Verdauungstrakt sogar von Nutzen sind (Salminen et al. 1998, Yli-Knuutila et al. 2006). Bei den meisten Probiotika handelt es sich um Milchsäurebakterien wie Laktobazillen oder Bifidobakterien (Salminen et al. 1998). Andere Spezies sind *Escherichia coli* oder Hefespezies wie zum Beispiel *Saccharomyces boulardii*. Eine große Anzahl an probiotischen Mikroorganismen wird heutzutage in Nahrungsmitteln, wie Milchprodukten oder sogar in Form von Nahrungsergänzungsmitteln, zusammen mit Präbiotika beigefügt um einen medizinischen Nutzen daraus zu gewinnen. Dies sind dann Symbiotika, also Prä- und Probiotika zusammen. Präbiotika sind bestimmte Spezies bzw. Substanzen, die im oberen Intestinaltrakt vorkommen und dafür sorgen, dass ein bestimmtes Mikromilieu aufrecht erhalten wird, also im Grunde genommen das Wachstum von Probiotika fördern (Ölschläger und Hacker 2009). Beide zusammen sollen also durch den Verzehr zu einer erhöhten Konzentration im menschlichen Körper führen und so ihre günstigen Eigenschaften in Bezug auf das Immunsystem steigern.

Allgemein betrachtet sind Milchsäurebakterien gram-positive, kokken- und stäbchenförmige Bakterien, die nicht beweglich sind. Sie produzieren Milchsäure, sind Katalase-negativ und bilden keine Endsporen aus (Klein et al. 1998, Stiles und Holzapfel 1997).

Milchsäurebakterien kommen in den unterschiedlichsten Bereichen unserer Umwelt vor: in Pflanzen, tierischen Produkten und in der physiologischen Mikroflora der Schleimhäute von Mensch und Tier (Kneifel und Domig 2009, Stiles und Holzapfel 1997). Zu den bekanntesten Effekten dieser Bakterien gehören unter anderem die Prävention und Reduzierung von viral oder

Einleitung

medikamentös induzierten Durchfällen, positive Effekte auf die entzündlich bedingten Darmerkrankungen (CED), Linderung von atopischen Erkrankungen und einige weitere (De Vrese und Schrezenmeir 2008). Eine erste Kolonisation im Verdauungstrakt mit probiotischen Bakterien findet beim Neugeborenen statt (Mackie et al. 1999). Nicht für alle präventiven und therapeutischen Wirkungen von Probiotika ist es notwendig, dass diese lebend verabreicht werden müssen. Auch abgetötete Probiotika oder bestimmte Moleküle von diesen können die gewünschten Effekte erzielen, wenn sie in ausreichender Konzentration verabreicht werden und genügend lange auf die Zielzellen wirken können (Dotan und Rachmilewitz 2005, Petrof et al. 2004). Der probiotische Stamm *Lactobacillus rhamnosus* GG zum Beispiel rief Immuneffekte durch lösliche Faktoren und Zellwandkomponenten wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren hervor (Iliev et al. 2005).

Allgemein kann man noch nicht sagen, wie genau welche Bakterienspezies ihren gesundheitlichen Nutzen im menschlichen Körper erzielen. Die probiotischen Mikroorganismen haben ganz unterschiedliche Eigenschaften. Vor allem im gesunden Körper sind ihre Effekte schwer zu erkennen und schwer nachzuweisen. Einfacher war ihre Wirkung bei normalerweise Gesunden in Bezug auf Infektionen im Verdauungstrakt nachzuweisen (Ölschläger und Hacker 2009). Allerdings muss neben den positiven Effekten auch erwähnt werden, dass Milchsäurebakterien auch nachteilige Auswirkungen haben können, indem sie auch als Krankheitserreger bei Menschen und Tieren wirken können (Karies, Sepsis, u.a.) (Kneifel und Domig 2009).

1.2.3 Laktobazillen

Laktobazillen bilden eine bestimmte Gattung der Milchsäurebakterien, die wiederum in 80 Arten und 15 Unterarten aufgeteilt werden können (Hammes

Einleitung

2006) oder sogar in noch weitere (Euzeby 1997, Felis und Dellaglio 2007). Laktobazillen kommen in sehr vielen Lebensräumen vor: in Pflanzen, Lebensmitteln, im menschlichen Körper und in Abwasserprodukten. Ihre Produktion von Milchsäure führt zu einer Senkung des pH-Wertes, was wiederum das Wachstum anderer Bakterien verhindert. Die anderen, für die Gesundheit positiven Eigenschaften der Laktobazillen stehen jedoch heute weitaus mehr im Vordergrund (Kneifel und Domig 2009). Hierbei geht es vor allem darum, dass sie das körpereigene Immunsystem aktivieren und somit helfen, gegen pathogene Keime zu kämpfen. Zu den Laktobazillen gehören zum Beispiel die beiden Stämme dieser Arbeit: *L. salivarius*, dessen Lebensraum das Intestinum darstellt und der Stamm *L. rhamnosus* GG, dessen Lebensraum vor allem fermentierte Lebensmittel sind (Heller 2009).

1.2.4. Bakterienextrakte

Bestimmte Moleküle, die Bestandteil der Bakterien sind, lösen auch die angeborene Immunreaktion aus. Diese Moleküle werden PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) genannt (Bianchi 2007). Sie werden von Zellen des befallenen Wirtes mittels Rezeptoren erkannt, PRRs (pattern recognition receptors), und daraufhin reagiert der Körper mittels Immunantwort. Zu den PAMPs gehören Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS), welche als die potentesten Stimuli für die Immunzellen gelten. Endotoxine sind in der Membran der Bakterien verankert und ragen an der Oberfläche der Zellen heraus. Auch viele der antimikrobiellen Peptide, vor allem die Defensine, wirken speziell gegen LPS. Die Endotoxine werden von den Defensinen komplexiert und sind dadurch in der Bakterienmembran desintegriert, was dazu führt, dass die Bakterien absterben („Shai-Matsuzaki-Huang-Modell“). Weitere Moleküle, die zu den PAMPs gehören, sind Lipoproteine (auch in der Bakterienmembran), Peptidoglycane

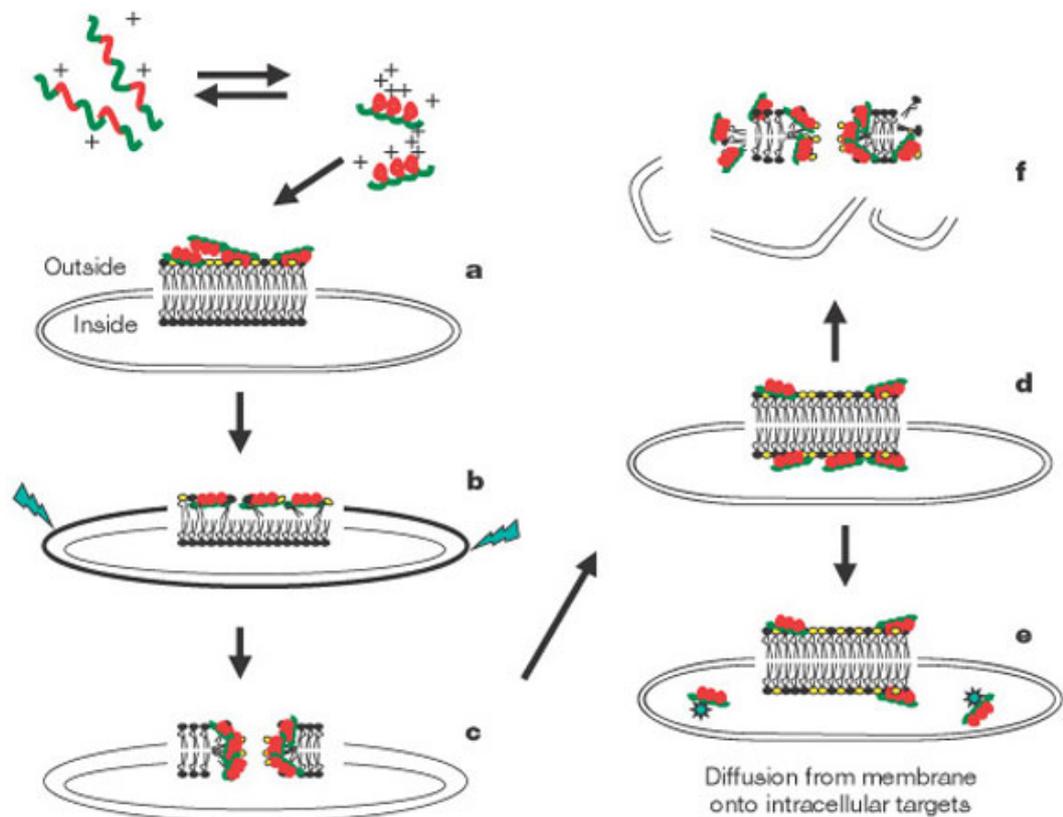
Einleitung

(Bestandteile der Bakterienzellwand), Lipoteichonsäure (ebenfalls in der Membran verankert) und andere (Parlesak 2009).

Die folgende Seite zeigt das Prinzip der Wirkung von Defensinen.

Graphik 1.2.:

Das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell über den Mechanismus der Wirkung eines antimikrobiellen Peptides



(Zaslouff 2002, Abbildung 3)

Dargestellt ist ein alpha-helikales Peptid. **a)** Der äußere Teil der Doppelmembran wird durch Peptide verkleidet. **b)** Integration der Peptide in

Einleitung

die Membran, wodurch der äußere Teil der Membran ausgedünnt wird. Die Oberfläche des äußeren Teils expandiert in Relation zu der des inneren Teils, was zu einer Spannung, Belastung der Doppelmembran führt (gezackte Pfeile). **c)** Nahtloser Übergang in eine Poren-Form. In diesem Stadium formen sich übergangsweise Poren. **d)** In den inneren Teil der Membran werden Lipide und Peptide transportiert. **e)** Die Peptide diffundieren an intrazelluläre Zielobjekte (in einigen Fällen). **f)** Die Membran kollabiert, zerfällt in Fragmente und ist äußerlich zerstört. Es kommt zu einer Zerstörung der Zellmembran.

Lipide mit "weißen Kopfgruppen" sind sauer, negativ geladen. Lipide mit „schwarzen Kopfgruppen“ sind neutral (Zaslouff 2002).

1.3. Immunreaktion

1.3.1. Überblick

Dringen Bakterien, Viren oder Parasiten durch die äußeren Barrieren des Körpers ein, reagiert dieser mit einer Immunreaktion, um die betreffenden Organismen zu bekämpfen. Das Immunsystem kann in zwei Kategorien eingeteilt werden: das angeborene Immunsystem und das erworbene (adaptive) Immunsystem (Hoffmann et al. 1999).

Beide Systeme können im Normalfall körpereigene von körperfremden Substanzen unterscheiden und bekämpfen nur solche, die körperfremd sind (Hörner et al. 2004).

Das angeborene Immunsystem bildet die erste, sofortige Antwort auf diese pathogenen Reize, ist phylogenetisch älter und ist somit eher unspezifisch gegen alles Fremdmaterial gerichtet (Hörner et al. 2004).

Einleitung

Typische Zellen sind hier die Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, die mit Hilfe von Zytokinen und anderen Bausteinen des Immunsystems die Immunreaktion kontrollieren können (Aderem und Underhill 1999).

Makrophagen können Fremdmaterial durch zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren, die auf ihrer Zelloberfläche vorkommen, erkennen und phagozytieren. Toll-like-Rezeptoren können beispielsweise Lipopolysaccharide- oder Peptidoglykanbausteine der Bakterienzellwände erkennen (Wehkamp et al. 2007). Begleitet werden die Vorgänge der Immunantwort meist durch eine lokale Entzündungsreaktion (Karp 2005). Hier sind die fünf klassischen Kardinalsymptome der Entzündung ausschlaggebend: Rötung, Schwellung, Schmerzen, Erwärmung und Funktionsverlust. Am Entzündungsort sind viele Mediatoren, welche Granulozyten und Monozyten zum Beispiel anziehen (Hörner et al. 2004). Neutrophile Granulozyten zum Beispiel, welche die Mehrheit der zirkulierenden Granulozyten darstellen, sind für die Aktivierung von proinflammatorischen Mediatoren und andere Aufgaben zuständig (Bicknell et al. 1994, Dransfield et al. 1995). Monozyten werden am Ort des Geschehens zu Makrophagen und können Zytokine, antibakterielle Proteine und Radikale produzieren und sezernieren (Thepen et al. 1994). Außerdem können sie neben anderen dendritischen Zellen Antigene präsentieren, damit T-Zellen und die erworbene Immunantwort aktivieren (Hörner et al. 2004). Das erworbene Immunsystem besteht aus B- und T-Zellen und besitzt die Fähigkeit, hochspezifisch Antigene zu erkennen, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden und das Zerstören von erkannten Pathogenen einzuleiten; hier spielen Immunglobuline eine große Rolle (Tonegawa 1983, Tonegawa 1988).

