

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

**Veränderungen der basal vorhandenen Menge an
Interleukin-8 in oralen Keratinozyten
nach der Stimulation mit probiotischen Extrakten aus
Lactobacillus rhamnosus und *Lactobacillus salivarius***

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

vorgelegt von
Mirjam Mujakovic
aus Kassel

Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Kroemer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Miosge
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Eiffert
3. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. dent. Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	11. September 2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE HAUT	1
1.2	AUFBAU UND FUNKTION MENSCHLICHER KERATINOZYTEN	2
1.3	DIE ANGEBORENE UND DIE ERWORBENE IMMUNANTWORT	6
1.4	DIE WIRKUNG PROBIOTISCHER BAKTERIEN AUF DEN MENSCHLICHEN ORGANISMUS	9
1.5	LACTOBACILLUS RHAMNOSUS UND SALIVARIUS	12
1.6	ZYTOKINE UND CHEMOKINE ALS MEDIATOREN DES IMMUNSYSTEMS	15
1.7	REGULATION DER ZYTOKINEXPRESSION	17
1.8	DIE BEDEUTUNG DER INTERLEUKINE IM ALLGEMEINEN UND DIE BEDEUTUNG VON INTERLEUKIN-8 IM SPEZIELLEN	17
1.9	BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	19
1.10	ZIELSETZUNG	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	VERWENDETER ZELLTYP OKF6/TERT-2	23
2.2	VERWENDETE BAKTERIENEXTRAKTE	24
2.3	ZELLKULTUR	24
2.4	VORVERSUCHE	26
2.5	STIMULATION DER OKF6/TERT-2-ZELLEN	28
2.6	PROTEINNACHWEIS MITTELS ELISA	30
2.6.1	INDIREKTER ELISA	31
2.6.2	SANDWICH-ELISA	32
2.6.3	KOMPETITIV-ELISA	33
2.7	TESTDURCHFÜHRUNG	34
2.8	LÖSUNGEN UND REAGENZIEN	38
3	ERGEBNISSE	41
3.1	BIOMETRISCHE AUSWERTUNG	41
3.2	AUSDRUCK DER P-WERTE	41
3.3	KONSTRUKTION DER STANDARDKURVEN MIT HILFE DER VERDÜNNUNGSREIHE	44
3.4	SIGNIFIKANZ DER EINZELNEN EFFEKTE, INTERPRETIERT ANHAND DER GEMESSENEN MENGE VON INTERLEUKIN-8	55
3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	56
4	DISKUSSION	59
4.1	ZELL- UND BAKTERIENKULTIVIERUNG	59
4.2	ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	61
4.3	AUSWERTUNG	62
4.4	EINFLUSS EINZELNER FAKTOREN AUF DAS VORHANDENSEIN VON IL-8	67
4.5	BEDEUTUNG DES ORALEN BIOFILMS	69

4.6	DAS KONZEPT FULL MOUTH DISINFECTION (FMD)	71
4.7	SCHLUSSFOLGERUNG	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	76

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
BPE	Bovine Pituitary Extract
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fc	Crystallisable fragment
FMD	Full Mouth Disinfection
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Zeit in Stunden
hBD-2	human Beta-Defensin-2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
Ig	Immunoglobulin
Il-x	Interleukin-x
kDa	Kilodalton
Ker-sfm	Keratinocyte-serum free medium
Ker-VM	Keratinozyten-Vollmedium
K	Kontrolle
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG

L.s.	Lactobacillus salivarius
m ²	Quadratmeter
MAC	Membrane Attack Complex
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OKF	Orale Keratinozytenzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Pikogramm
pH	potentia Hydrogenii
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
TGF	Transforming Growth Factor
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumor Necrosis Factor
U/ml	Enzymeinheiten pro Milliliter
upm	Umdrehungen pro Minute
Verd.	Verdünnung
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut bildet die äußere Schutzhülle des Körpers und ist beim Menschen das größte Organ des integumentalen Systems. Sie besteht aus mehreren Schichten ektodermalen Gewebes und schützt darunterliegende Strukturen wie z.B. Muskeln, Knochen, Bänder und innere Organe. Man unterscheidet die behaarte von der unbehaarten Haut (Marks und Miller 2006, Sverdrup et al. 2012). Sie bildet die Grenzfläche zur Außenwelt und spielt deswegen eine entscheidende Rolle, den Körper gegen Krankheitserreger, Fremdstoffe und übermäßigen Flüssigkeitsverlust zu schützen (Madison 2003, Proksch et al. 2008). Die Haut (Kutis) besteht aus einem epithelialen Teil, der Epidermis und aus einem bindegewebigen Teil, der Dermis. Die darunterliegende lockere Schicht aus Binde- und Fettgewebe wird als Unterhaut (Subkutis) bezeichnet. In ihrer Gesamtheit bilden die oberflächliche Haut und die Subkutis eine gemeinsame Funktionseinheit. Haare und Nägel sind Verhornungsprodukte, welche sich aus Hautanhangsgebilden der Epidermis zusammensetzen. Bei einem Erwachsenen bedeckt die Haut eine Fläche von ungefähr 2 m^2 . Die oberflächliche, sichtbare Struktur ist an verschiedenen Regionen unterschiedlich gestaltet und wird als Felder- bzw. Leistenhaut bezeichnet. Die Epidermis ist ein verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel und bildet die eigentlich schützende Schicht des Körpers und enthält keine Blutgefäße. Der bindegewebige Anteil der Haut dient zum Schutz gegen mechanische Reize und enthält terminale Blutgefäße. Beide Schichten sind durch zapfenförmige Fortsätze (Papillen) miteinander verzahnt, was als dermo-epidermale Verbindungszone bezeichnet wird (Lüllmann-Rauch 2006).

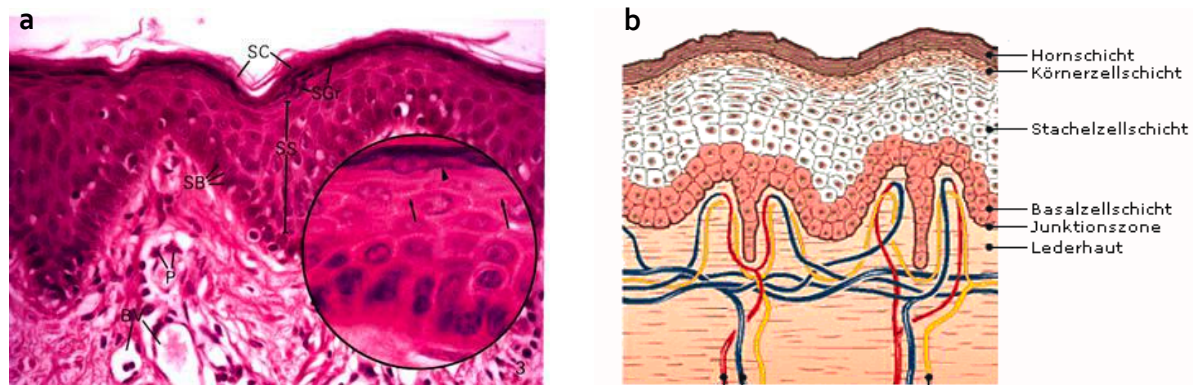


Abbildung 1: Aufbau der Epidermis

a) histologischer Querschnitt (Vergrößerung 320-fach, Ausschnitt 640-fach) (Kürschner 2007, S. 5)

SC Stratum corneum, SGr Stratum granulosum Arterie Vene Lymphgefäß, SS Stratum spinosum, SB Stratum basale, P Pigmentgranula, BV Blutgefäße

b) schematischer Querschnitt (Kürschner 2007, S. 5)

1.2 Aufbau und Funktion menschlicher Keratinozyten

Keratinozyten gehören zu den wichtigsten Zelltypen der Haut und bilden mit 90 % den Hauptanteil des vorherrschenden Zelltyps in der Epidermis. Sie sind deshalb für die Forschung von besonderem Interesse und häufig Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten (Kürschner 2007, Dietrich 2005, Lotz 1995). Im Mittelpunkt der Forschung stehen besonders die Untersuchungen mit kontinuierlichen Keratinozytenzelllinien mit einer hohen Proliferationsrate (Baron et al. 2001, Horn et al. 2009, Enk et al. 1996, Papaioannou et al. 1999). Es ist von großer Bedeutung, mit welcher Geschwindigkeit die Zellen wachsen und sich durch Teilung vermehren. Innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen des menschlichen Organismus gibt es große Unterschiede in der Schnelligkeit ihres Wachstums und ihrer Proliferationsrate (Lang und Lang 2007). Die menschliche Epidermis besteht aus vier Schichten. Vitale Keratinozyten befinden sich in den drei unteren Schichten, tote Hornzellen befinden sich in der obersten Schicht. Nach deren Abschilferung rücken ständig neue Zellen aus den tieferen Schichten der Epidermis nach. Es findet eine kontinuierliche Zellwanderung von den tieferen Schichten (basal) zur Oberfläche hin (superfizial) statt. Dieser Prozess wird koordiniert durch *gap junctions*, sogenannte Kommunikationskontakte, über welche die benachbarten Zellen durch das Passieren von Ionen oder kleineren Molekülen miteinander kommunizieren können. Innerhalb dieser Wanderung erfolgt eine