1.3.2. Defensine

Das angeborene Immunsystem bildet, wie oben bereits erwähnt, auch die epithelialen Barrieren aus, um eine Invasion an Pathogenen zu verhindern. Zu den größten Barrieren zwischen äußerer Umwelt und dem Körperinneren gehören die äußere Haut, der gesamte Verdauungstrakt und der Respirationstrakt. In den Epithelien kommen dann auch spezifische Abwehrzellen vor, wie die Langerhans-Zellen der Epidermis, Neutrophile Granulozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und im Plasma vorkommende Proteine, die der Abwehr dienen. Zu diesen Proteinen zählt auch eine Reihe an Zytokinen. Dies sind bestimmte Signalproteine, die sezerniert werden und interzellulär wirken. Sie sind unter anderem zum Beispiel für die Aktivierung von Phagozyten und für die Entstehung der Entzündungsreaktion am Wirkungsort verantwortlich. Mikroorganismen, die in den Körper eindringen, werden meist rasch auch von anderen im Plasma vorkommenden Proteinen bekämpft. Zu diesen gehören Komponenten des Komplementsystems, aber auch solche Proteine, die direkt mikrobielle Strukturen erkennen können. Sowohl die epithelialen Zellen (Keratinocyten) als auch einige Leukozyten können bestimmte Proteine produzieren, welche antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Zu diesen gehören die Defensine. Hierbei handelt es sich um kleine, cysteinreiche, kationische Peptide, die nur ungefähr 29 bis 34 Aminosäuren lang sind und drei Disulfidbrücken enthalten. Sie wirken wie körpereigene Breitspektrum-Antibiotika. Unterschieden werden drei Untergruppen nach der Lokalisation ihrer Disulfidbrücken: alpha-, beta- und theta-Defensine. Die Defensine werden vor allem von den Keratinocyten in Schleimhäuten, von neutrophilen Granulozyten und von NK-Zellen gebildet (Abbas et al. 2007).

Einleitung

1.3.2.1. humanes β -Defensin 2 (hBD-2)

Die humanen β -Defensine werden von den Schleimhautzellen, aber auch von Zellen der Speicheldrüsen gebildet (Bonass et al. 1999, Mathews et al. 1999, Paster et al. 2001). Während hBD-1 kontinuierlich gebildet wird, induzieren die hBD-2 Bildung vor allem Bakterienextrakte (Lipopolysaccharide), Interleukin-1 und der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (Harder et al. 2000, Harder und Schroder 2002, O'Neil et al. 1999). Die Expression von hBD-2 stieg stark an, wenn man die Zellen mit pathogenen Bakterienspezies, welche zum Beispiel in Biofilmen der Gingiva vorkommen können, versetzte (Eberhard et al. 2009). In der oralen Schleimhaut wird hBD-2 im Vergleich zu anderen Schleimhäuten, in welchen nur bei Entzündungsprozessen hBD-2 gebildet wird, auch im gesunden, nicht-entzündeten Epithel exprimiert (Dale et al. 2001, Dommisch et al. 2005). Das hBD-2 wurde erstmals aus an Psoriasis erkrankter Haut isoliert und die starken antimykotischen Effekte und solche gegen gram-negative Bakterien festgestellt. Die Effekte gegen gram-positive Bakterien waren eher niedrig. Es handelt sich hierbei um ein cysteinreiches, 41 Aminosäuren langes, antimikrobielles Peptid (Harder et al. 1997).

Das erste β -Defensin, hBD-1, wurde 1995 entdeckt und kommt hauptsächlich im Epithel des Urogenitaltraktes, des Respirationstraktes und im Plasma vor. Die Entdeckung von hBD-2 folgte dann zwei Jahre später (Bensch et al. 1995, Harder et al. 1997).

1.3.3. Wirkung von Probiotika auf das Immunsystem

Die Wirkmechanismen der Probiotika sind vielfältig und noch nicht bis ins Detail verstanden. Ein Prinzip beruht darauf, dass sie direkt auf andere Mikroorganismen wirken, ein weiteres auf der immunmodulierenden Wirkung des Wirtes und damit zum Beispiel auch auf der Induktion von antimikrobiellen Substanzen des Wirtes. Ein drittes Prinzip beruht auf

Einleitung

metabolischen Effekten, wie zum Beispiel der Änderung des pH-Wertes (Parvez et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass einige probiotische Bakterienstämme die Expression von Defensinen in humanen Epithelzellen induzieren, wie zum Beispiel das humane β -Defensin-2 durch ein Flagellenprotein von *E. coli* Nissle 1917 (Schlee et al. 2007). Gerade bei dem Erhalt der Remission bei Patienten mit Colitis ulcerosa scheint diese Wirkung wichtig zu sein (Kruis et al. 2004).

Somit haben Probiotika vor allem eine präventive Bedeutung für unsere Gesundheit. Viele der Untersuchungen beziehen sich auf das intestinale Epithel des Verdauungstraktes. Beim Verzehr von mit Probiotika versetzten Produkten berichten viele Probanden von einer Steigerung ihres „gastrointestinalen Wohlbefindens“. Probiotika werden heute Lebensmitteln zugesetzt und gelten schon sehr lange als bekömmlich und unbedenklich vor allem in Anbetracht der immer größer werdenden Anzahl an laktoseintoleranten Patienten, bei welchen sich die Symptome durch Probiotika bessern können. Sie beeinflussen die Darmflora positiv und hemmen zum Beispiel auch die bakterielle Translokation durch die Darmwand, stimulieren Abwehrzellen (Makrophagen, NK-Zellen), steigern die Zytokinfreisetzung (IFN-alpha, TNF-alpha, IFN-gamma) und erhöhen die Produktion bestimmter Antikörper (De Vrese und Schrezenmeir 2009). Auch auf die orale Gesundheit, sowohl auf die orale Mikroflora als auch auf die Immunantwort, scheinen probiotische Keime eine Wirkung zu haben, jedoch kann noch nichts über genaue Mechanismen gesagt werden (Haukioja 2010).

1.4. Aufgabenstellung / Ziel

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob probiotische Bakterien einen Einfluss auf die Bildung von Defensinen in oralen Keratinozyten haben. Speziell wurden hier zwei typische Keime der Laktobazillen gewählt, von welchen lediglich die Bakterienextrakte, also keine lebenden Bakterien verwendet wurden: *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus rhamnosus* GG. Die Bakterienextrakte wurden in steigender Konzentration und zu zwei unterschiedlich langen Zeiten mit den oralen Keratinozyten inkubiert. In den Überständen wurde überprüft und nachgewiesen, ob und inwieweit sich die Produktion des humanen β -Defensins-2 veränderte.

2 Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Überblick über die Kulturbedingungen von OKF6/hTERT-2 Zellen

Die TERT-immortalisierte, humane, orale Keratinozyten-Zelllinie OKF6/hTERT-2 wurde aus dem Department of Dermatology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Skin Disease Research Center der Harvard Medical School zur Verfügung gestellt und dort erstmals im Jahre 2000 veröffentlicht. Die Zellen sind durch Transfektion dahingehend verändert, dass sie hTERT, eine katalytische Untereinheit ihrer Telomerasen, exprimieren und damit immortalisiert sind, nicht mehr auf ihre natürlichen Apoptosesignale während der Replikation reagieren und in Kultur ungehindert wachsen können. Normale humane Zellen würden in Kultur durch Alterung und Verkürzung ihrer Telomere in ihren Replikationszyklen limitiert sein (Dickson et al. 2000). Diese Zellen wachsen gut in serumfreiem Keratinozytenmedium (GIBCO, Keratinozyten-SFM, # 17005-042). Das Kultivieren der Zellen wurde nach dem Protokoll von Jim Rheinwald (Rheinwald 2005) durchgeführt. Diese Zellen wurden in den Versuchen mit Bakterienextrakten, wie Lipopolysacchariden (LPS), welche von den zwei typischen probiotischen Milchsäurebakterienstämmen *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus rhamnosus* GG stammen, in immer höher werdenden Konzentrationen und für zwei verschiedene Zeiträume inkubiert.

Kulturmedium:

Keratinozyten-Serum-Free-Medium (GIBCO , # 17005-042)

+ 25µg/ml Bovine Pituitary Extract (GIBCO, # 37000015)

+ 0,2ng/ml Epidermal Growth Factor (GIBCO, # 37000015)

Material und Methoden

+ 0,3mM CaCl₂

+ 100 U/ml Penicillin und 100 µl/ml Streptomycin (5ml Penicillin/Streptomycin auf 500ml Medium; 50000units/50mg; PAN Biotech, # P06-07100)

Das Medium hält sich mindestens einen Monat im Kühlschrank (4 °C) und sollte besser lichtgeschützt sein. In dem reinen Medium ohne Zusätze würden die Zellen nicht in ausreichender Zelldichte wachsen (Rheinwald 2005).

2.1.2. Auftauen der Zellen

Das Kulturmedium wurde bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Die Kryoröhrchen (Nunc™ Cryotube™-Vials, #366656) mit den gefrorenen Zellen tauten ebenfalls im Wasserbad bei 37°C auf. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt und langsam 9ml des ebenfalls erwärmten DMEM/Ham`s-F12 (Biochrom, #F4815) hinzugefügt, welches mit 10% FBS (Gibco, # 10270-106) supplementiert war (Passagiermedium). Nach dem Zentrifugieren bei 800UpM für 5 Minuten und dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1ml Kulturmedium gelöst und die Zellzahl bestimmt (Cellometer, AutoT4, PeqLab, Erlangen, Deutschland). Anschließend wurden die Zellen in 75-cm²-Kulturflaschen (T75-Kulturflasche, Sarstedt, # 83.1813.002) mit 10ml Kulturmedium in der gewünschten Zellzahl ausgesät. Die Zellzahl richtete sich je nachdem, wann wieder Passagiert bzw. wann mit den Versuchen gestartet werden sollte. In etwa sollte die Zellzahl aber 2×10^4 bis 10^5 beim Aussäen betragen. Durchschnittlich betrug die ausgesäte Zellzahl 5×10^4 . Ein Mediumwechsel wurde am ersten folgenden Tag und von da an jeden zweiten Tag durchgeführt.

2.1.3. Kultivierung

Die Zellen müssen bei Überschreiten von einer Konfluenz von etwa 33% subkultiviert werden, um ein gutes Wachstum weiterhin zu gewährleisten (Rheinwald 2005). Für die Versuche allerdings wurde eine Konfluenz von ca. 80% der Zellen in einer T75-Kulturflasche angestrebt. In einer Kulturflasche reichten 10ml Medium für zwei Tage. Dann musste ein Mediumwechsel vorgenommen werden. Über ein Wochenende reichten 14ml. Die Zellen wurden nach dem Auftauen und Zählen in der oben genannten Zellzahl mit einer Pipette an der Zellbank vorsichtig in das Medium in einer Kulturflasche gegeben. Das Medium mit den zugefügten Zellen wurde langsam auf dem Flaschenboden geschwenkt, damit sich die Zellen gleichmäßig über den Boden verteilen konnten. Anschließend wurde die Kulturflasche verschlossen in einen Brutschrank mit 37°C gelagert. Sowohl nach dem Aussäen, als auch zwischendurch während der Medienwechsel bzw. während des Passagierens oder Stimulierens, wurden die Zellen in den Flaschen unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Axiovert 40CFL) begutachtet, um sicher zu gehen, ob sie sich adhären und vital bleiben. Nach dem Aussäen lagen die Zellen lose im Medium, ihre Form war noch kugelig abgerundet. Nach etwa einem Tag konnte man beobachten wie sie sich am Flaschenboden mit kleinen Ausläufern festgesetzt hatten. Ihre Form war dann eher oval bis länglich mit kleinen Ausstülpungen. Die Zellen wuchsen schnell. Schon nach zwei Tagen konnte man in etwa eine Verdoppelung der Zellen sehen. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Somit wuchsen die Zellen, solange sie genug Platz und genug Nährstoffe hatten. Nur vereinzelt konnten unterm Mikroskop vom Flaschenboden abgelöste, tote Zellen beobachtet werden, welche beim Mediumwechsel abgewaschen wurden.

2.1.4. Passagieren

Passagiert wurden die Zellen, nachdem eine etwa 30-40%ige Konfluenz sichtbar war. Dies erreichten die Kulturen nach ca. 5 bis 8 Tagen. Dazu wurde speziell Passagiermedium hergestellt (vgl. 2.1.2.):

DMEM/Ham`s F-12 + 10% FBS

Alle Medien und Suspensionen wurden vorher im 37°C-Wasserbad erwärmt. Das Kulturmedium wurde mit einer Glaspipette in jeweils einer Ecke der Kulturflaschen an der Zellbank abgesaugt. Danach wurden die Flaschen mit einigen Millilitern vorgewärmten PBS zwei- bis dreimal vorsichtig gewaschen. Es wurden 2 ml der Abdauflösung Trypsin/EDTA (T/E, 0,125% Trypsin/0,01%EDTA in PBS) auf den Zellrasen gegeben und die Kulturflaschen für 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Schütteln der Flaschen wurden die Zellen zusätzlich gelöst und im Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich so gut wie alle Zellen vom Flaschenboden gelöst haben. Mechanisch, mit bspw. Schabern, sind die Zellen nicht zu lösen und gehen dadurch kaputt (Rheinwald 2005). Auf die gelösten Zellen wurde die gleiche Menge an Passagiermedium wie T/E gegeben, die Zellsuspension mehrmals in der Pipette hoch und runter pipettiert und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden 5 Minuten bei 800UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium wieder gelöst. Die Zellen wurden mit dem Cellometer gezählt und dann entsprechend wieder in Kulturflaschen ausgesät (s. Kultivierung). In 25-cm²-Kulturflaschen (T25) wurde das oben beschriebene mit geringerer Zellzahl durchgeführt (2×10^4 Zellen/ml). Allerdings waren hier bei 80%iger Konfluenz zu wenige Zellen für die Stimulationsversuche vorhanden. So wurde festgestellt, nach wie vielen Tagen eine 80%ige Konfluenz vorhanden ist und wie viele Zellen/ml zu zählen waren. Dies waren wichtige Angaben für

Material und Methoden

die Stimulationsversuche, da die genaue Konzentration von Bakterienextrakt zu Zellen gewährleistet sein musste.

2.1.5. Einfrieren

Wenn die Zellen passagiert wurden und zu viele Zellen vorhanden waren, um sie wieder aussäen zu können, wurde 2x-Freezing-Medium angesetzt, um die Zellen einfrieren zu können.