Differenzierung der Keratinozyten (aus dem Griechischen *kéras*, Genitiv *kératos* = *Horn*) bis hin zum eigentlichen Ziel: Der Hornzelle. Denn erst durch die Bildung dieses Zelltyps kann der Haut die entscheidende Rolle der mechanischen und chemischen Schutzfunktion zugeschrieben werden (Lüllmann-Rauch 2006). Auf histologischen Querschnitten der Epidermis ist eine Schichtbildung zu erkennen, welche dadurch zustande kommt, dass Zellen innerhalb einer Höhe den gleichen Differenzierungsgrad aufweisen. An die Basallamina grenzt das Stratum basale (Basalzellschicht), eine Schicht prismatischer Zellen, die für den ständigen Zellnachschub ausschlaggebend ist. Nur innerhalb dieser Schicht findet Zellteilung statt. Hemidesmosomen gewährleisten den Verbund der Keratinozyten mit der Basallamina und Desmosomen die Verankerung der Zellen untereinander. Das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) besteht aus bis zu fünf Zelllagen polygonaler Zellen. Die Zellen, welche das folgende Stratum granulosum (Körnerzellschicht; umfasst ungefähr drei Schichten) bilden, beinhalten histologisch erkennbare Keratohyalin granula, welche bei dem im Stratum corneum (Hornschicht) folgenden Verhornungsprozess von Bedeutung sind. In üblichen histologischen Präparaten ist die Hornschicht nur noch sehr schlecht erhalten und lichtmikroskopisch lassen sich nur in seltenen Fällen Zellen erkennen. Die Zellen dieser Schicht weisen eine polygonale Form auf, sind platt und haben weder Zellkern noch Zellorganellen. Die Zeit für einen Keratinozyt innerhalb der Epidermis, von seiner Neuentstehung im Stratum basale bis zur Abschilferung im Stratum corneum beträgt ungefähr acht Wochen. Ungefähr die Hälfte der Zeit verbringt der Keratinozyt als Hornzelle im Stratum corneum. Die Verhornung kann stattfinden, weil innerhalb der Differenzierung in den noch vitalen Zellen Syntheseprodukte entstehen, durch welche der Prozess erst möglich gemacht wird (Horn et al. 2009). Von entscheidender Bedeutung ist unter anderem das Auftreten des großen Proteins Profilaggrin im Stratum granulosum. Durch dieses Protein aggregieren Zytokinfilamente stellenweise, diese Bereiche treten lichtmikroskopisch als Keratohyalin granula in Erscheinung. Durch die Zytokeratinfilamente und Desmosomen entsteht ein Netzwerk, welches in der Lage ist, Zugkräfte zu übertragen. Im Stratum corneum kommt es durch Spaltung des Profilaggrins zu kleineren Filaggrin-Monomeren, diese haben die vollständige Aggregation der Zytokeratinfilamente zur Folge. Disulfidbrücken vernetzen die Filamente und es entsteht das mechanisch und chemisch widerstandsfähige Material Keratin.

Jede einzelne Zelle wird umgeben von einer flexiblen Schicht aus Proteinen und Lipiden (*cornified envelope*), was eine hohe chemische Resistenz gewährleistet. Aufgrund der Beschaffenheit des Keratins schützt das Stratum corneum in gewissem Maße auch gegen Säuren, weniger gegen Laugen. Für die Funktion der Epidermis als Diffusionsbarriere ist außerdem das Vorhandensein von *tight junctions* von großer Bedeutung. Wenn die Funktion der Schlussleisten gestört ist, kann es zu einem unkontrollierten transepidermalen Flüssigkeitsverlust kommen.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich ausschließlich auf die Untersuchung und Darstellung der Haut als solche und deren Bedeutung in der Mundhöhle. Die gesamte Schleimhaut der Mundhöhle besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel. Innerhalb bestimmter Regionen kann diese verhornt oder unverhornt auftreten.

Den Übergang von der meist parakeratinisierten unverschieblichen Schleimhaut zur unverhornten verschieblichen Schleimhaut bezeichnet man als mukogingivale Grenzlinie (Lüllmann-Rauch 2006). Die epithelialen Zellen im oralen Bereich bilden somit die erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen und gegen bakterielle Infektionen (Viol 2008, Zhang J et al. 1999). Die Epithelverbände spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr des Wirtes (Ansel et al. 1990).

Bei Keratinozyten handelt es sich um äußerst aktive Zellen. Sie spielen eine entscheidende Rolle innerhalb der unspezifischen Abwehr und der Kommunikation mit Abwehrzellen. Nach neueren Forschungsergebnissen wird die physiologische Mundhöhle von geschätzten 700 Bakterienarten besiedelt, unter normalen Bedingungen treten trotz Besiedelung keine Krankheitszeichen auf. Sie stellen somit die gesunde Mundflora dar. Immer wieder werden bei der Nahrungsaufnahme neue Keime zugeführt. Das immunologische System hat jetzt die Aufgabe, die Mundhöhle vor einer Kolonisation zu schützen und damit die Aufnahme bestimmter pathogener Keime in die Standflora zu verhindern. Zu den Leitkeimen gehören Streptokokken, Staphylokokken, Corynebakterien und Neisserien. Gramnegative Keime sind Bacteroides, Prevotella, Fusobakterien, Porphyromonas, Leptotrichia und andere. Actinomyces und Lactobacillen gehören zu den grampositiven Besiedlern.

Die metabolische Aktivität der Bakterien kann durch die Nahrungsaufnahme verändert werden. Herrschen außerdem pathologische Bedingungen (etwa durch eine schlechte Mundhygiene, Immunstörungen, Diabetes oder Antibiotikabehandlung), kann das Gleichgewicht innerhalb der verschiedenen Keime hin zu nur einem Keim verschoben werden und zu einer opportunistischen Infektion führen. Dabei kommt es zu einem zahlenmäßigen Überwiegen bestimmter Keime, die eine gewisse Pathogenität entwickeln (Thomas et al. 2010). Die oben beschriebene schützende Funktion des Epithels ist somit nicht die einzig wichtige, auch werden der Sekretion und der Absorption besondere Bedeutung zugeschrieben. Die Funktion der Keratinozyten besteht also darin, während der anfänglichen Phase einer Entzündung Botenstoffe zu sezernieren. Die Botenstoffe (Mediatoren) sind essentiell für einen Organismus, sie locken andere Zellen an den Ort des Geschehens und dienen somit der chemischen Kommunikation. Keratinozyten sind somit z.B. in der Lage, durch die Sekretion von Zytokinen auf bestimmte Umwelteinflüsse zu reagieren. Außerdem wird ihnen durch die Produktion der Zytokine ermöglicht, auch ihr eigenes Wachstum zu steuern (Koster 2009, Rheinwald und Green 1977, Stadnyk 1994).

Die Keratinozyten können parakrin sowie autokrin aktiviert werden und sind in der Lage, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β und Kolonie-stimulierende-Faktoren wie GM-CSF zu sezernieren (Kupper 1990, Owsianowski et al. 1991). Außerdem können die Zytokine auch der Inhibition der Keratinozytenproliferation dienen. Die Keratinozyten sind in der Lage, in das Netzwerk der Zytokine einzugreifen und durch bestimmte Stimuli die Wirtsantwort zu steuern. Sie können z.B. die Synthese von Typ-1-artigen T-Lymphozyten-Produkten fördern und zur gleichen Zeit die der Typ-2-artigen T-Zellprodukte hemmen (Viol 2008, Williams und Kupper 1996).

1.3 Die angeborene und die erworbene Immunantwort

Beim menschlichen Körper unterscheidet man zwischen der unspezifischen angeborenen und der spezifischen erworbenen Immunantwort. Beide induzieren Vorgänge zur Abwehr eingedrungener Mikroorganismen oder fremdartiger Makromoleküle. Sie existieren nicht als einzelne, unabhängig voneinander funktionierende Systeme, sondern sind eng miteinander verzahnt und müssen stets gemeinsam betrachtet werden. Zu den Mikroorganismen zählen Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, welche allgemein als Antigene bezeichnet werden. Auf diese Antigene reagiert das spezifische Immunsystem mit der Aktivierung und einer vermehrten Bildung von Abwehrzellen, den antigenspezifischen T- und B- Lymphozyten (T- bzw. B-Zellen). Nach der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen setzen diese antigenspezifische Proteine frei, welche als Antikörper oder auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Durch diese Immunglobuline (Ig) werden die Antigene neutralisiert, opsonisiert und das Komplementsystem aktiviert. Die Erkennung des vorliegenden Antigens ist somit hochspezifisch, dessen Eliminierung wird von Akteuren der unspezifischen Abwehr vorgenommen. An dieser Stelle sei außerdem das immunologische Gedächtnis erwähnt, welches das eliminierte Antigen in Erinnerung behält. Die sich erinnernden Zellen werden als T- und B-Gedächtniszellen bezeichnet. Durch diesen Vorgang wird gewährleistet, dass bei wiederholtem Eindringen eines bereits eliminierten Antigens schneller reagiert werden kann und die spezifische Ig-Produktion schlagartig einsetzt. Die T-Zellen werden bis zu ihrer Prägung im Thymus als lymphatische Vorläuferzellen bezeichnet. Gleiches gilt für die B-Zellen, deren Prägung im Knochenmark erfolgt. Erst nach diesem Vorgang besitzen die Zellen Antigenrezeptoren und sind nur noch monospezifisch, das heißt sie sind nur noch gegen ein spezifisches Antigen gerichtet. Bis zu ihrem Kontakt mit dem Antigen bewegen sie sich im Organismus (im Blut, im lymphatischen Gewebe oder in der Lymphe) und werden als „naiv“ bezeichnet. Der erste Antigenkontakt erfolgt häufig in einem peripheren lymphatischen Gewebe, was zu einer klonalen Selektion und Proliferation führt. Die Eliminierung des Antigens wird durch die aktivierten T-Zellen bzw. Plasmazellen eingeleitet. Einige Lymphozyten besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren gegen körpereigenes Material, diese müssen frühzeitig im Thymus oder Knochenmark eliminiert werden. Das Immunsystem eines Organismus lernt bereits zum Zeitpunkt der Geburt zwischen körpereigenen und fremden Stoffen zu unterscheiden.

Kann der Körper dieses nicht, entstehen Autoimmunerkrankungen. Das verdeutlicht, dass die Immunantwort nicht nur als biologisches Abwehrsystem anzusehen ist, sondern gleichfalls ein überaus wichtiges Unterscheidungsvermögen aufweisen muss. Bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen darf es keine körpereigenen Gewebe zerstören und muss 10^4 unschädliche Symbionten dulden (Silbernagl und Despopoulos 2006, Rassow et al. 2008).