Dieses Medium setzte sich zusammen aus:

DMEM/Ham`s-F12 + 20% FBS + 20% DMSO (Sigma-Aldrich, #D2650)

Über Nacht musste dieses Medium bei +4°C gelagert werden. Die Konzentration der Zellen zum Einfrieren betrug in etwa $2,5 - 4,5 \times 10^5$ /ml. Dieses Medium wurde zu gleicher Menge direkt auf die vorher gezählten und in Kulturmedium resuspendierten Zellen gegeben und auf Kryoröhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden für mindestens 4 Stunden bei -80°C gelagert und innerhalb von 24h in den Stickstofftank überführt.

2.2. Aussähen der Zellen und Stimulation

Um die Zellen bei einer 80%igen Konfluenz mit den Bakterienextrakten stimulieren zu können, wurde ein Versuchsmedium benutzt, in welchem höhere Konzentrationen an Nährstoffen vorhanden waren. Die Zellen wurden gleich in diesem Medium ausgesät und auf die gewünschte Konfluenz gezüchtet. Das Versuchsmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

Keratinozyten-SFM + DMEM/Hams-F12 im Verhältnis 1:1

+ 25µg/ml BPE

+ 0,2ng/ml EGF

Material und Methoden

+1,5mM L-Glutamin (PanBiotech, #P04-80100)

+ 5 ml Penicillin/Streptomycin

In die T75 Kulturflaschen wurden in Versuchsmedium gelöste Zellen in einer Konzentration von $2,6 \times 10^4$ gegeben. Jeweils zwei Flaschen für die Stimulationsversuche und jeweils eine Flasche als „Zählflasche“, um die Zellzahl zu bestimmen, wurden angesetzt (siehe Tabelle 2.1.). Nach 4 Tagen war die 80%ige Konfluenz erreicht, die Zellzahl betrug etwa $1,85 \times 10^6$ Zellen/ml. Mit dieser Zellzahl wurden die Konzentrationen der Bakterienextrakte ausgerechnet:

Die Konzentration der Extrakte von *Lactobacillus salivarius* betrug: $159,30 \times 10^6$ /ml.

Konzentration **Zellen** : **Bakterienextrakt**

Bei einem Verhältnis von **1:1** wurden **11,6µl Extrakt** dazu gegeben, demnach:

1:1	11,6 µl
1:10	116,0 µl
1:100	1160,0 µl
1:1000	11600,0 µl.

Die Konzentration der Extrakte von *Lactobacillus GG* betrug: $95,00 \times 10^6$ /ml.

Konzentration **Zellen** : **Bakterienextrakt**

1:1	19,5 µl
1:10	195,0 µl
1:100	1950,0 µl
1:1000	19500,0 µl.

Material und Methoden

Die Stimulationsversuche wurden wie folgt durchgeführt:

Anzahl der Flaschen	Konzentrationen	Bakterienextrakt	Inkubationszeit
2	1:1	L.s.	6h
2	1:10	L.s.	6h
2	1:100	L.s.	6h
2 Wells	1:1000	L.s.	6h
2	Kontrolle	Keine	6h
2	1:1	L.s.	24h
2	1:10	L.s.	24h
2	1:100	L.s.	24h
2 Wells	1:1000	L.s.	24h
2	Kontrolle	Keine	24h
2	1:1	L.gg	6h
2	1:10	L.gg	6h
2	1:100	L.gg	6h
2 Wells	1:1000	L.gg	6h
2	Kontrolle	Keine	6h
2	1:1	L.gg	24h
2	1:10	L.gg	24h
2	1:100	L.gg	24h
2 wells	1:1000	L.gg	24h
2	Kontrolle	Keine	24h

Tabelle 2.1.

Um die gewünschte Konzentration von einer Zelle zu 1000x Bakterienextrakt zu erreichen, wurden diese Versuche in jeweils 2 Wells einer 24-well-Platte durchgeführt. In den Kulturflaschen wäre die Menge an Bakterienextrakt sonst zu hoch gewesen. In einem Well betrug die Zellzahl $7 \times 10^4/\text{ml}$, die hinzugegebene Menge an L.GG betrug $763\mu\text{l}$ und an L.s. $440\mu\text{l}$. Die Kontrollen bestanden aus der reinen Zellkultur im Versuchsmedium ohne hinzugefügte Bakterienextrakte.

Die Keratinozyten wurden in den Kulturflaschen für 6 Stunden oder 24 Stunden mit der bestimmten Konzentration an Bakterienextrakten im

Material und Methoden

Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand in den Kulturflaschen vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in 15-ml-Röhrchen überführt, beschriftet und bei -80°C gelagert. Diese Überstände dienen als Nachweis des Proteins hBD-2 mittels ELISA.

2.2.1. Bakterienextrakte aufbereiten

Die Bakterienextrakte entstammen der Medizinischen Hochschule Hannover und mussten gewaschen werden, bevor sie zur Stimulation genutzt werden konnten. Die Kryoröhrchen, die die Bakterienzellextrakte enthielten, wurden im 37°C-Wasserbad aufgetaut, die Lösung in Eppendorfcups überführt und einmal bei 800UpM zentrifugiert. Anschließend wurden die Extrakte 2mal in PBS gelöst, wieder zentrifugiert und schließlich in 1ml Versuchsmedium gelöst. Diese Lösung wurde für die Stimulationsversuche in entsprechender Menge zu den Zellen hinzugegeben.

2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

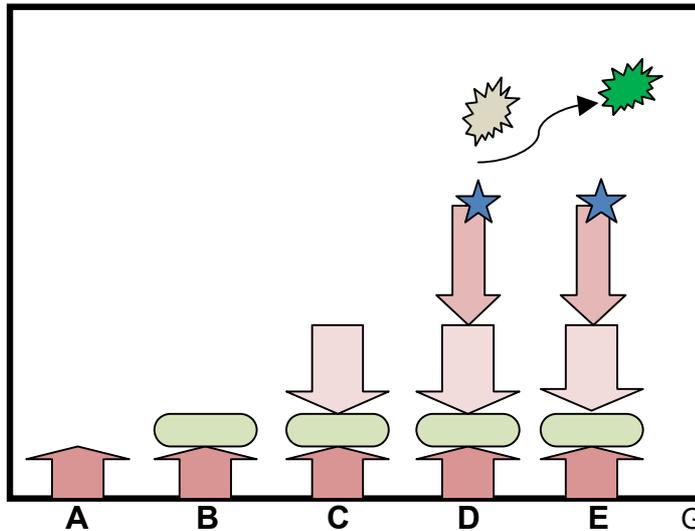
2.3.1. Methode

ELISA ist die Abkürzung für „enzyme-linked immunosorbent assay“ und beschreibt eine Methode, mit welcher viele Proteine nachweisbar sind. Man nutzt hier die Eigenschaft von Antikörpern, sich an spezifische Antigene zu binden. An den Antikörpern ist ein Enzym gebunden. Das Enzym katalysiert die Reaktion eines Substrates in ein Produkt, welches meist als Farbumschlag, Fluoreszenz oder als Chemolumineszenz messbar ist. Durch diese Reaktion ist das Antigen, das vom Antikörper gebunden wurde,

Material und Methoden

nachgewiesen. Der Farbumschlag kann mit Hilfe eines Photometers genau gemessen werden. Die Stärke der Reaktion korreliert außerdem mit der Konzentration an Antikörper bzw. Antigen und somit kann mittels ELISA auch quantitativ ein Protein nachgewiesen werden (Engvall and Perlmann 1971). Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um einen Sandwich-Elisa. Mit diesem ist es möglich sowohl qualitativ als auch quantitativ das Protein nachzuweisen, im Vergleich zum indirekten ELISA, welcher nur den qualitativen Nachweis erbringt. Beim Sandwich-Elisa gibt es zwei Antikörper. Beide Antikörper binden das Antigen spezifisch, jedoch an verschiedenen Epitopen. Zuerst wird der erste Antikörper (Capture-Antibody) in die Wells einer 96-well-Platte gegeben. Hier haftet er am Boden an. Dann wird die Lösung, die das Antigen enthält, darauf gegeben und eine bestimmte Zeit inkubiert. Die Antigene werden von den festsitzenden Antikörpern gebunden. Nachdem die Wells gewaschen wurden, um nichtgebundene Antigene zu entfernen, kann der zweite Antikörper auf die Wells gegeben werden (Detection-Antibody), welcher entweder schon mit dem Enzym gebunden ist oder es muss noch ein zweiter mit dem Enzym gebundener Antikörper hinzugefügt werden, der an den Detection-Antibody bindet. Danach wird das Substrat hinzugefügt, kann von dem Enzym umgesetzt werden und so kommt es zu dem gewünschten, messbaren Farbumschlag, der Fluoreszenz oder Chemolumineszenz.

Prinzip des Sandwich-ELISAs



Graphik 2.1.

Beschreibung: **A:** der Capture-Antibody wird auf die leeren Wells gegeben und setzt sich am Boden fest. **B:** das Antigen, hier hBD-2, wird vom Capture-Antibody gebunden. **C:** wie bei einem Sandwich, setzt sich der Detection-Antibody an ein anderes Epitop des Antigens. Dieser ist entweder selbst schon mit einem Enzym verbunden oder ein zweiter Antikörper mit gebundenem Enzym, hier die Meerrettichperoxidase avidin-HRP (horseradish peroxidase), setzt sich spezifisch an den Detection-Antibody **D.** **E:** hier wird dann durch Zugabe des Substrates ein Reaktionsprodukt frei, welches als Farbumschlag zu sehen und mit einem Photometer zu messen ist.

2.3.2. ELISA-Durchführung

In dieser Arbeit handelt es sich um das antimikrobielle Peptid humanes Beta-Defensin-2, welches nachgewiesen wurde (Human BD-2 Development Kit, Peprotech, # 900-K172). Zuerst wurde die 96-well-Platte (Nunc MaxiSorp, # 439454) vorbereitet. Der Capture-Antibody wurde mit PBS auf eine Konzentration von 0,25µl/ml verdünnt (1:400, vorige Konzentration des

Material und Methoden

Antikörpers war 100µl/ml). Insgesamt wurden 100µl pro Well der Lösung gebraucht und die Lösung für 50 Wells angesetzt:

50 Wells à 100µl = 5 ml

400/1 = 5000µl / **12,5µl** → so viel Capture-Antibody kam in 5000µl PBS

Von dieser Lösung wurden also 100µl in je ein Well gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) oder über das Wochenende bei 4°C gelagert. Der Capture-Antibody soll sich so am Boden der Wells festsetzen (s.o. Graphik 2.1.).

Die Platten wurden wie folgt beschriftet und eingeteilt:

Graphik 2.2.: **96-well-Platte**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Standard	A	1ng	0,5ng	0,25ng	0,125ng	0,0625ng	0,03125ng	0,015625ng	0,0078125ng	Nullwert			
	B	"	"	"	"	"	"	"	"	"			
L.salivarius	C	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	Kontrolle	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	Kontrolle		
	D	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"		
L. gg	E	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	Kontrolle	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	Kontrolle		
	F	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"		
	G												

Aus der 96-well-Platte wurde nun die Flüssigkeit aspiriert und die Wells mit je 300µl Waschpuffer (0,05% Tween-20 (Sigma, # P-7949) in PBS) 4mal gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Platten umgekehrt kurz gelagert, damit die Waschpufferflüssigkeit aus den Wells herauslaufen konnte. Anschließend wurden 300µl Blockpuffer (1% BSA (Sigma, # A-7030) in PBS, steril filtriert) in jedes Well gegeben, die Platte mit einer Folie, vor Verschmutzungen geschützt, abgedichtet und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einer Stunde wurde wiederum die Flüssigkeit aspiriert und die Platte 4mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Standardlösung (1µg rekombinantes hBD-2 + 2,2mg BSA + 11mg D-Mannitol in sterilem H₂O auf

Material und Methoden

eine Konzentration von 1µg/ml gebracht) wurde folgendermaßen verdünnt um bei einer Konzentration von 1ng/ml als 1:1-Verdünnung zu beginnen und bis zu einem Nullwert zu kommen:

1µl Standard in 1000µl Diluent (0,05% Tween-20, 0,1% BSA in PBS, steril filtriert)



davon 500µl in 500µl Diluent



davon wieder 500µl in 500µl Diluent

Dieses wurde dann weiter geführt bis zu einer Konzentration von 0,0078125 ng/ml

(1ng, 0,5ng, 0,25ng, 0,125ng, 0,0625ng, 0,03125ng, 0,015625ng, 0,0078125, 0ng=negativ Kontrolle = Nullwert, hier nur Diluent)

In die ersten beiden Spalten der Platten (s.o. Graphik 2.2.) wurden, direkt nachdem die Platten gewaschen waren, 100µl der Standardlösung entsprechend der Verdünnungsreihe in Duplikaten pipettiert. In die darunter liegenden Spalten wurden entsprechend der Graphik 2.2. die Proben (Überstände der Stimulationsversuche) ebenfalls in Duplikaten zu je 100µl/well pipettiert. Die Platten wurden dann mit dem Standard und den Proben für zwei Stunden bei RT inkubiert. Dies entspricht Schritt B in Graphik 2.1., das Antigen bindet sich an den Capture-Antibody. Nach zwei Stunden wurden die Platten wieder 4mal aspiriert und gewaschen, um alle nicht gebundenen Moleküle zu entfernen. Der Detection-Antibody wurde in Diluent 1:200 auf eine Konzentration von 0,5µg/ml verdünnt und davon ebenfalls 100µl pro Well auf die Platten gegeben. Diese wurden wiederum für zwei Stunden bei RT inkubiert. Daraufhin folgte wieder das 4malige Waschen der Wells mit dem Waschpuffer. 5,5µl vom Avidin-HRP Komplex wurden 1:2000 in Diluent auf insgesamt 11ml verdünnt und jeweils 100µl

Material und Methoden

davon in jedes Well gegeben und dieses für 30 Minuten bei RT inkubiert. Auch nach diesem Schritt musste die Platte wieder, wie bereits beschrieben, gewaschen werden. 100µl der Substratlösung ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma, # A3219) wurden in jedes Well gebracht und bei RT inkubiert. Der Farbumschlag konnte nun beobachtet werden. Gestoppt wurde diese Reaktion nach einigen, wenigen Minuten mit 100µl 1%igem SDS pro Well. Die Farbeveränderung konnte mittels Photometer aus der Abteilung Klinische Chemie der Universität Göttingen bei 405nm Wellenlänge gemessen werden.