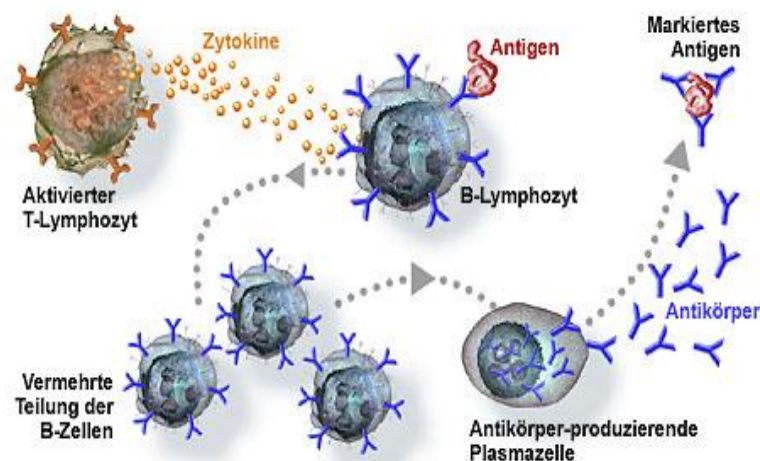


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Immunantwort
http://www.nhl-info.de/infopool/images/Immunantwort_2.jpg

Zur angeborenen (unspezifischen) Immunantwort gehören Vorgänge, die von Geburt an gegen pathogene Krankheitserreger eingeleitet werden können, ohne dass dies weiterer Entwicklung bedarf. Zu diesem Zeitpunkt stehen also bereits alle Mechanismen zur Abwehr bereit und werden z.B. beim Kontakt mit Bakterien ohne Verzögerung aktiv. Meist sind es die Körperoberflächen, an welchen es zum ersten Kontakt zwischen Fremdorganismus und körpereigenem Gewebe kommt. Wie oben bereits erwähnt, umfasst die äußere Oberfläche der Haut ungefähr 2 m^2 , die Oberflächen des Atmungs- und Verdauungsapparats hingegen jeweils über 100 m^2 . Dies erklärt die Bedeutung des Immunsystems, nämlich die uneingeschränkte Überwachung der genannten Flächen. Gleichzeitig muss die Abwehr die 10^{14} im Verdauungstrakt vorkommenden symbiontischen Bakterien ignorieren. In einigen Fällen kommt es zur Interaktion zwischen Komponenten der angeborenen Abwehr und Teilen des erworbenen Immunsystems. Hierzu zählen z.B. die Faktoren des angeborenen

Komplementsystems, oder aber auch die natürlichen Killerzellen, die oftmals mit Teilen des erworbenen Systems kooperieren. Das aus Glykoproteinen bestehende Komplementsystem trägt Antikörper-abhängig oder -unabhängig zur Abwehr bei und „komplementiert“ damit deren Aktivität. Die ungefähr 30 in der Leber gebildeten Proteine sind im Serum zu jeder Zeit enthalten und deren Aktivierung kann über unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Die erste Möglichkeit ist die Aktivierung auf dem klassischen Weg. Diese geschieht Antikörper-abhängig über Erreger, die mit Ig opsonisiert sind (Svedmyr und Jondal 1975). Durch die Komplementproteine C3a, C4a und C5a werden baso- und eosinophile Granulozyten aktiviert. C5 bis C9 bilden einen Membranangriffskomplex (MAC; *Membrane Attack Complex*), der zur Perforation der Bakterienwand führt und somit in der Lyse des Pathogens resultiert. Der alternative Weg beschreibt die Antikörper-unabhängige Aktivierung, also durch nicht-opsonisierte Erreger (Sims und Wiedmer 1995). Das Protein C3b bindet hierbei an die Oberfläche eines beliebigen Organismus oder Fremdkörpers. Sobald es Kontakt hat, wird C3b als Ester gebunden und löst entweder durch die Bildung von MAC eine Perforation aus oder durch Opsonisierung das Signal zur Phagozytose. Die beiden folgenden Möglichkeiten zur Aktivierung des Komplementsystems sind vor allem bei entzündlichen Reaktionen durch Bakterien von Bedeutung. Dabei aktiviert das Mannose-bindende Lektin Antikörper-unabhängig den klassischen Weg, indem es an bestimmte Kohlenhydrate der Bakterienoberfläche bindet (Fraser et al. 1998).

Als vierte und letzte Möglichkeit der Aktivierung wird an dieser Stelle das C-reaktive Protein (CRP) aufgeführt, welches bevorzugt an Lipopolysaccharide der Mikroorganismen bindet und C1q rekrutiert und es erfolgt ebenfalls die Antikörper-unabhängige Aktivierung über den klassischen Weg. Sobald eine Infektion eingesetzt hat, beginnt die Leber mit verstärkter Sezernierung der Glykoproteine, welche dann auch als Akute-Phase-Proteine bezeichnet werden. Hierbei ist der schnelle Anstieg von CRP von besonderer Signifikanz und wird aufgrund dessen als wichtiger Parameter entzündlicher Vorgänge eingesetzt (Clyne und Olshaker 1999). Die Entzündungsmediatoren wirken als Chemokine und rekrutieren Fresszellen (Makrophagen) und neutrophile Granulozyten an den Ort des Geschehens, außerdem kommt es zu der Freisetzung von Histamin (Ljunggren und Karre 1990).

Die Mechanismen der erworbenen (spezifischen) Abwehr stehen nicht von Geburt an bereit, sondern entwickeln sich erst nach dem ersten Kontakt mit dem Pathogen. Die Reaktion findet dementsprechend mit Verzögerung statt, dann allerdings mit sehr hoher Spezifität (z.B. durch die Bildung spezifischer Antikörper). Das angeborene Immunsystem ist Bestandteil aller höheren Organismen, wohingegen es ein adaptives Abwehrsystem nur bei Wirbeltieren gibt. Die außerordentliche Vielfalt innerhalb der Genome einzelner Leukozyten ermöglicht, dass zu fast jeder denkbaren Erscheinungsform eines Pathogens ein passender Antikörper entwickelt wird. Insgesamt kommt man auf etwa 10^{11} verschiedene Antikörper, die ein menschlicher Organismus bilden kann. Diese Menge entsteht durch somatische Neuordnung genetischen Materials. In speziellen Situationen muss ein bestimmter Antikörper erkannt und in größerem Maße produziert werden. Die erworbene Immunreaktion wird in erster Linie durch die schon weiter oben erwähnten T- und B- Zellen vermittelt. B-Zellen bilden spezifische Antikörper, zytotoxische T-Zellen vom Typ CD8 töten infizierte Zellen, T-Helferzellen vom Typ CD₄/T_{H2} aktivieren B-Zellen, und T-Helferzellen vom Typ CD₄/T_{H1} aktivieren Makrophagen (Campanelli et al. 2002). Alle genannten Vorgänge verlaufen antigenspezifisch. Eindringene Erreger werden zunächst durch das angeborene Immunsystem bekämpft, da die Aktivierung der erworbenen Abwehr einige Tage in Anspruch nimmt. Aufgrund dessen wird die adaptive Abwehr auch als verzögerte Immunantwort bezeichnet. Das Phagozytieren des Pathogens erfolgt durch sogenannte dendritische Zellen. Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens wird durch die Bildung von Gedächtniszellen eine Immunität gegen eine erneute Infektion gewährleistet (Strieter et al. 1995, Bazan et al. 1997, Pan et al. 1997, Rossi und Zlotnik 2000, Zlotnik und Yoshie 2000, Fernandez und Lolis 2002, Allen et al. 2007).

1.4 Die Wirkung probiotischer Bakterien auf den menschlichen Organismus

Laut der 2001 veröffentlichten Definition der Food and Agriculture Organization (FAO) und der *World Health Organization* (WHO) sind Probiotika: „lebende Mikroorganismen, die, wenn in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen bringen“ (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_

management/en/probiotics.pdf, 06.01.2013). Die Herkunft des Wortes ist eine Zusammensetzung der lateinischen Präposition pro („für“) und dem griechischen Adjektiv βιωτικός (biotisch), letzteres abstammend von dem Nomen βίος (bios, „Leben“). Es wird mittlerweile seit mehr als 30 Jahren in dieser gemeinsamen Form genutzt (Hamilton-Miller et al. 2003). Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts glaubte man, dass Probiotika einen positiven gesundheitlichen Effekt auf den Wirtsorganismus ausüben, indem sie Pathogene und toxinbildende Bakterien hemmen und damit die intestinale mikrobielle Balance fördern. Gegenwärtig sind einige gesundheitliche Effekte erforscht und dokumentiert. Sie beschreiben z.B. eine Linderung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die Prävention und Behandlung pathogen induzierter Diarrhoen, urogenitaler Infektionen und atopischer Erkrankungen (Mach 2006, Yan und Polk 2006, Reid 2008, Vanderhoof 2008). Lebende probiotische Kulturen sind als fermentierte Milchprodukte und als Lebensmittel, welche mit probiotischen Bakterien versetzt wurden, erhältlich. Außerdem gibt es sie in Form von Tabletten, Kapseln oder Pulvern, welche die Bakterien in gefriergetrockneter Form enthalten. In den individuellen Produkten können einzelne Monokulturen, aber auch bis zu neun gemischte Spezies verwendet werden. Die mit zusätzlichen Stoffen versetzten Nahrungsmittel, welche einen positiven gesundheitlichen Nutzen haben sollen, werden auch als Functional Food bezeichnet. Viele andere u.a. umweltbedingte Faktoren sind allerdings ebenfalls in der Lage, einen Effekt auf das mikrobiologische Milieu im Darm auszuüben. Hierzu zählen z.B. eine schlechte Ernährung, Stress, Medikamente, oder auch das Alter und die allgemeinen Lebensgewohnheiten (Gibson und Fuller 2000). Insbesondere die Epithelien des Nasen-Rachen-Raumes und des Magen-Darm-Traktes sind mikrobiell besiedelt. Diese Besiedlung hat zunächst keine pathologische Bedeutung und wird als physiologisch bezeichnet. In den unterschiedlichen Regionen des Wirtes bilden sich bestimmte Kolonien heraus, welche dann für ihren Standort spezifisch sind. Die mikrobiellen Erreger sind in der Lage, sich zu sogenannten „Biofilmen“ zu organisieren und an den Oberflächen zu haften (Hall-Stoodley et al. 2004, Fux et al. 2005). In der Mundhöhle kommt die aufgenommene Nahrung das erste Mal mit den Schleimhäuten in Kontakt. Die Mundhöhle ist feucht, warm, hat ein günstiges Redox-Potential und weist mit einem pH-Wert von 6,0 - 7,8 ein günstiges Milieu für Bakterien auf.