3 ELISA-Ergebnisse

Die biometrische Auswertung dieser Versuche wurde mit Hilfe der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen durchgeführt. Die deskriptiven Merkmale und Graphiken wurden mit Statistica Version 10 erstellt. Die Versuche wurden mit der Software SAS Version 9.3 ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=5\%$ festgelegt.

Bei dieser Arbeit waren unterschiedliche Messwerte bezüglich der verschiedenen Konzentrationsstufen, der Zeit und der Bakterienkulturen von Interesse.

Diese Haupteffekte haben folgende Faktorstufen:

Konzentration: 0, 1, 10, 100, 1000 (entsprechend der Verdünnung von Bakterien zu Zellen)

Zeit: 6 Stunden, 24 Stunden (Inkubationszeit)

Gruppe: L.s., L.gg (Bakterienextrakte von *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus rhamnosus* GG)

Dabei wurden sämtliche Kombinationen der Faktoren auf einer Platte in Triplets gemessen. Der Versuch wurde insgesamt, wie oben bereits erwähnt, auf drei Platten zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Somit sind die Messwerte innerhalb einer Platte als abhängig zu betrachten. Trotz des sehr geringen Stichprobenumfangs von drei Messungen wurde eine Repeated-Measures-ANOVA durchgeführt.

Ergebnisse

Die ELISA-Platten wurden mit dem Photometer an der Universität Göttingen mit einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Rohdaten dieser Extinktionswerte sind in den Tabellen 3.1. und 3.1.1. zu sehen.

Tabelle 3.1. Extintionswerte (Rohdaten) für die Standardverdünnungsreihe

Standard (ng/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,0078125	Nullwert
Exktinktion (nm)									
ELISA 1	1,5575	1,4455	1,33	1,2535	0,9205	0,747	0,587	0,485	0,385
ELISA 2	1,108	1,102	1,021	0,9075	0,7185	0,5085	0,357	0,266	0,038
ELISA 3	1,0515	1,0165	0,982	0,8165	0,5745	0,413	0,31	0,22	0,042

Tabelle 3.1.1.: Extinktionswerte (Rohdaten) der Proben

Konzentration Bakterienextrakte	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	Kontrolle 6h	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	Kontrolle 24h
Extinktion (nm)										
ELISA 1 L.s.	0,5825	0,5795	0,4985	0,2835	0,7525	0,5005	0,538	0,6855	0,276	0,8495
ELISA 2 L.s.	0,398	0,2515	0,26	0,1335	0,2655	0,1885	0,436	0,256	0,118	0,286
ELISA 3 L.s.	0,3995	0,2185	0,2345	0,113	0,238	0,1655	0,364	0,2215	0,103	0,247
ELISA 1 L.gg	0,6435	0,701	0,44	0,4515	0,9075	0,711	0,6205	0,8615	0,4795	0,929
ELISA 2 L.gg	0,525	0,3345	0,166	0,1195	0,481	0,3135	0,2315	0,4095	0,1245	0,658
ELISA 3 L.gg	0,4735	0,3075	0,176	0,126	0,4575	0,3225	0,3455	0,409	0,123	0,68

Ergebnisse

In den Tabellen sind die reinen Extinktionswerte dargestellt, welche mit dem Photometer gemessen wurden. In der ersten Tabelle 3.1. sind die Werte der Standardverdünnungsreihen zu sehen. Die ELISA-Angaben stellen jeweils eine ELISA-Platte dar, auf welcher zur gleichen Zeit die Versuche durchgeführt wurden. Das heißt, auf Platte 1 (hier **ELISA 1**) wurden eine Standardverdünnungsreihe und darunter, in Tabelle 3.1.1. entsprechend bei **ELISA 1**, jeweils die Proben der Stimulationsversuche aufgetragen und gemessen. Die Extinktionswerte sind Mittelwerte aus jeweils drei zeitgleich gemessenen Werten. Die Versuche wurden außerdem insgesamt drei Mal zu unabhängigen Zeiten durchgeführt (**ELISA1, 2 und 3**).

An der Standardverdünnungsreihe ist zu erkennen, dass sich mit absteigender Konzentration an hBD-2 auch der Extinktionswert im Photometer verringert. Mittels dieser Verhältnisse, **Extinktion = Konzentration**, können Standardkurven gebildet werden (s. Graphik 3.1.). Durch die gemessenen Extinktionswerte der Proben kann so die in den Proben vorhandene Konzentration an hBD-2 berechnet werden.

Ergebnisse

Tabelle 3.1.2.: **Extinktionswerte und entsprechende Konzentrationswerte in pg/ml**

Die Konzentrationen sind in Blau jeweils unter den Extinktionwerten angegeben. Tabelle 3.1.2.:

Konzentration Bakterien- extrakte	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	Kontrolle 6h	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	Kontrolle 24h	
Extinktion (nm)											Konz. (pg/ ml)
ELISA 1 L.s.	0,5825 12,935	0,57 95 12,7 73	0,4985 9,094	0,2835 3,690	0,7525 26,392	0,5 005 9,1 70	0,538 10,732	0,6855 19,926	0,276 3,576	0,8495 39,644	
ELISA 2 L.s.	0,398 14,612	0,25 15 6,89 1	0,26 7,198	0,1335 3,761	0,2655 7,404	0,1 885 4,9 87	0,436 17,758	0,256 7,051	0,118 3,473	0,286 8,225	
ELISA 3 L.s.	0,3995 21,662	0,21 85 8,52 5	0,2345 9,258	0,113 4,950	0,238 9,426	0,1 655 6,4 88	0,364 18,041	0,2215 8,658	0,103 4,703	0,247 9,873	
ELISA 1 L.gg	0,6435 16,707	0,70 1 21,2 64	0,44 7,115	0,4515 7,466	0,9075 50,563	0,7 11 22, 175	0,6205 15,170	0,8615 41,690	0,4795 8,397	0,929 55,335	
ELISA 2 L.gg	0,525 28,036	0,33 45 10,5 49	0,166 4,443	0,1195 3,500	0,481 22,370	0,3 135 9,4 71	0,2315 6,218	0,4095 15,500	0,1245 3,591	0,658 55,473	
ELISA 3 L.gg	0,4735 31,716	0,30 75 13,4 85	0,176 6,849	0,126 5,293	0,4575 29,206	0,3 225 14, 568	0,3455 16,401	0,409 22,749	0,123 5,212	0,68 91,900	

Ergebnisse

Hier ist zu beachten, dass die drei ELISA ihre jeweils eigenen Standardkurven haben und die Extinktionen und Konzentrationen von daher nur innerhalb eines ELISAs miteinander verglichen werden können.

Die standardisierten Werte wurden folgendermaßen berechnet:

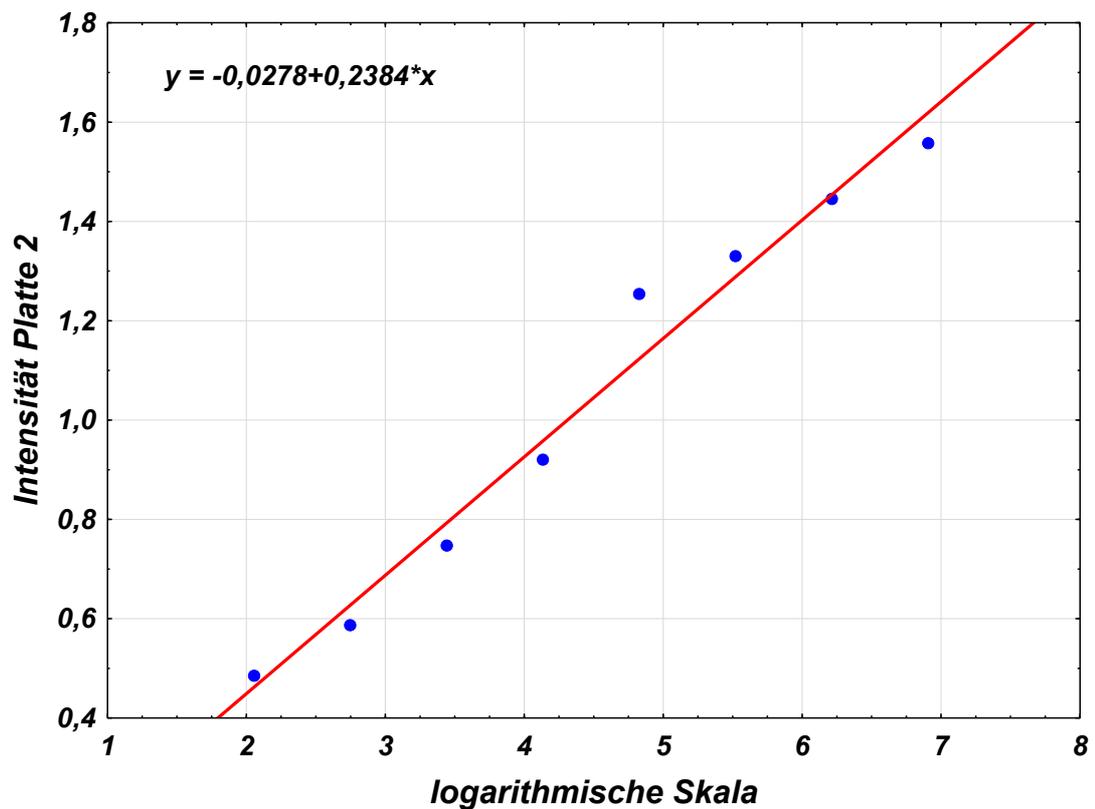
Tabelle 3.2.:

	Konz. ng/ml	entsprech- ende Konz. in pg/ml	log -Werte zur Konstruktion der Regressions- geraden	Y-Achse Extinktions- werte ELISA1	Y-Achse Extinktions- werte ELISA2	Y-Achse Extinktions- werte ELISA3
1	1	1000	6,90775528	1,5575	1,108	1,0515
2	0,5	500	6,2146081	1,4455	1,102	1,0165
3	0,25	250	5,52146092	1,33	1,021	0,982
4	0,125	125	4,82831374	1,2535	0,9075	0,8165
5	0,062 5	62,5	4,13516656	0,9205	0,7185	0,5745
6	0,031 25	31,25	3,44201938	0,747	0,5085	0,413
7	0,015 625	15,625	2,7488722	0,587	0,357	0,31
8	0,007 8125	7,8125	2,05572502	0,485	0,266	0,22

Ergebnisse

Eine der Regressionsgeraden der Standards für die drei ELISA-Platten ist hier dargestellt:

Graphik 3.1.



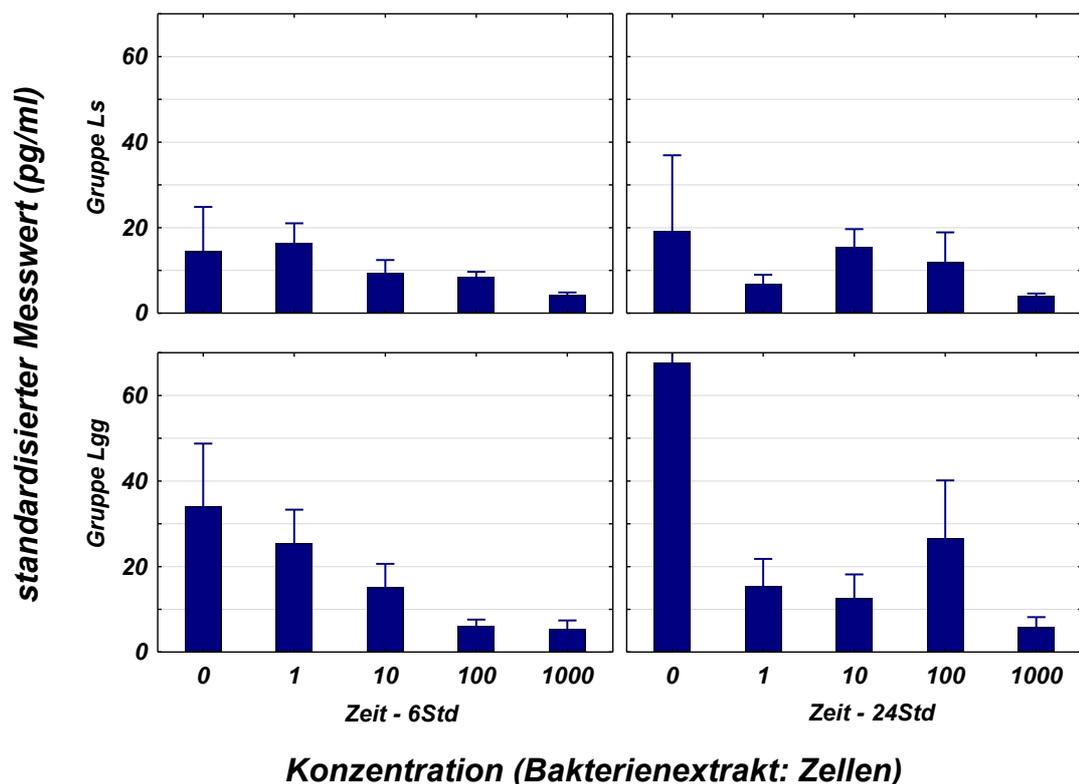
Hier ist die Standardkurve von ELISA 1 dargestellt. Die Intensität beschreibt die Extinktion. Logarithmisch ist die Konzentration dargestellt (vgl. Tabelle 3.2. oben). Mit Hilfe der oben aufgeführten Standardkurve (für die anderen Standards sind die Kurven nicht aufgeführt) wurden also die hBD-2-

Ergebnisse

Konzentrationen für die eigentlichen Probenwerte ausgerechnet (s. Tabelle 3.1.2. oben).