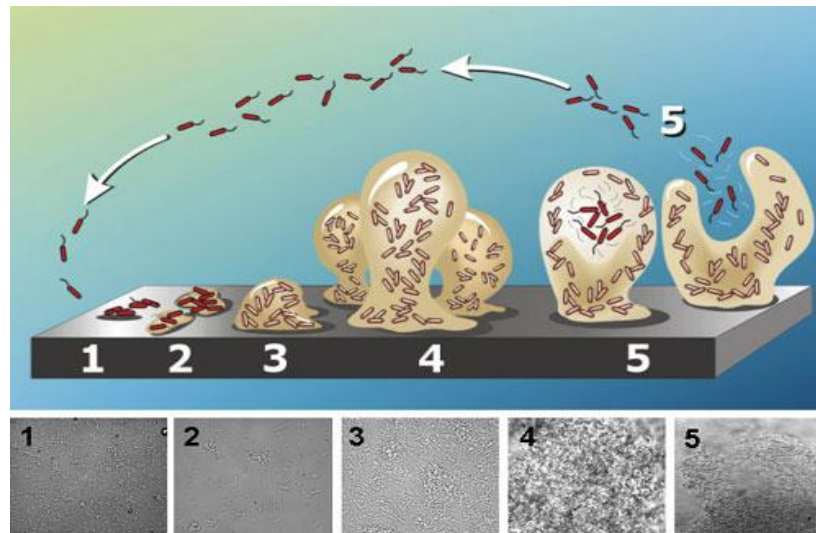


Abbildung 3: Die fünf Stadien der Biofilmentwicklung. 1. Initiale Anlagerung, 2. Irreversible Anlagerung, 3. Erste Reifung, 4. Zweite Reifung, 5. Streuung (<http://2011.igem.org/wiki/images/1/17/Biofilmdevelopment.jpg>)

Zusammenfassend kann man sagen, dass probiotische Bakterien einen immunmodulierenden Effekt auf den menschlichen Organismus ausüben. Dies kommt durch den antagonistischen Effekt von Probiotika gegen Pathogene zustande. Studien widerlegen jedoch die Annahme, dass die genannte Wirkung auf alle probiotischen Stämme angewendet werden kann. Dementsprechend ist es von besonderer Bedeutung, die Wirkung jedes einzelnen Bakteriums zu prüfen. Manche Stämme produzieren große Mengen an keimabtötender Milchsäure und sind deswegen antimikrobiell. Andere produzieren spezifisch wirkende Bakteriozine oder andere antimikrobielle Substanzen (Schulze et. al. 2008, Goldin und Gorbach 2008, Kirjavainen et al. 2003). Eine indirekte Wirkung der Probiotika kann über die Beeinflussung des Ökosystems vermittelt werden. So kann z.B. durch Säureproduktion der pH-Wert abgesenkt werden oder durch Sauerstoffzehrung eine Redox-Potenzialabsenkung stattfinden. Außerdem kann die indirekte Hemmung der enteropathogenen Mikroorganismen auch eine Folge der Stimulation der körpereigenen Defensinproduktion in den Epithelzellen durch Probiotika sein (Hamilton-Miller 2003). Diese antimikrobiellen Peptide sind z.B. hoch konzentriert im Darmschleim vorhanden und sie sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr (Donadio et al. 2007).

Generell lassen sich drei Wirkmechanismen probiotischer Bakterien beschreiben:

1. Die probiotische Wirkung kann einen direkten Effekt auf andere Mikroorganismen ausüben. Dies ist bei der Prävention und der Therapie durch Mikroorganismen verursachter Krankheiten bedeutend.
2. Durch ihre immunmodulierende Wirkung auf das angeborene und erworbene Abwehrsystem spielen Probiotika eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Entzündungsreaktionen und bei der Prävention von Infektionen.
3. Außerdem üben sie eine Wirkung aus auf mikrobielle Produkte (z.B. Toxine), Wirtsprodukte und Nahrungsbestandteile (Bischoff 2009).

1.5 *Lactobacillus rhamnosus* und *salivarius*

Am bekanntesten sind die Probiotika aus der Gruppe der Milchsäurebakterien, Spezies der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*. Innerhalb der Gattung der gram-positiven *Lactobacillaceae* gibt es 80 Arten und 15 Unterarten (Prakash et al. 2011). Andere Quellen berichten von mehr als 100 Arten (Euzeby 1997, Wallace et al. 2011). Laktobazillen sind in der Umwelt weit verbreitet und kommen vorwiegend in biologischen Nischen vor, innerhalb derer ein niedriger Sauerstoffpartialdruck herrscht. Dort finden sie lösliche Kohlenhydrate, Proteinabbauprodukte und Vitamine vor, die sie für ihre Stoffwechselvorgänge nutzen können. Innerhalb des menschlichen Körpers finden sich diese Nischen im Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt. Ansonsten zählen Lebensmittel (Gemüse, Früchte, Milchprodukte), Pflanzen und Abwässer zu ihren Lebensräumen. Die einzelnen Unterarten der Gattung haben sich dementsprechend an die unterschiedlichen Bedingungen ihrer Habitate angepasst. Generell führt die Produktion von Milchsäure zu einer Absenkung des pH-Wertes, wodurch das Wachstum anderer Organismen gehemmt oder wenigstens reduziert wird. Laktobazillen besitzen eine Reihe von relevanten, gesundheitsfördernden Eigenschaften, welche den Wirtsorganismus positiv beeinflussen können. Das macht die Besonderheit probiotischer Bakterien aus (Bischoff 2009, Bondarenko 2006). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), ein Stamm von *L. rhamnosus*, wurde 1983 aus dem Intestinaltrakt eines gesunden Erwachsenen von Sherwood Gorbach und Barry Goldin isoliert. Die Buchstaben GG bezeichnen dabei die Anfangsbuchstaben der beiden Nachnamen (Silva et al. 1987). Laborversuche bestätigen die Linderung oder Prophylaxe von Diarrhoen, vor allem bei der Verabreichung von Laktobazillen (Gourbeyre et al. 2011). Aufgrund der vielen

veröffentlichten und fundierten Ergebnisse zu der gesundheitsfördernden Wirkung von LGG war es naheliegend, sich auch in der vorliegenden Fragestellung für die Arbeit mit diesem Probiotikum zu entscheiden. Die Auswahl der sonst getesteten probiotischen Mikroorganismen ist sehr klein. Die Wirkung von *Lactobacillus rhamnosus* GG wurde in Bezug auf 15 verschiedene Krankheitsbilder untersucht und wirkte diesen dabei in den meisten Fällen entgegen (Salminen MK et al. 2004, Salminen MK et al. 2002).

Lactobacillus salivarius (L.s.) gehört auch zu den gram-positiven Milchsäurebakterien. Zu seinen natürlichen Habitaten zählen der Mund- und Rachenraum, der Intestinal- und Vaginaltrakt. Zur Prävention von Infektionen durch andere Mikroorganismen wird es außerdem als Probiotikum verwendet. *L. salivarius* ist fakultativ anaerob, das heißt er kann in An- oder Abwesenheit von Sauerstoff wachsen. Er ist ein einzigartiges Bazillus unter den Probiotika; er ist außerordentlich fähig, sich auch unter sehr schlechten Bedingungen zu entwickeln. Er gehört z.B. auch zu den wenigen, die gegenüber hohen Salzkonzentrationen resistent sind (Charteris et al. 2000). Dieses macht *L. salivarius* zu einem idealen Probiotikum, um die Anzahl an unerwünschten bzw. pathogenen Darmbakterien zu reduzieren. Das Bakterium ist moderat hitzetolerant, doch erfolgt dessen Lagerung auf lange Sicht nicht gekühlt, sterben eine hohe Anzahl der Zellen und verlieren an Effektivität (Gardiner et al. 2000). Bei der Wirkung von *L. salivarius* im Intestinaltrakt konnte außerdem gezeigt werden, dass es präventiv gegenüber Entzündungsreaktionen wirkt. Das Maß einer vorliegenden Entzündung kann anhand der von Immunzellen gebildeten proinflammatorischen Substanzen (Zytokine) bestimmt werden (McCarthy et al. 2003, Peran et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Bakterienextrakten gearbeitet. Auch abgetötete probiotische Bakterien können einen präventiven bzw. therapeutischen Effekt hervorrufen und zwar durch Moleküle der Probiotika, die in ausreichender Menge pro mikrobieller Zelle vorhanden sind. Lösliche Faktoren und Zellwandkomponenten des probiotischen Stamms LGG rufen neben Immuneffekten eine potente Aktivität in diversen Assays mit Murinen oder humanen Immunzellen hervor (Iliev et al. 2008). Dies belegt deren Wirksamkeit auch bei Verwendung in abgetöteter Form (Bischoff 2009).

Die Bifidobakterien werden an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber kurz erwähnt. Sie besitzen nach den Laktobazillen die zweitwichtigste Bedeutung als probiotische Mikroorganismen. Es sind gram-positive, stäbchenförmige Bakterien und sie kommen als typische Mikroflora im humanen Intestinaltrakt vor. Das Vorkommen der Bakteriengattung ist im Allgemeinen sehr stark wirtsspezifisch ausgeprägt (Schell et al. 2002, Tabasco et al. 2011).

Laktobazillen und Bifidobakterien gehören zu den Milchsäurebakterien, welche die häufigsten Probiotika in der Lebensmittelindustrie darstellen (Klein et al. 1998, Marteau und Shanahan 2003, Teitelbaum und Walker 2002). Zu den Selektionskriterien für probiotische Bakterien gehört z.B. die Überprüfung der Stammeigenschaft und deren Stoffwechselprodukte, die Testung auf Toxizität, die Prüfung von Schleimhauteffekten und deren kontrollierte klinische Prüfung sowie die Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehungen (Adams 1999, Saarela et al. 2000, Salminen S et al. 1998). Eine der wichtigsten Funktionsprüfungen ist die Testung auf die Fähigkeit zur Epithelzell-Adhäsion (Tuomola et al. 2001). *Lactobacillus GG* und *Lactobacillus salivarius* gehören zu den beiden als probiotisch deklarierten Mikroorganismen, für die klinische Studien am Menschen vorliegen (Doron und Gorbach 2006, McFarland und Dublin 2008, Montrose und Floch 2005).