In folgender Graphik werden alle drei ELISA-Durchführungen zusammengefasst und als Balkendiagramm dargestellt, um einen einfacheren Vergleich zu veranschaulichen. Aufgeteilt sind die Versuche nach den Hauptfaktoren Bakteriengruppen, also *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus rhamnosus* GG, und Inkubationszeit, 6 und 24 Stunden. Die Konzentrationsverhältnisse von Bakterienextrakten und Zellen sind in jeder der vier kleinen Graphiken enthalten und können verglichen werden.

Graphik 3.2.:



Ergebnisse

Der **„standardisierte Messwert“ (y-Achse)** gibt die Extinktionswerte, welche in die Konzentration von hBD-2 in pg/ml umgerechnet sind, an. Die **„Konzentration“ (x-Achse)** zeigt die unterschiedlichen Inkubations-Verhältnisse von Zellen zu Bakterien während der Stimulationsversuche.

Zum besseren Verständnis wird zuerst die einzelne Graphik oben links genauer beschrieben. Hier ist die Stimulation der Zellen mit *Lactobacillus salivarius* für 6 Stunden dargestellt. Die Konzentration 0 bedeutet, dass hier keinerlei Bakterienextrakte den Zellen zugesetzt wurden, das heißt, es handelt sich hier jeweils um den Kontrollwert. Die Konzentration 1 bedeutet, dass zu den Zellen Bakterienextrakte im Verhältnis 1:1 zugesetzt wurden. Die Konzentration 10 gibt ein Verhältnis von Zellen zu Bakterienextrakten von 1:10 an, die restlichen Werte führen dieses Schema fort. Die anderen drei Graphen zeigen entsprechend die Konzentrationen von hBD-2 nach der Stimulation von 24 Stunden (oben rechts) und nach der Stimulation von 6 und 24 Stunden mit den Bakterienextrakten von *Lactobacillus rhamnosus* GG (unten links und unten rechts).

Auswertung:

Es ist zu erkennen, dass die Konzentration von hBD-2 bei den Kontrollen relativ hoch ist. Hier wird von den Zellen hBD-2 produziert. Nach 24 Stunden Stimulation ist die Kontrollkonzentration an hBD-2 jeweils höher als nach 6 Stunden. Die Produktion scheint also kontinuierlich zu sein. Durch die Zugabe von Bakterienextrakten der probiotischen Bakterien ist in der oben gezeigten Graphik zu sehen, dass sich die Konzentration des produzierten hBD-2 im Allgemeinen eher verringert.

Nach 6-stündiger Stimulation mit *Lactobacillus salivarius* und einem Verhältnis von Bakterienextrakten zu Zellen von 1:1 steigt jedoch die hBD-2-Konzentration auf fast 20 pg/ml. Der Kontrollwert liegt hier bei etwa 15 pg/ml.

Ergebnisse

Bei einem höheren Verhältnis von Extrakten zu Zellen nimmt die hBD-2-Konzentration wieder immer weiter ab. Bei dem Verhältnis 1:1000 ist die hBD-2-Konzentration sehr niedrig, also unter 10 pg/ml. Wurden die Zellen mit den L.s.-Extrakten für 24 Stunden inkubiert, liegt der Kontrollwert bei 20 pg/ml und fällt aber dann bei einem Verhältnis von Extrakten zu Zellen von 1:1 steil auf unter 10pg/ml ab. Ebenso niedrig stellt sich hier auch der Wert für das Verhältnis von 1:1000 dar. Die Werte für die Verhältnisse 1:10 und 1:100 sind etwas höher, fallen aber im Vergleich zum Kontrollwert auch ab.

Bei der Stimulation der Zellen mit *Lactobacillus rhamnosus* GG für 6 Stunden fallen die hBD-2-Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollwert kontinuierlich ab. Der Kontrollwert liegt hier noch bei über 30 pg/ml und fällt während der Stimulation, je höher die Bakterienextraktkonzentration auf den Zellen ist, um ca. 10 pg/ml ab. Bei den Verhältnissen von 1:100 und 1:1000 betragen die Werte wieder weniger als 10 pg/ml. Auch nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit den L.gg-Extrakten fällt die hBD-2-Konzentration ab. Hier ist der Kontrollwert sehr hoch, bei über 60 pg/ml, und fällt schon bei einem Stimulationsverhältnis von 1:1 auf unter 20 pg/ml. Bei 1:10 fällt die Konzentration noch ein bisschen mehr und bei 1:1000 ist der Wert wieder am niedrigsten, bei unter 10 pg/ml. Nur das Verhältnis von 1:100 ergibt hier einen höheren hBD-2-Wert im Vergleich zu den übrigen Stimulationsverhältnissen, und zwar in etwa 40 pg/ml. Allerdings ist dieser Wert noch immer deutlich unter dem Kontrollwert.

Ausnahmen stellen also Werte für die Stimulation mit L.s. für beide Stimulationszeiten und für L.gg für 24 Stunden dar. Bei der Stimulation mit L.gg für 6 Stunden ist ganz deutlich bei jedem Konzentrationsverhältnis ein hBD-2-Konzentrationsrückgang festzustellen. Bei einem Verhältnis von 1:1000 ist in jedem der Versuche ein Konzentrationsabfall von hBD-2 im Vergleich zu den anderen Verhältnissen zu verzeichnen. Ein wirklicher Anstieg der hBD2-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ist nur bei der

Ergebnisse

Stimulation von L.s. für 6 Stunden und einem Bakterienextrakt-Zell-Verhältnis von 1:1 zu erkennen. Da die Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle also fast immer sinken, weisen die Inkubationszeiten keine bemerkenswerten Unterschiede auf. Die Konzentrationen nach Stimulation sind sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden etwa ähnlich niedrig. Bei den Kontrollwerten ist jedoch nach 24 Stunden immer eine etwas höhere hBD-2-Konzentration vorhanden.

Zu vergleichen sind innerhalb einer Graphik (z.B.: links oben) immer nur die Konzentrationsverhältnisse (Bakterienextrakt-Zelle) miteinander. Zwischen zwei Graphiken mit dem gleichen Bakterienstamm können auch die Inkubationszeiten verglichen werden. Dargestellt sind hier die drei ELISA-Platten zusammengefasst zu vier verschiedenen Ergebnissen, zu den vier Graphiken. Der Kontrollwert ist hier unterschiedlich hoch, obwohl in den Proben jeweils nur die Zellen vorhanden waren, weil, je nachdem auf welcher Platte die Extinktionen gemessen wurden, die Werte etwas variieren und immer mit der entsprechenden Standardkurve berechnet wurden. Hier sind jedoch alle Versuche zusammengefasst und man kann deshalb zum Beispiel nicht direkt die hBD-2-Konzentrationen der Kontrollwerte vergleichen. Es kann jedoch gezeigt werden, wie sich die hBD-2-Konzentrationen allgemein und jeweils in Bezug zu den Konzentrationsverhältnissen und den Kontrollwerten innerhalb einer einzelnen Graphik verändern.

Welche der drei Faktoren: **Zeit**, **Bakterienspezies** und **Konzentration** signifikant sind, ist in Tabelle 3.3. zu sehen:

Ergebnisse

Tabelle 3.3.: **Drei-Faktorielle Repeated-Measures-ANOVA**

<u>Effekt</u>	<u>p-Wert</u>	<u>Interpretation</u>
Gruppe (die Bakteriengruppen L.s. und L.gg untereinander)	0.1033	Nicht signifikant
Konzentration (Verhältnis 1:1, 1:10, u.s.w.)	<.0001	Signifikant
Gruppe*Konzentration	0.0021	Signifikant
Zeit (Inkubationszeiten 6 und 24 Stunden)	0.1572	Nicht signifikant
Gruppe*Zeit	0.2671	Nicht signifikant
Konzentration*Zeit	0.0245	Signifikant
Gruppe*Konzentr*Zeit	0.1381	Nicht signifikant

Die Konzentration, also das Verhältnis von Zellen und Bakterienextrakten zueinander, ist signifikant. Ebenso ist diese Konzentration in Zusammenhang mit den Extrakten der jeweiligen Bakterienspezies (hier: Gruppe) und auch mit der Dauer der Inkubation (hier: Zeit) ausschlaggebend. Die Gruppe und die Zeit sind nicht signifikant. Der Haupteffekt ist hier also die Konzentration von Bakterienextrakten zu Zellen.

Hier ist der **p-Wert** ausschlaggebend. Der p-Wert beschreibt das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests (Lange 2000). Mit einem Signifikanztest kann eine Hypothese überprüft werden. Dabei gibt die „Nullhypothese“ die Gleichheit an, also keinen Effekt, die „Alternativhypothese“ einen

Ergebnisse

Unterschied, also einen Effekt, in Bezug auf eine Fragestellung. Mathematisch nicht ganz korrekt ausgedrückt, kann man sagen, dass der p-Wert eine Wahrscheinlichkeit dafür ist, dass sich die bestimmten Daten realisieren, falls die Nullhypothese in Wirklichkeit zutrifft. Ist diese Wahrscheinlichkeit klein, spricht dies gegen die Nullhypothese und somit ist dann Evidenz für die Richtigkeit der Alternativhypothese da. Eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau α) wird vor Beginn einer Datenerhebung festgelegt, häufig mit $\alpha=0,05$. Solange der p-Wert kleiner als α ist, liegt eine statistische Signifikanz zum Niveau α vor, das Ergebnis ist also statistisch signifikant. α begrenzt den Fehler 1. Art, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist. Der p-Wert ist nicht, wie häufig falsch interpretiert, die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Nullhypothese (Bender und Lange 2007).

4 Diskussion

Probiotika werden heute in vielerlei Hinsicht in Nahrungsmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln genutzt, um die Gesundheit zu fördern. Sowohl in der Herstellung von „functional food“ als auch in der Kosmetik und Arzneimittelindustrie spielen Mikroorganismen, die dem GRAS-Status (Generally recognised as safe) entsprechen, eine wichtige Rolle (Heitmann und Bengs 2010). In Anbetracht der Gesundheit der Mundhöhle zielen viele der heute verwendeten Mundhygieneprodukte darauf, Mikroorganismen abzutöten und zu beseitigen, da sich viele der Bakterien schädlich auf die orale Flora auswirken und zum Beispiel Karies und Gingivitiden verursachen.

Probiotische Bakterien sollen das Gegenteil der typischen Mikroorganismen bewirken. Sie sollen sich positiv auf die Flora im Mund auswirken, so wie es für die Flora im Darm oder im Urogenitaltrakt schon nachgewiesen werden konnte. Die Wirkung auf den urogenitalen und intestinalen Bereich wurde in zahlreichen Studien belegt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass sich Infektionen und auch allergische Reaktionen des Körpers durch die Behandlung mit Probiotika verhindern ließen bzw. gelindert werden konnten (Merk et al. 2004, Schulz 2008).

Auch in der Mundhöhle konnte man schon einige Effekte durch probiotische Keime feststellen. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass der hauptverantwortliche Keim einer Karies, *Streptococcus mutans*, durch den probiotischen Keim *Lactobacillus paracasei* zerstört wird (Heitmann und Bengs 2010). Solch positive Effekte könnten sogar vielleicht zielgerichtet eingesetzt werden. Viele Studien bewiesen bereits, dass z.B.: der Keim *Lactobacillus rhamnosus* GG, der auch in unseren Versuchen eingesetzt wurde, eine günstige Wirkung auf die Immunantwort intestinaler Zellen hat

Diskussion

und damit auch präventiv bei atopischen Erkrankungen bei Kindern wirken kann (Kalliomaki et al. 2001, Kalliomaki et al. 2003).

Das allgemeine Interesse an probiotischen Keimen ist also stark gewachsen. Allerdings konnte noch nicht sehr viel mehr über die Rolle und die Wirkung dieser Keime in der Mundhöhle und auf die Mundschleimhaut herausgefunden werden. Auf diesem Gebiet herrscht noch weitestgehend Unwissen. Einige Studien weisen darauf hin, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG eine positive Wirkung auf die schädliche Flora der Mundhöhle haben könnte, wie beispielsweise auf die Besiedlung mit *Candida*-Spezies und auf andere Karies-Risikofaktoren, wie eben *Streptococcus mutans* (Yli-Knuutila et al. 2006). Zum Beispiel wurde das Karies-Risiko und die Ausbreitung der Karies bei Kindern durch den Gebrauch von L.GG reduziert, die Konzentration an *Streptococcus mutans* und auch der Befall von *Candida* in der Mundhöhle reduziert (Ahola et al. 2002, Nase et al. 2001).

Und somit stellte zum Beispiel das Forschungs- und Entwicklungsunternehmen ORGANOBALANCE GmbH, gegründet 2001 an der TU Berlin, zusammen mit der BASF Future Business GmbH, 2009 ein Produkt vor, welches durch Probiotika zur Kariesprophylaxe beitragen soll („Pro-t-action“) (Heitmann und Bengs 2010).

Es gibt weitere, zahlreiche Lebensmittel und Medikamente, die auf dem Markt sind und probiotische Keime zusätzlich enthalten. Wie und wo genau probiotische Keime aber auf das Immunsystem wirken, kann noch nicht gesagt werden. Hier müssen noch viele Faktoren und Anhaltspunkte untersucht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich Extrakte von zwei typischen probiotischen Bakterienstämmen auf die Produktion von humanem β -Defensin-2 in oralen Keratinozyten auswirken.

Diskussion

Das humane β -Defensin-2 gilt im menschlichen Körper als eine Art „körpereigenes Antibiotikum“. Wenn dieses gebildet wird, kann es gegen pathogene Keime wirken.

Das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell ist in der Einleitung dargestellt und zeigt die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden, also Defensinen. Es zeigt, wie andere, als pathogen erkannte Keime und Zellen durch unsere körpereigenen Defensine zerstört werden können. Da die Mundschleimhaut als eine wichtige Barriere zwischen dem Inneren und dem Äußeren des Körpers fungiert, werden in den hier vorkommenden Keratinozyten ständig Defensine gebildet, die gegen von außen eingedrungene Pathogene eingesetzt werden (Eberhard et al. 2009, O'Neil et al. 1999, Schroder und Harder 1999).

Entzündungsreaktionen, als Antwort des Immunsystems auf einen Reiz, in der Mundhöhle haben zum Teil erhebliche Folgen. So können beispielsweise Entzündungen der Mundschleimhaut zu einer Entzündung des Knochens, einer Parodontitis und damit zum Verlust der Knochensubstanz und der Zähne oder zu malignen Veränderungen der Epithelien durch andauernde Entzündungszustände führen. Die Chancen, eine Parodontitis zum Beispiel mit Hilfe von Mikroorganismen zu bekämpfen, sind hoch (Heitmann und Bengs 2010). Häufig entstehen die Entzündungsreaktionen durch bakterielle Komponenten oder auch durch Zytokine (Viol 2008). Es ist ein normaler Vorgang, eine normale Reaktion im Körper, dass durch Mikroorganismen eine Immunreaktion ausgelöst wird. Unser Körper möchte diese fremden Eindringlinge, die einen potenziell schädigenden Reiz darstellen, loswerden. Daraus resultieren in Epithelien oft Entzündungsreaktionen (Herbst und Hübner 2003). Wenn Probiotika also, anstatt allein eine Entzündungsreaktion auszulösen, die Produktion des humanen β -Defensins steigern würden, wäre dies ein positiver Effekt in Bezug auf das Bekämpfen von pathogenen

Diskussion

Keimen und hier, speziell in dieser Arbeit, positiv auf den bakteriellen Befall in der Mundhöhle.

4.1. Methodik

Der russische Nobelpreisträger Elie Metchnikoff schlug Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals vor, dass Bakterien eine gesundheitsfördernde Wirkung haben. Er kam zu dem Schluss, dass die schädigende Wirkung von einigen Darmbakterien durch die Zugabe von Milchsäurebakterien, z.B. Laktobazillen aus bulgarischem Joghurt, aufgehoben werden konnten. Doch heute kennt man Bakterien und andere Mikroorganismen vor allem als Krankheitserreger, die man durch Antibiotika unter Kontrolle halten muss. Die Fähigkeiten der Bakterien, einen gesundheitlichen Beitrag zu leisten, also probiotisch zu wirken, sind immer noch wenig bekannt (Dubach 2002).

In dieser Arbeit wurden Bakterienextrakte der probiotischen Keime als Stimulanzien verwendet. Es wurden keine lebenden Bakterienzellen mit den oralen Keratinozyten versetzt. Diese Extrakte stammen aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Extrakte sind in der Lage in den menschlichen Zellen Immunreaktionen hervorzurufen (Bianchi 2007, Parlesak 2009). Das heißt, sie könnten auch für die Steigerung bzw. den Abfall der hBD-2-Produktion mitverantwortlich sein.

Es wurden Extrakte von zwei in der Forschung sehr häufig verwandten Lactobacillus-Stämmen genommen. Hierbei handelt es sich um Lactobacillus salivarius und um Lactobacillus rhamnosus GG.

Lactobacillus rhamnosus GG ist eines der weltweit am besten untersuchten Milchsäurebakterien. L.GG wurde von den amerikanischen Professoren Sherwood L. Gorbach und Barry R. Goldin der Boston School of Medicine in

Diskussion

den 80er Jahren entdeckt. Seine gesundheitsfördernden Eigenschaften wurden seitdem ausgiebig erforscht und dokumentiert (Schrezenmeir und de Vrese 2001, Klein et al. 1998, Marteau et al. 2001, Ouwehand et al. 2004, Salminen MK et al. 2004, Saxelin et al. 1995).

Lactobacillus salivarius ist in der Mundhöhle und im Dünndarm zu finden, es gehört zur normalen Mundflora (probiotics.org). Auch hier konnten gesundheitsfördernde Wirkungen festgestellt werden. In einer Studie mit über 60 gesunden Individuen wurde zum Beispiel herausgefunden, dass die Zufuhr von *Lactobacillus salivarius* mitunter fünf der für die Bildung von Plaque verantwortlichen Keime reduzieren konnte (Mayanagi et al. 2009). Die Frage, ob dieser Keim und L.GG auch in der Mundhöhle die Konzentration an dem humanen Defensin hBD-2 verändern kann, wurde in dieser Arbeit bearbeitet.

Die Extrakte wurden aus der Medizinischen Hochschule Hannover auf Trockeneis gelagert, nach Göttingen transportiert und dort sofort in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Erst für die Stimulationsversuche wurden die Extrakte nach Anleitung aufgetaut und in den gewünschten Mengen zu den Zellen dazugegeben, so dass in den Kulturflaschen die gewünschten Konzentrationen vorhanden waren. Die genauen Mengenangaben sind im Material- & Methodenteil (s.S. 22) angegeben.

Kultiviert wurde die Zelllinie OKF-6/hTERT-2. Es handelt sich hierbei um eine im Rheinwald-Labor hergestellte orale Keratinozytenzelllinie (Dickson et al. 2000). Diese Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% in dem für sie günstigen Nährmedium herangezüchtet und dann mit Extrakten der Bakterien *L. salivarius* und *L. rhamnosus* GG (s. oben) versetzt. Die Kulturbedingungen entsprachen dem Protokoll des Rheinwald-Labors. Dies ist im Material- & Methodenteil (s.S. 17-21) beschrieben. Die Zellen wachsen gut in serumfreiem Keratinozytenmedium, welches mit Wachstumsfaktoren,

Diskussion

Antibiotika und BPE (bovine pituitary extract) versetzt wurde (Dickson et al. 2000).

Die Inkubation mit den Bakterienextrakten wurde in verschiedenen Konzentrationen und zu zwei verschiedenen langen Inkubationszeiten durchgeführt. Hier hielten wir uns an einige Vorversuche, die ähnliche Ziele verfolgten, wie zum Beispiel in der Studie von Slawik et al., die ihren Probanden einen bestimmten Zeitraum lang probiotische Milch zu trinken gaben und dann die Entwicklung von bestimmten durch Plaque induzierten Entzündungsparametern in der Gingiva kontrollierten. Das Resultat dieser Studie ist, dass durch den täglichen Konsum von probiotischer Milch die Entzündung der Gingiva reduziert wurde, obwohl die Plaque-Ablagerung an den Zähnen durch den hohen Kohlenhydratgehalt der Milch erhöht war (Slawik et al. 2011).

Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und die Auswertungen an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt, damit statistisch valide Aussagen getroffen werden können.

Das humane beta-Defensin-2 gehört ebenfalls zu den sezernierten Peptiden von Zellen. Wie schnell die Produktion dieses fertigen Peptids in den Zellen allerdings vom Ablesen der DNA über die Translation der mRNA und Faltung bis hin zur Sekretion in die Überstände gelingt, ist unklar. Die Produktion bestimmter Zytokine kann außerdem vom Differenzierungsstand der Keratinozyten abhängig sein (Ansel et al. 1990). Es ist also möglich, dass unsere Keratinozyten zum Beispiel mehr mRNA gebildet haben, diese aber noch nicht translatiert wurde, oder dass die Proteine noch nicht sezerniert wurden, oder sich die Zellen in einem Differenzierungsstadium befanden, in welchem sie noch keine Reaktion auf die probiotischen Extrakte mit der Produktion von antimikrobiellen Peptiden zeigen.

Diskussion

Allerdings ist in den Ergebnissen ein Unterschied zwischen der Produktion an hBD-2 während des Wachstums ohne Stimulation der Zellen und dem stimulierten Zustand zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass in den Zellen entweder eine Reaktion stattgefunden haben muss, oder dass die Zellen in irgendeiner Weise in ihrer Produktion oder Vitalität beeinflusst wurden. Schlee et al. konnten 2008 allerdings in intestinalen Caco-2-Zellen nachweisen, dass hBD-2 sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig über den proinflammatorischen Signaltransduktionsweg induziert werden kann (Schlee et al. 2008).

Ob Vorstufen von Proteinen, das heißt zum Beispiel, wie oben erwähnt, mRNA's gebildet wurden, kann durch die ELISA-Methode nicht nachgewiesen werden (Stadnyk 1994). Da nur die Überstände verwendet wurden, kann auch nur eine Auskunft über sezernierte Proteine gegeben werden. Hinzu kommt die Frage, ob diese Proteine dann biologisch aktiv sind, weil sie erst richtig gefaltet sein müssen, um wirken zu können (Dobson et al. 1998).

Dies kann ebenso wenig mittels dieser Methode festgestellt werden. Es handelt sich hierbei lediglich um den Nachweis, ob in den Überständen mehr oder weniger Proteine nach Stimulation mit Bakterienextrakten vorhanden sind, als in den Proben ohne Stimulation.

Es handelte sich in unseren Experimenten um in vitro durchgeführte Versuche unter Bedingungen, die für diese Zelllinie günstig sind. Es kann von daher keine Aussage über die Wirkung von den Bakterienextrakten auf orale Keratinozyten in vivo gemacht werden, sondern ausschließlich über die Ergebnisse in vitro.

4.2. Ergebnisse

Anscheinend muss ein Bakterium, um eine probiotische Wirkung in der Mundhöhle entfalten zu können, an oralen Oberflächen anhaften und Teil des Biofilms werden (Wei et al. 2002). Es wurde herausgefunden, dass einige Wochen, nachdem die orale Gabe von Probiotika abgesetzt wurde, solche immer noch ausgeschieden und nachgewiesen werden konnten (Saxelin 1997). Dies scheint zu bedeuten, dass einige Probiotika zumindest wohl für eine Weile Bestandteil des oralen Biofilms werden können.

Die permanente Kolonisation von zum Beispiel L.GG in der Mundhöhle ist unwahrscheinlich, kann aber bei einzelnen Individuen möglich sein (Yli-Knuutila et al. 2006). Dies stellt einen möglichen Grund dar, dass in dem von uns geschaffenen Milieu in vitro, welches keinem oralen Biofilm gleicht, die probiotische Wirkung der Bakterienextrakte ausbleibt.

Die sekretorische Funktion der oralen Keratinozyten ist bisher außerdem noch wenig erforscht. Es muss deshalb auch bedacht werden, dass für orale Keratinozyten nicht die gleichen Funktionen und Reaktionen angenommen werden können, wie für dermale oder epitheliale Keratinozyten (Viol 2008).

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse ist festzustellen, dass sich die Konzentration an hBD-2 in den Überständen der Versuche mit steigender Bakterienextraktkonzentration um mehrere Pikogramm pro Milliliter verringert.

Wenn wir für 6 Stunden die oralen Keratinozyten mit L.s. stimulierten, erhöhte sich bei einer Zugabe von Bakterienextrakten zu Zellen im Verhältnis 1:1 die hBD-2-Konzentration. Es kann sein, dass die Bakterienextrakte hier ihre positive Wirkung, das heißt die Stimulation der hBD-2-Konzentration, zu Tage bringen konnten. Die oralen Keratinozyten haben hier auf die Bakterienextrakte reagiert und mehr hBD-2 gebildet. Jedoch ist es nur bei

Diskussion

diesem Konzentrationsverhältnis und nur bei der Stimulation mit dem Bakterienextrakt dieses Keims (L.s.) und bei einer Stimulationsdauer von nicht mehr als 6 Stunden zu einem solchen positiven Ergebnis gekommen. Hier könnte man sagen, dass die Bakterienextrakte von diesen probiotischen Keimen eine Steigerung der hBD-2-Konzentration hervorrufen. Dies wäre für die körpereigene Abwehr günstig und könnte ein Therapieziel darstellen (Wehkamp et al. 2008). Allerdings ist hier eher von einem Fehler auszugehen, da die anderen Versuchsergebnisse in die genau andere Richtung weisen.

Wenn hBD-2 gebildet wird, kann der Körper besser gegen pathogene Keime vorgehen. Als Resultat einer Entzündungsreaktion im Darm bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, welche vermutlich als Antwort auf die Besiedlung mit pathogenen Keimen verstärkt wird, konnten Wehkamp et al. nachweisen, dass deutlich vermehrt hBD-2 gebildet wird (Wehkamp et al. 2002). Es wird nämlich vermutet, dass die Entzündungsreaktion in der Darmschleimhaut bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, neben einer Fehlfunktion des Immunsystems, auch von einer Störung der Barriere der Schleimhaut abhängt (Wehkamp et al. 2008).

In einer Studie von Dommisch et al. war in Gingivitis-Proben die hBD-2-Konzentration immer höher, was darauf hinweist, dass dieses Defensin bei einer Entzündung vermehrt gebildet wird und somit die Schleimhautbarriere schützen soll (Dommisch et al. 2005).