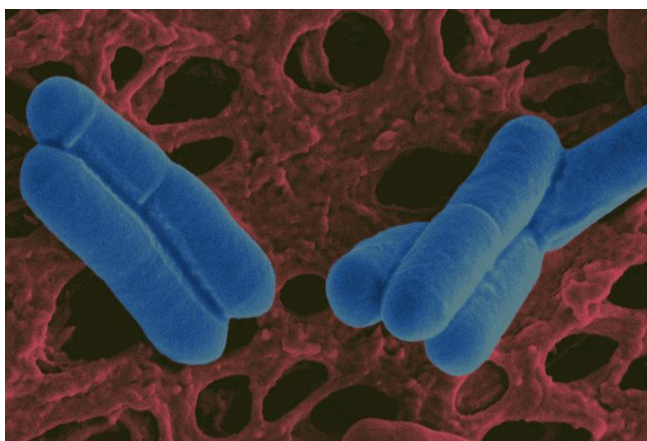


Abbildung 4: Scanning electron micrograph of the probiotic strain *Lactobacillus salivarius* UCC118 at a magnification of 25,000× False colour added by Pat Casey (Sleator 2010, S. 2).

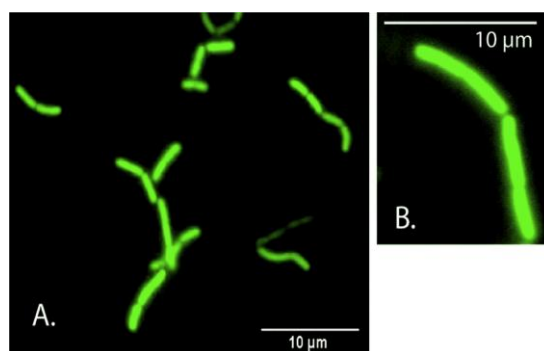


Abbildung 5: GFP-tagged *L. rhamnosus* GG, based on implementation of the NICE system: epifluorescence broth (De Keersmaecker et al. 2006, S. 4927).

Das Verbot zur krankheitsbezogenen Werbung führt in der Lebensmittelindustrie häufig dazu, dass für manche Probiotika wissenschaftliche Fantasienamen eingesetzt werden oder andere Keime einfach zu Laktobazillen umbenannt werden. Damit wird kurzzeitig zwar der Absatz des Produktes durch gewecktes Kaufinteresse gesteigert, aber auf lange Sicht dem Ansehen probiotischer Produkte eher geschadet (Schulze et al. 2008).

1.6 Zytokine und Chemokine als Mediatoren des Immunsystems

Der Begriff Zytokin umfasst eine Vielzahl von löslichen Polypeptiden und Glykoproteinen, ähnlich den Hormonen. Ihre Wirkung ist in der Regel autokrin oder parakrin und bleibt in erster Linie auf ein lokales Milieu begrenzt. Damit unterscheiden sie sich grundlegend von Hormonen, die hauptsächlich metabolische und physiologische Prozesse einleiten. Es handelt sich um kleine Proteine (mit einer Molmasse meist unter 30 kDa), die zur Kategorie der Signalmoleküle gezählt werden und eine Kommunikation der Zellen untereinander ermöglichen. Basale Mengen sind in den Geweben vorhanden, welche bei bestimmten Erkrankungen dramatisch ansteigen können (Whicher und Evans 1990). Zu den fünf Hauptklassen gehören die Interleukine, die Chemokine, die Interferone, koloniestimulierende Faktoren und die Tumornekrosefaktoren. Gemeinsam bilden sie eine wichtige Gruppe von Effektormolekülen, welche eine entscheidende Rolle bei der Organisation der angeborenen und erworbenen Immunantwort einnimmt, um eingedrungene Pathogene zu eliminieren.

Die erstentdeckten Zytokine waren die Interleukine, bestehend aus Monokinen und Lymphokinen, Sekretionsprodukte von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Über Interleukinmoleküle sind Leukozyten untereinander in der Lage, sich in ihrer Funktion zu regulieren. Das Monokin Interleukin-1 gilt als das archetypische Interleukin, welches als endogenes Pyrogen und lymphozytenaktivierender Faktor an Bedeutung gewann (Dinarello 1991). Diese Nomenklatur weitete sich schnell aus, als klar wurde, dass auch andere Zellen als Leukozyten in der Lage sind, Interleukine zu produzieren und mit ihnen zu interagieren. So weiß man heute, dass z.B. Keratinozyten dazu fähig sind, mehr als zwölf Zytokine zu sezernieren (Luger et al. 1990). Die Liste der Zytokine wurde im Laufe der Zeit über die Interleukine hinaus erweitert und beinhaltet heute außerdem die Interferone,

Tumornekrosefaktoren und diverse chemotaktische und kolonie-stimulierende Faktoren (Stadnyk 1994). Verschiedene Zytokine teilen in vielerlei Hinsicht gleichartige biologische Aktivität. Die funktionelle Vernetzung in Kombination mit der natürlichen Pleiotropie gibt einen Anhaltspunkt für die Genredundanz und verdeutlicht damit die signifikante Rolle der verschiedenen Zytokine in der Biologie (Kroemer et al. 1993). Im Allgemeinen funktionieren Zytokine als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, als Alarmsignal innerhalb einer entzündlichen Reaktion, als chemotaktische Faktoren für Leukozyten und als Modulatoren der Zellen des Immunsystems (Garcia-Lloret und Ignacio Santos 1990).

Die Zytokine des Immunsystems regulieren die Proliferation, die Differenzierung und die Funktionen von dessen Zellen. Die Zytokinrezeptoren gehören entweder zum Typ der Rezeptortyrosinkinase, zum Rezeptor mit assoziierter Tyrosinkinase oder zum Rezeptor-Serin/Threoninkinase und im Fall der Chemokine sind es G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bestimmte Zytokinklassen des Immunsystems regulieren nach Antigenkontakt die Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Zytokine des Immunsystems sind Interleukine, Interferone, Chemokine und die TNF-Superfamilie. Die Kommunikation zwischen den Zellen und den Geweben des Immunsystems muss durch diese löslichen Mediatoren und die membranständigen Rezeptorproteine vermittelt werden (Rassow et al. 2008).

Chemokine werden von Immunzellen und Gewebszellen sezerniert. Durch sie können Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten fortbewegt werden. Immunzellen gelangen durch die sogenannte Chemotaxis zum Ort der Entzündung und können modulierend eingreifen. Es handelt sich bei diesen also um chemotaktische Zytokine. Das Chemokin Interleukin-8 wird unter anderem von Makrophagen gebildet und ist einer der wichtigsten Mediatoren entzündlicher Reaktionen, hierauf wird im Folgenden noch näher eingegangen (Wolff et al. 1998).

Interferone sind körpereigene Gewebshormone, die von Leukozyten und Fibroblasten gebildet werden. Sie sind in der Lage, Zellen anzuweisen, bestimmte Proteine zu sezernieren, die sie gegen virale Erreger widerstandsfähiger machen (Isaacs und Lindenmann 1987).

Die kolonie-stimulierenden Faktoren zählen ebenfalls zu den Zytokinen und bilden eine Gruppe von Wachstumsfaktoren. Sezerniert von unterschiedlichen Zelltypen wie, z. B. Fibroblasten, Makrophagen oder Lymphozyten, können sie das Wachstum von Knochenmarksstammzellen induzieren (Metcalf 1986).

Der Vollständigkeit halber seien an dieser Stelle auch die Tumornekrosefaktoren erwähnt, welche das fünfte Mitglied der Zytokingruppe darstellen, ebenfalls Zytokine des Immunsystems. Sie werden hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und sind z.B. in der Lage, den programmierten Zelltod, die Apoptose zu induzieren oder auch zur Zellproliferation anzuregen (Hehlhans und Pfeffer 2005).

Die therapeutische Konsequenz dessen ist, dass ein verstärktes Expressieren von Zytokinen oder das verstärkte Expressieren ihrer Antagonisten bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen hilfreich sein könnte (Cannon 2000).

1.7 Regulation der Zytokinexpression

Die Zytokinexpression findet nur statt, wenn Bedarf besteht. Zytokine binden hochspezifisch an ihre Rezeptoren und kommen nur in äußerst geringen Mengen vor, da ihre wirksame Konzentration ausgesprochen niedrig ist. Sie weisen eine kurze Halbwertszeit auf, was sich wiederum in einer nur geringen Reichweite äußert. Generell sind epidermale Keratinozyten in der Lage, jede einzelne der Zytokinklassen (siehe oben) zu produzieren (Owsianowski et al. 1991). Sie spielen somit eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung des sogenannten Zytokinnetzwerks und sind aufgrund dessen befähigt, eine Wirtsantwort selektiv auf gewisse Stimuli zu steuern.

1.8 Die Bedeutung der Interleukine im Allgemeinen und die Bedeutung von Interleukin-8 im Speziellen

Interleukine (Il-x) bilden eine Gruppe der Zytokine und werden als körpereigene Botenstoffe bezeichnet. Das Wort Interleukin stammt einerseits aus dem Lateinischen – *inter*, also *zwischen* und aus dem Griechischen – *λευκός leukós*, also *weiß* und impliziert die Fähigkeit zur Vermittlung der Kommunikation zwischen Makrophagen, B- und T-Zellen und weiterer Zellen des Immunsystems. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie

dementsprechend beziffert: Il-1 bis Il-35. Die Wirkung der einzelnen Typen ist dabei höchst unterschiedlich. Il-10 hemmt z.B. die Abwehrreaktion des Organismus, wohingegen andere Interleukine entzündungsfördernde Wirkung besitzen. Ebenfalls spielen sie eine Rolle bei der Bildung von Blutvorläuferzellen im Knochenmark. Interleukine können also im Allgemeinen bestimmte Zellen des Immunsystems spezifisch zu Wachstum, Reifung und Teilung anregen oder haben dämpfende Wirkung und inhibieren genau diese Prozesse der Aktivierung (Horn et al. 2009).