Allerdings ist in unseren Ergebnissen deutlich zu sehen, dass die Steigerung der hBD-2-Konzentration durch Bakterienextrakte wahrscheinlich sehr empfindlichen Faktoren ausgeliefert ist. Zumindest findet nur zu genau diesen oben beschriebenen Konzentrationen von L.s. und für nicht mehr als 6 Stunden eine Produktionssteigerung statt (1:1, L.s., 6Std). Nach 24-stündiger Inkubation mit L.s. im Verhältnis 1:1 sinkt die hBD-2-Konzentration

Diskussion

zwar ab, jedoch ist es eine Überlegung wert, ob nicht kleinste Konzentrationsschwankungen an Bakterienextrakten eine Ursache dafür darstellen könnten oder ob ein Fehler in der Auswertung mittels ELISA oder bei der Versuchsdurchführung hier zu einer Abweichung führte. Da der Zeitfaktor mit einem p -Wert=0,1572 nämlich nicht signifikant ist, müssten hier eigentlich auch Konzentrationsanstiege zu sehen sein, so wie es nach 6-stündiger Inkubation der Fall ist.

Andererseits ist es wahrscheinlicher, dass der Anstieg nach 6-stündiger Inkubation eher die Ausnahme in den Ergebnissen darstellt, wie oben bereits erwähnt, weil die anderen Messungen jeweils absteigende Konzentrationen aufweisen.

Es ist natürlich denkbar, dass eher geringere Konzentrationen an Bakterienextrakten eine positive Bilanz in Bezug auf die hBD-2-Produktion hervorbringen könnten.

Möglich ist nämlich, dass die oralen Keratinozyten durch die höheren Konzentrationen an Bakterienextrakten in ihrer Produktion und sogar eventuell in ihrer Vitalität gestört sind.

Da es keinen erheblichen Unterschied zwischen einer Inkubation für 6 Stunden oder 24 Stunden mit beiden Bakterienstämmen gibt, kann man davon ausgehen, dass dies nicht der entscheidende Faktor für eine hBD-2-Produktion bei Stimulation mit Bakterienextrakten ist. Der Zeitfaktor ist mit dem oben genannten p -Wert auch nicht signifikant. Nur der Konzentrationsfaktor ist den Ergebnissen nach, mit einem p -Wert $<0,0001$, signifikant.

Wenn eine geringere Bakterienextraktkonzentration für einen Anstieg der hBD-2-Konzentration verantwortlich sein sollte, müsste man für verschieden lange Zeiten inkubieren, um genau sagen zu können, zu welchem Zeitpunkt

Diskussion

das Maximum an hBD-2-Produktion erreicht ist und ob der Zeitfaktor dann weiterhin nicht signifikant bleibt.

Bei der Stimulation mit L.GG ist in jeglichem von uns getesteten Konzentrationsverhältnis nach sowohl 6 als auch 24 Stunden eine Abnahme der hBD-2-Konzentration in Bezug auf die Kontrollwerte zu erkennen. Auch hier ist es möglich, dass die Bakterienextraktkonzentrationen für die Zellen zu hoch eingesetzt wurden. Die oralen Keratinozyten produzieren mehr hBD-2, wenn keine Extrakte von L.GG hinzugefügt wurden. Nach 6 Stunden und 24 Stunden nimmt die Konzentration an hBD-2 fast kontinuierlich ab. Nur bei einem Verhältnis von 1:100 und 24-stündiger Inkubation tritt ein etwas höherer Wert an hBD-2 auf, als bei den geringeren Verhältnissen (Zelle zu Extrakt 1:1 oder 1:10). Dies kann auch ein Hinweis in eine ganz andere Richtung sein, nämlich, dass eventuell von den Extrakten von L.GG eine höhere Konzentration nötig ist, aber eine viel längere Stimulationszeit. Andererseits ist bei einem Verhältnis von 1:1000 wiederum ein starker Abfall der hBD-2-Konzentration vorhanden, was eher für einen Fehler spricht.

Es kann sein, dass ein sehr feines Konzentrationsverhältnis von Extrakten zu Zellen in vitro nötig ist, so dass die Zellen die Produktion von hBD-2 steigern. Durch die Gabe von probiotischen Keimen sollen ja eher vermehrt körpereigene Antibiotika, Defensine, gebildet werden, um gegen pathogene Krankheitserreger vorgehen zu können. So stellt man sich vor, dass Defensine als Therapiemittel wirken können. Wehkamp et al. berichten darüber, dass schon ohne bisherigen Erfolg versucht wurde, Defensine künstlich herzustellen und dass ein anderer Weg eben die Induktion der hBD-2-Produktion über die Gabe von Probiotika darstellt. So gibt es z.B.: Mutaflor^R, ein Präparat, das den Keim *Escherichia coli* Nissle enthält und ein ausgezeichneter Stimulator für hBD-2 im Gegensatz zu anderen Probiotika, wie einige Laktobazillen (z.B.: VSL#3, ein Mix aus verschiedenen

Diskussion

probiotischen Keimen), welche hBD-2 schwächer induzieren, ist (Wehkamp et al. 2008).

Mögliche antikariogene Effekte, die Verhinderung von parodontalen Erkrankungen, positive Wirkungen auf Halitosis und den Befall von *Candida albicans* in der Mundhöhle sowie das Immunsystem modulierende Mechanismen wurden schon in etlichen Studien beschrieben (Flichy-Fernández et al. 2010).

L.GG war im Vergleich zu L.s., in Bezug auf die hBD-2-Konzentration, potenter. Der Konzentrationsabfall ist hier im Allgemeinen geringer. Dass die Bakterienstämme unterschiedlich starke Auswirkungen haben, konnte schon in anderen Studien mit verschiedenen probiotischen Keimen nachgewiesen werden (Schlee et al. 2008).

Nicht immer konnte man im Darmepithel auch nachweisen, dass sich die hBD-2-Konzentration durch Probiotika steigern lässt. So veränderte sich beispielsweise bei einer klinischen Studie durch die Gabe von Joghurt, der probiotische Keime enthielt, die hBD-2-Stuhlkonzentration nicht, jedoch die Konzentration von Antikörpern, hier zum Beispiel IgA, welches auch für die Abwehr von pathogenen Eindringlingen wichtig ist (Kabeerdoss et al. 2011). Dies belegt, dass die Keime an sich auch durch andere Teile der Immunabwehr probiotisch wirken können.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich Probiotika auch in Bezug auf atopische Erkrankungen günstig auf das Immunsystem auswirken, in dem sie die Profile von bestimmten Zytokinen verändern (Hauer 2002). Allerdings konnte auch hier nicht eindeutig gesagt werden, dass Probiotika tatsächlich und wie genau eine positive Wirkung ausüben. Werfel sagt, dass es eben keine Nachweise darüber gebe, dass oral applizierte Probiotika sich

Diskussion

günstig zum Beispiel in Bezug auf eine atopische Dermatitis auswirkten, wie in vorherigen Studien immer behauptet wurde (Werfel 2009).

Die Produktion des humanen beta-Defensins-2 kann unter anderem sowohl von proinflammatorischen Zytokinen als auch von bestimmten Bakteriensträngen induziert werden. Ein Beispiel hierfür ist der probiotische Bakterienstamm *Escherichia coli* Nissle 1917. In der hier maßgebenden Studie war auch der Überstand von Bakterien ausschlaggebend, also die Bakterienextrakte, nicht das Bakterium per se (Schlee et al. 2007). Daher haben auch wir unsere Versuche mit den Extrakten und nicht mit den lebenden Bakterien durchgeführt.

Wie schon beschrieben, sind auch andere Probiotika wie eben einige wenige Laktobazillen dafür bekannt, im intestinalen Epithelium die hBD-2-Konzentration zu steigern und damit das intestinale Abwehrsystem zu aktivieren, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Schlee et al. 2007, Schlee et al. 2008, Paolillo et al. 2009). Die Aktivierung dieses Systems wird wohl immer über die klassischen Signaltransduktionswege einer Entzündungsreaktion gehen (Schlee et al. 2008), denn die Induktion von hBD-2 im nicht entzündeten Epithel ist geringer, als im entzündeten Epithel (Dommisch et al. 2005).

Es können auch pathogene Erreger wie *Salmonella* ssp. und *Helicobacter pylori*, hBD-2 im Darm induzieren (Ogushi et al. 2001, Wehkamp et al. 2003).

Man hat herausgefunden, dass die probiotischen Laktobazillen, die die Fähigkeit haben, die hBD-2-Konzentration zu steigern, Gene codieren, die für bestimmte glykosylierte Zelloberflächenstrukturen verantwortlich sind (Ghadimi et al. 2011). Ob unsere Bakterienstämme, von denen die Bakterienextrakte abstammen, diese Zelloberflächenstrukturen besitzen und

Diskussion

ob diese bei den Bakterienextrakten eine Rolle spielen, wurde von uns nicht untersucht. Wenn diese Zelloberflächenstrukturen nur an der Zellmembran bleiben und von da aus wirken, würde dies darauf hinweisen, dass doch die Bakterienzellen an sich für die Stimulation verantwortlich sein könnten und nicht allein die Bakterienextrakte.

Die Bakterienextrakte von unseren beiden Bakterienstämmen sind, in den von uns zugesetzten Konzentrationen und zu den beschriebenen Versuchsbedingungen, nicht für einen Anstieg an hBD-2 zu gebrauchen. Sie verhinderten eher die hBD-2-Produktion.

Wie bereits erwähnt, untersuchten die meisten Studien die Epithelien der Darmschleimhaut. In Bezug auf die Mundschleimhaut, also orale Keratinozyten, sind erst wenige Informationen vorhanden. Welche therapeutischen Effekte sich daraufhin eventuell ergeben können, ist daher auch noch nicht komplett vorhersehbar.

Viele Autoren beziehen sich auch auf unterschiedliche Zellen und nicht immer nur auf Keratinozyten. Außerdem benutzen auch viele keine hergestellte Zelllinie, sondern vielmehr Zellen aus Gewebeproben. Die Versuchsbedingungen weichen von daher stark ab und man kann die meisten Studien nicht direkt miteinander vergleichen.

4.3. Schlussfolgerung

Man kann nicht davon ausgehen, dass allgemein alle probiotischen Bakterienextrakte die Immunantwort oraler Keratinozyten in Bezug auf das humane beta-Defensin-2 steigern können. Wie genau probiotische Keime wirken, kann sehr unterschiedlich sein und ist auch vom Wirkungsort im

Diskussion

Körper abhängig. Es gilt, dass ein probiotisches Bakterium im Mund nicht gleich ein orales Probiotikum ist.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass orale Keratinozyten auf probiotische Bakterienextrakte von *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus salivarius* reagieren und ihre Produktion an hBD-2 verminderten. Dieser Effekt ist, therapeutisch betrachtet, unerwünscht und sollte berücksichtigt werden. In vivo könnte eine Abwehr gegen pathogene Erreger vermindert sein. Da Probiotika allerdings auch auf andere Teile des Immunsystems, wie zum Beispiel auf die Konzentration von Interleukinen, reagieren, ist ein allgemein positiver Effekt der Bakterien in Bezug auf die Entzündungsreaktion nicht auszuschließen.

Dass probiotische Bakterien schädigende Wirkung haben können, ist bisher nicht nachgewiesen. Sie gehören zu den gesundheitsfördernden Mikroorganismen. Es muss allerdings noch viel auf dem Gebiet mit probiotischen Bakterien und oralen Keratinozyten oder anderen Zellen der Mundschleimhaut erforscht werden, um eine deutlichere Aussage über deren Wirkung sagen zu können.

Eine klare Aussage, die von dieser Arbeit abgeleitet werden kann, ist, dass die Extrakte von L.GG und L.s. , nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit der oralen Keratinozytenzelllinie OKF6/hTERT-2, zu einer fast kontinuierlichen Abnahme der Konzentration an humanem beta-Defensin-2 in den Überständen der Kulturflaschen führten. Vermutlich sind andere Konzentrationen oder Bedingungen für eine Stimulation der hBD-2-Produktion nötig oder hBD-2 lässt sich in oralen Keratinozyten nicht so gut induzieren, wie es im Vergleich zu den Studien von Schlee et al. in intestinalen Zellen der Fall war.

5 Zusammenfassung

Probiotische Bakterien weisen in etlichen Studien gesundheitsfördernde Wirkungen auf und werden heute auch immer mehr in der Industrie angewandt, um die Gesundheit des Menschen auf natürliche Weise zu stärken. Vor allem im Darmepithel konnte die Stärkung der körpereigenen Immunabwehr bewiesen werden. Diese Wirkungen beruhen hauptsächlich auf einer Aktivierung und der Stärkung des Immunsystems. Ist die endogene Bakterienabwehr gestört, scheint es schneller zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu kommen (Wehkamp et al. 2007). Probiotika wirken nicht direkt gegen andere Keime, aber indirekt über Signaltransduktionswege, indem sie beispielsweise die Produktion von Zytokinen anregen oder herabsetzen und damit Entzündungen entweder verhindern oder die körpereigene Abwehr steigern. In dieser Arbeit wurden Bakterienextrakte zweier typischer, probiotischer Keime verwendet und mit einer oralen Keratinozytenzelllinie inkubiert. Hier wurde ausschließlich die Wirkung auf die Produktion des humanen beta-Defensins-2 betrachtet. Die oralen Keratinozyten bilden ohne jegliche Stimulation hBD-2. Es gehört zur körpereigenen Abwehr und wird vom Körper als Schutz gegen pathogene Eindringlinge kontinuierlich gebildet. In entzündetem Gewebe wird die Produktion gesteigert.

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die oralen Keratinozyten angeregt werden, hBD-2 vermehrt zu bilden, wenn die Extrakte von probiotischen Keimen im Medium in bestimmten Konzentrationen und zu bestimmten Zeiten vorhanden sind.

Die Produktion an hBD-2 hat sich durch die Extrakte der beiden Keime (L.s. und L.GG) nicht steigern lassen. Sie wurde durch Anwesenheit dieser eher

Zusammenfassung

gesenkt. Für die Therapie bestimmter Erkrankungen im Mundbereich wäre ein Anstieg dieses Defensins eventuell sinnvoll gewesen.