Interleukin-8 (Il-8) zählt zu den pro-inflammatorischen Zytokinen, wird von Epithelien und Makrophagen gebildet und ist ein starker Stimulator für die Aktivität neutrophiler Granulozyten (Tonetti et al. 1993). Seine primäre Funktion ist also die Induktion der Chemotaxis und es spielt eine entscheidende Rolle innerhalb immunmodulierender Vorgänge. An dieser Stelle sei nur kurz erwähnt, dass auch anti-inflammatorische Zytokine an einem entzündlichen Geschehen beteiligt sind. Sie weisen eine entzündungshemmende Wirkung auf und tragen z.B. nach der eigentlichen Erregerbekämpfung zu einem Abklingen der Entzündung bei. Ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist erforderlich, um eine adäquate Immunreaktion zu gewährleisten.

Il-8 ist zwar ein Interleukin, hat jedoch die genannten chemotaktischen Eigenschaften und gehört zu der Familie der CXC-Motiv-Chemokine. Die insgesamt ca. 50 Mitglieder der Chemokinfamilie werden in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt: CC-, CXC-, C- und CX₃C-Chemokine. Die Nomenklatur erfolgt abhängig von dem Abstand der ersten beiden Cysteinreste. Bezüglich dieser Arbeit ist die CXC-Familie von besonderem Interesse und wird im Folgenden näher erläutert.

Die beiden N-terminalen Cysteine der CXC-Chemokinfamilie sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt, in der Nomenklatur dargestellt durch das „X“. Bis heute wurden 17 verschiedene Chemokine bei Säugern beschrieben, welche noch einmal in zwei Kategorien unterteilt werden. Die eine Gruppe weist zusätzlich eine spezifische Aminosäuresequenz von Glutaminsäure-Leucin-Arginin (kurz: ELR-positiv) vor dem ersten Cystein auf, der zweiten Gruppe fehlt diese und die Chemokine werden als ELR-negativ bezeichnet. ELR-positive CXC-Chemokine sind in der Lage, spezifisch die Migration von Neutrophilen zu

induzieren und mit den Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 zu interagieren. Bei Interleukin-8 handelt es sich um ein sogenanntes ELR-positives CXC-Chemokin. Es induziert die Chemotaxis der Neutrophilen, welche dadurch die Blutbahn verlassen und in das umliegende Gewebe einwandern können. ELR-negative Chemokine (z.B. CXCL13) funktionieren tendenziell als Chemolockstoff für Lymphozyten. CXC-Chemokine binden an CXC-Chemokinrezeptoren, von welchen bisher sieben bekannt sind und als CXCR1-7 bezeichnet werden (Fernandez und Lolis 2002, Laing und Secombes 2004, Rottman 1999).

Im menschlichen Organismus wird das Interleukin-8 Protein vom IL8-Gen codiert (Modi et al. 1990). Viele Rezeptoren auf den Membranoberflächen besitzen eine hohe Affinität zu IL-8, die meisten sind G-Protein-gekoppelt. Während neutrophile Granulozyten die primären Angriffszellen des IL-8 darstellen, gibt es trotzdem eine weitere Anzahl von Zellen (Endothelzellen, Makrophagen, Mastzellen und Keratinozyten), welche auch auf dieses Chemokin ansprechen (Kohidai und Csaba 1998). IL-8 wird häufig assoziiert mit Entzündungen. Ein Beispiel dafür ist seine häufig zitierte Rolle als proinflammatorischer Mediator der Gingivitis (Newman et al. 2006). Die Tatsache, dass die Sekretion von Interleukin-8 durch oxidativen Stress verstärkt wird, ist ursächlich für die Rekrutierung der inflammatorischen Zellen. Die weiter stattfindende Erhöhung der Mediatoren gegen oxidativen Stress ist ein entscheidender Parameter der lokalisierten Entzündung (Vlahopoulos et al. 1999).

1.9 Bisherige Untersuchungen

Wissenschaftliche Untersuchungen haben ergeben, dass zwischen der menschlichen gastrointestinalen Mikroflora und dem Wohlbefinden des Wirtes eine empfindliche Balance besteht. Hierbei spielt die Ernährung eine Schlüsselrolle für die intestinale Flora und die Gesundheit des Menschen (Gibson und Fuller 2000). An dieser Stelle soll noch einmal erwähnt werden, dass die wissenschaftlichen Ergebnisse diverser Publikationen sich nicht nur im Allgemeinen mit Probiotika befassen, sondern bestimmte Stämme und deren Wirkung auf unterschiedliche Gewebe untersuchen. So kann z.B. die nachgewiesene Wirksamkeit eines Bakterienstammes auch nicht auf Bakterienstämme der gleichen Art

übertragen werden. In dem entsprechenden Teil der vorliegenden Arbeit wird deshalb nur im Allgemeinen auf die Wirkung probiotischer Mikroorganismen eingegangen.

Heutzutage sieht sich der Verbraucher mit der Empfehlung, regelmäßig Probiotika zu konsumieren, konfrontiert – egal, ob gesund oder krank. Alfred Nissle (1874-1965) hat schon in den Jahren von 1916 bis 1962 in insgesamt 18 Publikationen über 280 Einzelfälle und die Wirksamkeit des E. coli-Stammes Nissle 1917 bei gastrointestinalen Beschwerden berichtet.

Heute liegen wissenschaftliche Ergebnisse vor, in welchen bestätigt wird, dass sich der bakterielle Stoffwechsel im Gastrointestinaltrakt und in den Komponenten des Immunsystems durch die Einnahme von Probiotika messbar beeinflussen lässt (Gibson und Fuller 2000). Auch die regelmäßige Einnahme probiotischer Bakterien bei älteren Menschen führt nachweislich zu einer Verstärkung der Immunabwehr, was sich in einer höheren Aktivität von NK-Zellen und in einer verringerten Infektionsrate äußert (Bunout et. al. 2004). Die Datenlage zum prophylaktischen Einsatz von Probiotika bei Diarrhöen kann derzeit als gesichert angenommen werden, während ihr Einfluss zum Schutz vor Erkältungskrankheiten noch nicht in ausreichender Form belegt wurde. Bei so genannten Risikosäuglingen (Frühgeburten, durch Kaiserschnitt entbundene, mit Antibiotika behandelte oder nicht gestillte Neugeborene) verringerte sich durch die Verabreichung von Probiotika die Infektanfälligkeit und der „Antibiotikabedarf“ innerhalb der ersten beiden Lebensjahre (Lodnova-Zadnikova et. al. 1991). Kinder, die man mit deutlich weniger Probiotika behandelte, waren verstärkt mit pathogenen Bakterien besiedelt. Nachweisbar war dieser Effekt sogar noch sechs Monate nachdem das Präparat bereits abgesetzt wurde (Lodnova-Zadnikova und Sonnenborn 1997). Diese Prophylaxe ermöglicht bei Säuglingen sofort nach der Geburt die noch nicht effizient arbeitende Immunabwehr zu ergänzen und damit das Risiko von Infektionen zu verringern. Innerhalb der Forschung mit Probiotika wurden viele der unbewiesenen Hypothesen aus der Vergangenheit widerlegt, teilweise aber auch bestätigt. Die bis in die jüngste Vergangenheit andauernde Annahme, dass sich Probiotika im Intestinaltrakt ansiedeln und nur dann wirksam sind, konnte nicht bestätigt werden. In der Realität wurde bei den Untersuchungen keine Kolonisierung nachgewiesen, sondern lediglich die verzögerte Ausscheidung der Keime gemessen. Der Schwerpunkt der gegenwärtigen sowie der geplanten wissenschaftlichen Arbeiten über probiotische Keime

liegt beim Eruiieren der Wirkmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene. Um zu verstehen, warum manche Probiotika wirksam sind und manche nicht, ist die Aufklärung der unterschiedlichen Kommunikationsweise der unterschiedlichen probiotischen Bakterien mit dem Wirtsorganismus von besonderer Wichtigkeit. Außerdem ist es erforderlich, bei der Auswertung vorhandener Daten zwischen gesicherten Erkenntnissen und Spekulationen zu differenzieren, da die Datenlage zur klinischen Wirksamkeit von Probiotika in den letzten Jahren exponentiell gestiegen ist (Bischoff 2009).

1.10 Zielsetzung

Es besteht allgemeiner Forschungsbedarf bei der Prüfung der Einsatzmöglichkeit probiotischer Keime im klinischen Bereich (Schulze et al. 2008). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, präzise Untersuchungen zu den Effekten der oben genannten probiotischen Bakterienstämme LGG und L.s. auf eine TERT-immortalisierte humane orale Keratinozytenzelllinie durchzuführen, um einen eventuell auftretenden immunmodulierenden Effekt der Keime zu bestätigen oder zu revidieren. Zu diesem Thema sind lediglich Einzelheiten bekannt, die an dieser Stelle exemplarisch aufgeführt werden sollen. Probiotika können das angeborene und das erworbene Immunsystem beeinflussen. Soll allerdings ein spezifischer Effekt hervorgerufen werden, muss es möglich sein, ein hierfür geeignetes Probiotikum auswählen zu können. Dafür benötigt man Ergebnisse relevanter wissenschaftlicher Arbeiten. Außerdem soll innerhalb dieser Arbeit geklärt werden, ob die beiden probiotischen Stämme LGG und L.s. einen präventiven, immunmodulierenden Effekt auf den menschlichen Organismus ausüben können. Im Vergleich mit der bisherigen Datenlage ist herauszufinden, ob die für den Intestinaltrakt vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung der beiden probiotischen Stämme auch auf den Bereich der Mundhöhle übertragen werden können. Dafür wird die Stimulation mit oralen Keratinozyten durchgeführt. Die Untersuchung beschränkt sich auf eine mögliche Veränderung in der Expression des Interleukin-8. Weiter soll untersucht werden, ob innerhalb der beiden Stämme signifikante Unterschiede in den Ergebnissen auftreten. Die Stimulation der Keratinozyten soll mit unterschiedlichen Konzentrationen jedes einzelnen Bakteriums erfolgen und alle Proben betreffend einmal nach 6 und einmal nach 24 Stunden

kontrolliert werden. Es gilt hier herauszufinden, ob bezüglich des Zeitfaktors (Stimulationsdauer) und der Konzentration (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) signifikante Unterschiede auftreten, wenn man diese einzeln einander gegenüberstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendeter Zelltyp OKF6/Tert-2