Auszuschließen ist eine therapeutische Bedeutung durch probiotische Keime im oralen Gewebe aber natürlich nicht. Hier wurden ausschließlich zwei bestimmte Bakterienstämme getestet und nur die Bakterienextrakte verwendet. Es wurde außerdem eine reine Keratinozytenzelllinie untersucht. Andere mögliche Reaktionen sind unter anderen Bedingungen in vivo oder auch in vitro eventuell zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology, 6.Auflage, Saunders Elsevier, Philadelphia 2007, 27-28

Aderem A, Underhill DM (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593–623

Ahola AJ, Yli-Knuutila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, Korpela R (2002): Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol* 47, 799-804

Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S (1990): Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 94, 101S-107S

Bender R, Lange S (2007): Was ist der p-Wert? *Dtsch Med Wochenschr* 132, e15-e16

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995): hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368, 331-335

Bianchi ME (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5

Bicknell S, Eeden S van, Hayashi S, Hards J, English D, Hogg JC (1994): A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10, 16–23

Bonass WA, High AS, Owen PJ, Devine DA (1999): Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* 14, 371-374

Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A (2001): Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 36, 285-294

De Vrese M, Schrezenmeir J (2008): Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111, 1-66

Literaturverzeichnis

De Vrese M, Schrezenmeir J: Präventive Bedeutung von probiotischen Joghurts; in: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, hrsg. v. Bischoff SC, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 88-94

Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG (2000): Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* 20, 1436-1447

Dobson CM, Šali A, Karplus M (1998): Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie* 110, 908–935

Dommisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S (2005): Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 20, 186-190

Dotan I, Rachmilewitz D (2005): Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 426-430

Dransfield I, Stocks SC, Haslett C (1995): Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 85, 3264–3273

Dubach A: Wissenschaftliche Übersicht zu Lactobacillus GG. Emmi Schweiz AG, Emmen 2002, www.emmi.ch, abgerufen 2012

Eberhard J, Pietschmann R, Falk W, Jepsen S, Dommisch H (2009): The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 24, 325-330

Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9), 871-874.

Euzeby JP (1997): List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47, 590-592

Felis GE, Dellaglio F (2007): Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 8, 44-61

Literaturverzeichnis

Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M (2010): Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15 (5), 677-80

Ghadimi D, Hassan M, Njeru PN, de Vrese M, Geis A, Shalabi SI, Abdel-Razek ST, Abdel-Khair Ael-A, Heller KJ, Schrezenmeir J (2011): Suppression subtractive hybridization identifies bacterial genomic regions that are possibly involved in hBD-2 regulation by enterocytes. *Mol Nutr Food Res* 55(10), 1533-42

Hammes WP, Hertel C: The prokaryotes; in: *The Genera Lactobacillus and Carnobacterium*, 3. Auflage, hrsg. v. Dworkin M, Springer Verlag, New York 2006, 320-403

Harder J, Schroder JM (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277, 46779-46784

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861

Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM (2000): Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 714-721

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274), 458-60

Hauer AC (2002): Probiotika und Allergien. *Monatsschr Kinderheilkd* 150(7), 829-837

Haukioja A (2010): Probiotics and oral health. *Eur J Dent* 4, 348-355

Heitmann M, Bengs H (2010): Innovative Mikroorganismen, Naschen gegen Karies? Mikroorganismen machen es möglich. *BIOspektrum* 16, 700-701

Heller K: Pharmakokinetik und Sicherheit von Probiotika; in: *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*, hrsg. v. Bischoff SC, Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 88-94

Herbst H, Hübner JH (2003): www.pathologie-online.de, abgerufen Dezember 2012

Literaturverzeichnis

Hoffmann JA, Kafatos KC, Janeway CA (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313–1318

Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA (2004): *Anaesthesist* 53, 10–28

Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T (2005): Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell Microbiol* 7, 403-414

Kabeerdoss J, Devi RS, Mary RR, Prabhavathi D, Vidya R, Mechenro J, Mahendri NV, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS (2011): Effekt of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutr J* 10, 138

Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E (2001): Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107, 129-134

Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E (2003): Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871

Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41, 103-125

Karp G: Cell and Molecular Biology; in: *Molekulare Zellbiologie*, 4.Auflage; hrsg. v. Gerald Karp, Springer Verlag, Hollywood 2005, 630-633, 816-821, 870-873

Kneifel W, Domig KJ: Taxonomie von Milchsäurebakterien mit probiotischer Kapazität; in: *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*, 1; hrsg. v. Stephan C. Bischoff, Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 103-117

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M (2004): Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623

Landesbildungsserver Baden-Württemberg: www.natwiss.ph-karlsruhe.de/BIO/medien/mikroskopie/beispiele.html, abgerufen 2013

Literaturverzeichnis

Lange S (2000): Statistische Signifikanz und Klinische Relevanz. *Z Hautkr* 75, 225-229

Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage; hrsg. v. Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch, Thieme Verlag, Kiel 2006, 100, 102,342-344, 521-522, 271

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999): Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S

Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J (2001): Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73, 430S-436S

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr. (1999): Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67, 2740-2745

Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, Shimauchi H (2009): Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 36, 506-513

Merk K, Borelli C, Schaller M, Korting HC (2004): Use of *Lactobacillus* as a probiotic factor to treat urogenital and intestinal infections as well as to prevent and treat allergic diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 2, 752-757

Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH (2001): Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 35, 412-420

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994): Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368 (6473), 753-6

Literaturverzeichnis

Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T (2001): Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* 276 (32)

O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF (1999): Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163, 6718-6724

Ölschläger TA, Hacker J: Definition und Wirkmechanismen der Probiotika, Präbiotika und Synbiotika; in: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, 1; hrsg. v. Stephan C. Bischoff, Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 76-87

Ouwehand AC, Saxelin M, Salminen S (2004): Phenotypic differences between commercial *Lactobacillus rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* strains recovered from blood. *Clin Infect Dis* 39, 1858-1860

Paolillo R, Romano Carratelli C, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A (2009): Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. *Int Immunopharmacol.* 9 (11), 1265-71

Parlesak A: Bakterielle Erkennungsstrukturen und intestinale Barriere; in: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, 1; hrsg. v. Stephan C. Bischoff, Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 103-117

Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 100, 1171-1185

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001): Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183, 3770-3783

Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB (2004): Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127, 1474-1487

Plagmann HC: Anatomie, Histologie und Physiologie des Parodontiums; in: Lehrbuch der Parodontologie, Kieler Reprint, Kiel 1998, 9-10

Probiotics.org, abgerufen Dezember 2012

Literaturverzeichnis

Rheinwald JG: Human Keratinocyte Culture Methods. Harvard Medical School, Boston 2005

Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, Jarvinen A (2004): Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG. Clin Infect Dis 38, 62-69

Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr 80 Suppl 1, S147-171

Saxelin M (1997): Lactobacillus GG - a human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev Int 13, 293-313

Saxelin M, Pessi T, Salminen S (1995): Fecal recovery following oral administration of Lactobacillus strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. Int J Food Microbiol 25, 199-203

Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. (2007): Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is mediated through flagellin. Infect Immun 75 (5), 2399-407

Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. (2008): Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. Clin Exp Immunol 151 (3), 528-35

Schrezenmeir J, de Vrese M (2001): Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. Am J Clin Nutr 73, 361S-364S

Schroder JM, Harder J (1999): Human beta-defensin-2. Int J Biochem Cell Biol 31, 645-651

Schroeder HE: Orale Strukturbiologie. Thieme Verlag, Stuttgart 1992

Schulz WG: Einfluss unterschiedlicher Laktobazillus-Arten auf die experimentelle Vaginalkandidose durch C. albicans. Med. Diss. München 2008

Literaturverzeichnis

Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stieschand M, Eberhard J (2011): Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr* 65, 857-863

Stadnyk AW (1994): Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 8(13), 1041-1047

Stiles ME, Holzapfel WH (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36, 1-29

Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A (1995): Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55(14), 2988-94

Thepen T, Kraal G, Holt PG (1994): The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 725, 200–206

Tonegawa S (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581

Tonegawa S (1988): Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 8, 3–26

Viol B: Zytokinfreisetzung humaner oraler primärer Keratinozyten nach Stimulation mit oralen Bakterien und anderen entzündungsfördernden Agenzien. Med. Diss. Berlin 2008

Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF (2002): Human [beta]-defensin 2 but not [beta]-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14 (7), 745-752.

Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger KR, Baxmann S, Behling S, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K (2003): Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* 56 (5), 352-7

Wehkamp J, Bals R, Kreft B, Schröder JM, Stange EF (2007): Angeborene Immunabwehr Klinische Relevanz der endogenen antimikrobiellen Peptide in Innerer Medizin und Dermatologie. *Dtsch Arztebl* 104(5), 1

Literaturverzeichnis

Wehkamp J, Beisner J, Stange EF (2008): Defensine: Können wir sie in der Therapie einsetzen? *Bauchredner* 4, 71-75

Wei H, Loimaranta V, Tenovuo J, Rokka S, Syvaaja EL, Korhonen H, Joutsjoki V, Marnila P (2002): Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. *Oral Microbiol Immunol* 17, 9-15

Werfel T (2009): Inside-Out. *Der Hautarzt* 60 (10), 802-808

www.zahnaerztliche-chirurgie.blogspot.com, abgerufen 2012

Yli-Knuuttila H, Snall J, Kari K, Meurman JH (2006): Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 21, 129-131

Zasloff M (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395, auf www.nature.com, abgerufen 2012

Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM (2006): A microbial world within us. *Mol Microbiol* 59 (6), 1639-50

Literaturverzeichnis

7 Abbildungsverzeichnis

Graphik 1.1.1.	Schema Plattenepithel	2
Graphik 1.1.2.	Schema Mundschleimhaut	3
Graphik 1.1.2.1.	Bild von Mundschleimhautzellen unter einem Lichtmikroskop	4
Graphik 1.2.	Das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell	10
Graphik 2.1.	Prinzip des Sandwich-ELISA	26
Graphik 2.2.	96-well-Platte	27
Graphik 3.1.	Regressionsgerade des Standards	35
Graphik 3.2.	Balkendiagramme der ELISA-Ergebnisse	36

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.	Stimulativversuche	23
Tabelle 3.1.	Extinktionswerte (Rohdaten) für die Standardverdünnungsreihe	31
Tabelle 3.1.1.	Extinktionswerte (Rohdaten) der Proben	31
Tabelle 3.1.2.	Extinktionswerte und entsprechende Konzentrationswerte in pg/ml	33
Tabelle 3.2.	Berechnung der Standardwerte	34
Tabelle 3.3.	Drei-Faktorielle Repeated-Measures-ANOVA	40

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Nicolai Miosge bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, in der Abteilung Prothetik der Universität Göttingen unter seiner Betreuung zu promovieren.

Mirjam Mujakovic danke ich sehr herzlich, dass sie in jeder Lebenslage für mich da war und wir uns so gut gegenseitig unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau Sadowski und Frau Bode für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre liebevolle Art, die mir das Arbeiten im Labor zur Freude machten. Allen meinen Mitdoktoranden und der ganzen Arbeitsgemeinschaft im Labor möchte ich herzlich danken, dass mir immer jemand mit Rat und Tat zur Seite stand, für das angenehme Arbeitsklima und die produktive Zusammenarbeit.

Frau Wolf möchte ich sehr dafür danken, dass sie so geduldig bei den Auswertungen mit dem ELISA für mich da war.

Prof. Dr. Jörg Eberhard gilt ebenso mein Dank für seine unerlässliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch David Ellenberger, der mich so zuverlässig und geduldig in der Statistik unterstützte und für Fragen immer bereit und offen war.

Lebenslauf

Ich bin am 28. Oktober 1985 in Berlin-Zehlendorf als drittes Kind meiner Eltern Ellen Hellmann, geborene Tatzel, und Rudolf Hellmann geboren. Ich habe zwei ältere Brüder, Jasper Hellmann und Julian Hellmann-Regen.

1992 wurde ich in die Freie Waldorfschule Emil-Molt in Berlin eingeschult. Genau wie meine Brüder wechselte ich nach der sechsten Klasse auf die Droste-Hülshoff-Oberschule in Berlin. Hier absolvierte ich während der elften Klasse ein Austauschjahr in Avignon, Frankreich, auf dem Lycée Privée Louis Pasteur. Nach diesem Auslandsjahr konnte ich ohne Unterbrechung die Oberstufe der Droste-Hülshoff-Oberschule weiter besuchen und erlangte 2005 meine allgemeine Hochschulreife.

Nachdem ich drei Monate ein Pflegepraktikum in zwei verschiedenen Krankenhäusern in Berlin absolviert hatte, begann ich im Februar 2006 an der Universität Salzburg, Österreich, das Studium der Molekularen Biowissenschaften.

Im Sommer 2006 wechselte ich dann zum Studium der Zahnmedizin an die Georg-August-Universität Göttingen.

Hier legte ich 2009 die Zahnärztliche Vorprüfung und 2011 die Zahnärztliche Prüfung ab und erhielt im Dezember 2011 meine Approbation als Zahnärztin. Im Frühjahr 2011 ging ich mit den DWLF (Dentists without Limits Foundation) für eine Famulatur nach Süindien und arbeitete als Zahnärztin in Kinderdörfern. Bei diesen Projekten bin ich auch weiterhin aktiv.

Seit 2010 widmete ich mich neben dem Studium den Experimenten dieser Dissertation. Direkt nach der zahnärztlichen Approbation nahm ich mir einige Monate Zeit, um ausschließlich meine Arbeit zu schreiben. Anfang April 2012 zog ich wieder von Göttingen zurück nach Berlin und begann als Zahnärztin in einer Praxis meine Vorbereitungsassistentenzeit und bin dort momentan noch tätig.