Bei der verwendeten Zelllinie OKF6/Tert2 handelt es sich um humane orale Keratinozyten. Die Zellen wurden aliquotiert (5×10^5 Zellen auf 1000 μ l) von der Arbeitsgruppe *Harvard Skin Disease Research Center, Cell Culture and Microscopy Core, Director James Rheinwald, Ph.D. der Harvard Medical School*. Die Entnahme erfolgte im Mundbodenbereich eines 56-jährigen männlichen Patienten. Da aus biologischer Sicht die natürliche Zahl der Zellteilungen limitiert ist, waren die Zellen im gelieferten Zustand bereits immortalisiert. Die Transfektion erfolgte durch homozygote Deletion von p16 und p14ARF. Hierbei handelt es sich um Tumorsuppressoren, welche die Lebensdauer von Zellen beeinflussen können, in dem sie in die Regulation der Zellteilung eingreifen. Das Protein p16 verhindert während der Teilung den Übergang von der G₁-in die S-Phase und leitet so die Apoptose als programmierten Zelltod ein. P14ARF ist ebenfalls in die Zellzyklusregulation involviert und vermittelt einen Arrest innerhalb der G₂-Phase. Das Ziel besteht in der verstärkten Expression der *human Telomerase Reverse Transcriptase* (oder hTERT). Bei der hTERT handelt es sich um ein Enzym, welches einen Prozess katalysiert, innerhalb dessen Chromosomen die DNA-Telomerasequenz TTAGGG angefügt wird, wodurch sich die Zellen während der Kultivierung unbegrenzt teilen lassen (Dickson et al. 2000).

Die folgenden Vorgaben zur Arbeit mit der TERT-immortalisierten menschlichen Keratinozytenlinie OKF6/TERT-2-Zellen, die erforderlichen Bedingungen zur Kultivierung und die zu verwendenden Zellkulturmedien entstammen dem Protokoll der oben genannten Arbeitsgruppe um J. Rheinwald und das *Cell Culture Core* des *Harvard Skin Disease Research Center, Boston, MA*. Sie beruhen auf deren langjähriger Erfahrung im Umgang mit den Zellen. Die Lagerung der im folgenden aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze erfolgte bei 4 °C bzw. bei -20 °C und wurde vor deren Verwendung in einem beheiztem Wasserbad auf 37 °C temperiert.

2.2 Verwendete Bakterienextrakte

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienextrakte wurden von der Medizinischen Hochschule Hannover, Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde von Dr. rer. nat. Joachim Volk zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Extrakte waren bereits aliquotiert; die Menge von *L. salivarius* in einem Kryoröhrchen entsprach 1593×10^5 Bakterien und von LGG 950×10^5 Bakterien, beide jeweils angesetzt in 1000 µl Bakterienmedium. Vor deren Verwendung war es erforderlich, die Extrakte in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufzutauen. Danach wurden die Kryoröhrchen zentrifugiert, das Bakterienmedium wurde abgesaugt und die Bakterien mehrmals mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsvorgang wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 1000 µl Zellkulturmedium, welches bei den folgenden Versuchen verwendet werden sollte, resuspendiert. Dies war erforderlich, um die Extrakte zur Stimulation der oralen Keratinozyten verwenden zu können, da das Bakterienmedium zytotoxische Eigenschaften hat. Nach dem Waschvorgang und dem Austausch des Mediums ließen sich die Bakterien bis zu deren Verwendung bei -80 °C aufbewahren. Diese Vorgehensweise wurde dem Protokoll der Arbeitsgruppe entnommen.

2.3 Zellkultur

Die Zellen wurden in Kryobanken bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Stoffwechselprozesse von Zellen werden durch diesen Prozess limitiert und ihre Lebensdauer auf unbegrenzte Zeit aufrechterhalten. Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter einer Zellbank, um die erforderlichen sterilen Bedingungen zu gewährleisten und damit das Kontaminationsrisiko z.B. mit Bakterien, Viren oder Pilzen verringert wird. Zur Wiederaufnahme ihrer uneingeschränkten Vitalität erfolgte das Auftauen der Ampulle mit den Zellen in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad. Danach wird das verwendete Einfriermedium zytotoxisch, was eine schnelle Weiterverarbeitung erforderlich macht. Die aufgetaute Lösung wurde in eine 15-ml-Tube überführt und ihr wurde langsam, über ca. 30 Sekunden, 9 ml vorgewärmtes Passagiermedium zugegeben. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 800 upm wurde der Überstand abgesaugt, das entstandene Pellet in 1 ml GIBCO Ker-sfm resuspendiert, gezählt und die gewünschte Menge in 75-cm²-Flaschen mit weiteren

9 ml Ker-VM ausgesät. Die empfohlene Aussaatmenge für die genannte Flaschengröße wurde laut Protokoll mit 2×10^4 bis 2×10^5 Zellen angegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO_2 -Sättigung von 5 %. Ein Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag nach dem Auftauen und dann zyklisch alle zwei Tage. Wenn viele tote Zellen vorhanden waren, wurden sie zusätzlich mit PBS gewaschen. Generell wurde neues Vollmedium zugegeben und die Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet und dokumentiert. In dem mitgelieferten Protokoll war außerdem vorgegeben, dass die OKF6/Tert2-Zellen während der Subkultivierung eine Konfluenz von ca. 30% nicht überschreiten sollen, damit eine Differenzierung der Zellen vermieden wird. Außerdem war es wichtig zu beachten, dass die Subkultivierung der Keratinozyten nach deren Aussaat nicht länger als 8 Tage dauern sollte, auch wenn sie bis dahin nicht die gewünschte Dichte erreicht haben sollten. Zellen, die länger kultiviert wurden, ließen sich schwerer trypsinieren und wieder ausplattieren (Dickson et al. 2000, Rheinwald et al. 2002). Es musste in der Planung berücksichtigt werden, dass die Zellen über das Wochenende nicht überwachsen, wenn die Abnahme erst am Montag erfolgen sollte. Die Ausplattierung der Zellen erfolgte nach diesem Kriterium z.B. an einem Donnerstag und die Abnahme am darauffolgenden Montag. In der Woche wurde 10 ml Medium zugegeben und über das Wochenende 14 ml. Für die Experimente wurden die Zellen mit einer höheren Zelldichte ausgesät und kürzer kultiviert. Um die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, musste zunächst das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand abgesaugt und so viel von einer Abdaulösung (0,125 % Trypsin / 0,01 % EDTA in PBS⁻ pH 7,2) auf die Zellen gegeben, bis alle benetzt waren (ca. 2 ml für eine 75-cm²-Flasche). Die Kulturflaschen wurden jetzt für ca. 5 – 12 min bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden gelöst haben. Unter dem Mikroskop sahen die Zellen, wenn sie sich vom Boden gelöst hatten, kugelig aus. Danach musste die gleiche Menge DMEM/F12-Medium zugegeben und die Zellen einige Male auf- und abpipettiert werden, um die EDTA/Trypsin-Lösung zu neutralisieren. Die Zellen durften nicht mit einem Gummischaber von dem Boden gelöst werden, da dieser mechanische Vorgang deren Struktur zerstören würde. Nach dem Abstoppen der EDTA/Trypsin-Lösung sollte die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 800 rpm für 5 min

zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml GIBCO ker-sfm Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde anschließend mit einem elektronischen Zählgerät bestimmt. Mit dem Gerät war außerdem eine Quantifizierung von toten Zellen, vitalen Zellen oder Verunreinigungen bzw. Zelldebris möglich. Außerdem kann die Zellvitalität zusätzlich mit Trypanblau untersucht werden. Dieses gelangt bei lebenden Zellen nicht in deren Inneres, wohingegen sich tote Zellen anfärben lassen. Nach der Bestimmung der Zellzahl konnte die gewünschte Menge erneut in Ker-VM ausplattiert und kultiviert, oder kryokonserviert werden. Die Subkultivierung war abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, die innerhalb der Vorversuche genauer ermittelt werden sollte.

Für das Einfrieren der Zellen mussten diese wie beschrieben trypsinisiert, zentrifugiert und resuspendiert werden. Nach der elektronischen Zellzahlbestimmung konnte die gewünschte Menge der Zellsuspension aliquotiert und die gleiche Menge an 2x *freezing Medium* zugegeben werden. Vor der Konservierung in flüssigem Stickstoff mussten die Kryoröhrchen für mindestens 1,5 – 2 h bei -80 °C eingefroren werden. Die Zellen können in jeder beliebigen Konzentration von 100 Zellen bis 3×10^6 Zellen/ml eingefroren werden.

2.4 Vorversuche

Während der Vorversuche sollten Erfahrungen im Umgang mit den Zellen gemacht und dokumentiert werden. Hierzu gehörte es zum Beispiel, sich ein Bild darüber zu machen, mit welcher Geschwindigkeit sich die Zellen teilen und vermehren. So konnte herausgefunden werden, welche Zellzahl ausgesät werden muss, um nach einer bestimmten Zeit die für die Stimulation erforderliche Konfluenz zu erhalten. Die Zellzahl pro Kulturgefäß musste bekannt sein, um später bei der Durchführung der Versuche die Extrakte in gewünschter Verdünnung zugeben zu können. Innerhalb der Subkultivierung war es erforderlich, dass die Zellen eine Konfluenz von 30 % nicht überschreiten, um eine Differenzierung zu vermeiden. Zum Zeitpunkt der Stimulation sollte jedoch der Boden der jeweiligen Kulturgefäße zu ca. 80 % mit den adhärennten Zellen bedeckt sein. Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufgetaut und gezählt. In jede 75-cm²-Flasche sollten $1,5 \times 10^4$ Zellen ausplattiert werden. Insgesamt waren z.B. in einem Kryo $2,5 \times 10^5$ Zellen auf 1000 µl Medium, was bedeutet, dass

rein rechnerisch $0,004 \mu\text{l}$ eine Zelle enthält. Für die erforderliche Menge an Zellen mussten also $200 \mu\text{l}$ der aufgetauten Zellsuspension abpipettiert, in die Kulturflasche gegeben und mit Kulturmedium auf die erforderliche ml-Menge aufgefüllt werden. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und danach alle zwei Tage. Die Konfluenz wurde unter dem Mikroskop täglich dokumentiert. Die ausplattierte Zahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen hatte nach 4 Tagen die gewünschte Konfluenz von 30 % zur Subkultivierung erreicht. Die Zellen wurden abtrypsinisiert, es wurde deren Zellzahl bestimmt und sie wurden erneut kultiviert oder kryokonserviert. Die Zellzahl betrug $1,5 \times 10^5$, sie hatte sich also bis zu diesem Zeitpunkt verzehnfacht. Um während der Kultivierung die Handhabung mit einer geringeren Zellzahl zu erproben, wurden zur weiteren Zellaussaat Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm^2 genutzt. Für die Experimente konnten die Zellen auch mit einer höheren Dichte ausgesät und dementsprechend kürzer kultiviert werden. Die Zellzahl betrug in einer kleinen Flasche bei der gewünschten Konfluenz von 80 % $1,85 \times 10^6$. Wollte man die Zellen in einer 75 cm^2 Flasche kultivieren, mussten 3×10^5 Zellen ausgesät werden, um nach drei Tagen die gewünschte Konfluenz für den Versuchsstart zu erhalten.

Während der Durchführung der Vorversuche und den Überlegungen zu den Stimulationen der Zellen mit den Bakterienextrakten wurde deutlich, dass das Arbeiten mit 75 cm^2 Kulturflaschen weniger vorteilhaft ist als die Kultivierung und Stimulation in 25 cm^2 Flaschen. In den kleineren Flaschen sind bei 80%iger Konfluenz deutlich weniger Zellen adhärent und dementsprechend weniger Bakterien für die Stimulation erforderlich. Um die Menge der für die Stimulation verwendeten Bakterien weiter zu reduzieren, war es außerdem erforderlich, die Zellzahl für die Verdünnung auf 1:1000 herabzusetzen. Die Umsetzung erfolgte, indem speziell für diese Konzentration die Kultivierung der Zellen in 24-Well-Platten vorgenommen wurde. Die Kulturfläche eines einzelnen Wells einer 24-Well-Platte beträgt ungefähr 2 cm^2 . Bei einer beobachteten Konfluenz von 80 %, wurde eine Zellzahl von $7,3 \times 10^4$ pro Well mit einem elektronischen Zählgerät ermittelt.

Die Aussaat erfolgte mit 1×10^4 Zellen pro Well und dauerte, um die gewünschte Menge zu erhalten, 7 Tage. Die anderen Konzentrationen wurden nicht auf einer 24-Well-Platte durchgeführt, um bessere Mengenverhältnisse und dadurch weniger Pipettierfehler zu erhalten.

2.5 Stimulation der OKF6/Tert-2-Zellen

Für die Versuchsdurchführung, die Stimulation der Zellen mit den zwei verschiedenen probiotischen Bakterienstämmen, wurden ausschließlich die 25 cm² Kulturflaschen verwendet. Die Stimulation sollte in unterschiedlichen Verdünnungen erfolgen und jeweils über 6 und 24 Stunden andauern. Die gewählten Verdünnungen waren 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000. Die 1 bezieht sich in den Ausführungen immer auf die Anzahl der Zellen, auf welche die entsprechende Menge des jeweiligen Bakteriums gegeben wird. Genauer bedeutet dies, dass bei einer 1:1-Verdünnung einem Bakterium eine Zelle zugegeben wurde, bei einer Verdünnung von 1:10 dementsprechend zehn Bakterien pro Zelle. Das probiotische Bakterium *L. salivarius* wurde nach dem Waschvorgang einem Kryoröhrchen entnommen, in dem 1593×10^5 Bakterien in 1000 µl Medium suspendiert waren und die Menge von LGG entsprach 950×10^5 Bakterien in 1000 µl. Vor dem Versuchsstart war es aus den bereits weiter oben genannten Gründen erforderlich, das Kulturmedium gegen das Versuchsmedium DF-K zu wechseln.

Von *L. salivarius* sollte jetzt bei einer 1:1 Verdünnung und bei einer Zellzahl von $1,85 \times 10^6$ 11,6 µl der 1000-µl-Lösung entnommen und auf die Zellen gegeben werden. Dies heißt, dass die entnommenen 11,6 µl der 1000 µl Lösung $1,85 \times 10^6$ der Bakterien enthielten und dieses der gewünschten 1:1 Verdünnung entsprechen sollte. Gleiches wurde jetzt für die weiteren Verdünnungen berechnet. Bei 1:10 entsprach das einer erforderlichen Zugabe von 116 µl, bei 1:100 dann 1160 µl und bei 1:1000 11600 µl.

Von LGG waren 950×10^5 Bakterien in 1000 µl suspendiert. Dem Kryoröhrchen mussten demnach 19,5 µl abpipettiert werden, um die gewünschte 1:1 Beziehung herzustellen. Bei einer Verdünnung von 1:10 somit 195 µl, bei 1:100 1950 µl und bei 1:1000 19500 µl.

An dieser Stelle wurde deutlich, dass die Stimulation 1:1000 erhebliche Mengen beider Bakterien erforderlich machen würde. Um dieses zu umgehen, wurde für die genannte Konzentration mit einer 24-Well-Platte gearbeitet. Hier betrug die während der Vorversuche ermittelte Zahl der Zellen $7,3 \times 10^4$ pro Well einer 24-Well-Platte bei 80%iger Konfluenz. Das bedeutete, dass 440 µl von der *L. salivarius* Lösung und dementsprechend

736µl von der LGG Lösung zugegeben werden mussten, um die gewünschte 1:1000 Stimulation durchzuführen.

Das Versetzen der Zellen erfolgte jeweils nur mit einem einzelnen Bakterienstamm, in Doppelbestimmung und dreifacher Wiederholung an unterschiedlichen Tagen. Gleichzeitig dazu wurde immer eine Kontrolle angefertigt, welche nur die nicht stimulierten Zellen beinhaltete. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden einmal für LGG und einmal für L.s. verwendet und für 6 Stunden bzw. 24 Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen mit der errechneten Menge an Bakterien versetzt wurden, erfolgte deren Kultivierung bei 37 °C in einem Inkubator. Nach den 6 bzw. 24 h wurde der Überstand abgesaugt und bei -80 °C bis zu dessen weiteren Gebrauch eingefroren. Die Zellen wurden verworfen.

Tabelle 1: Versuchsaufbau

Flaschen*	Konzentrationen	Bakterium	Zeit	Flaschen*	Konzentrationen	Bakterium	Zeit
1	1:1	L.S.	6h	1	1:1	LGG	6h
2	1:1	L.S.	6h	2	1:1	LGG	6h
3	1:10	L.S.	6h	3	1:10	LGG	6h
4	1:10	L.S.	6h	4	1:10	LGG	6h
5	1:100	L.S.	6h	5	1:100	LGG	6h
6	1:100	L.S.	6h	6	1:100	LGG	6h
7	1:1000	L.S.	6h	7	1:1000	LGG	6h
8	1:1000	L.S.	6h	8	1:1000	LGG	6h
9	Kontrolle	-	6h	9	Kontrolle	-	6h
10	Kontrolle	-	6h	10	Kontrolle	-	6h
11	1:1	L.S.	24h	11	1:1	LGG	24h
12	1:1	L.S.	24h	12	1:1	LGG	24h
13	1:10	L.S.	24h	13	1:10	LGG	24h
14	1:10	L.S.	24h	14	1:10	LGG	24h
15	1:100	L.S.	24h	15	1:100	LGG	24h
16	1:100	L.S.	24h	16	1:100	LGG	24h
17	1:1000	L.S.	24h	17	1:1000	LGG	24h
18	1:1000	L.S.	24h	18	1:1000	LGG	24h
19	Kontrolle	-	24h	19	Kontrolle	-	24h
20	Kontrolle	-	24h	20	Kontrolle	-	24h

* bei der Konzentration 1:1000 erfolgte der Versuch wie oben beschrieben auf einer 24-Well-Platte

2.6 Proteinnachweis mittels ELISA

Bei dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, auch als ELISA bezeichnet, handelt es sich um eine Methode, bei der mit Hilfe von Antikörpern in einer Probe vorhandene Zytokine nachgewiesen werden können. In erster Linie wird bei diesem labordiagnostischen Verfahren vorausgesetzt, dass ein Reagenz, das an der Beschichtung einer Kunststoffplatte

bindet, mit einem primären Antikörper inkubiert wird, welches wiederum spezifisch an dieses bindet. Ein sekundärer Antikörper wird zugegeben, der an den ersten Antikörper bindet und außerdem mit einem Enzym gekoppelt ist, um ein detektierbares Signal hervorzubringen, anhand dessen eine genaue Quantifizierung erfolgen kann. Meist wird dieses sichtbar als Farbänderung des Substrates. Zwischendurch werden Waschvorgänge durchgeführt, um nichtgebundene Stoffe oder unspezifische Komponenten auszuwaschen. Die gebundenen Liganden mit ihren spezifisch bindenden Gegenstücken als Antigen-Antikörper-Komplex bleiben durch Interaktion auf dem Boden der speziell für diesen Zweck entwickelten 96-Well-Mikrotiter-Platte haften.

Um einen ELISA durchführen zu können, benötigt man also einen Antikörper mit einer Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Die flüssige Probe wird auf einen festen Boden mit speziell bindenden Eigenschaften gegeben und im Folgenden mit mehreren flüssigen Reagenzien der Reihe nach versetzt, inkubiert und daraufhin gewaschen. Während der Inkubation mit der letzten Flüssigkeit ist eine Farbreaktion als Produkt einer enzymatischen Reaktion sichtbar. Die qualitative Auswertung der Platte mit einem Spektralphotometer basiert auf der Intensität des transmittierten Lichts, was eine quantitative Bestimmung der Transmission mit einschließt. Die Sensitivität des Nachweises basiert auf einer Signalverstärkung während der analytischen Reaktion. Seitdem Enzymreaktionen als Verstärkungsprozesse verstanden werden, werden sie als solche mit einem festgelegten Mengenverhältnis an ein Reagenz gekoppelt - daher der Name "*Enzyme Linked*". In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem indirekten ELISA gearbeitet. Es wird deswegen nur kurz auf weitere ELISA-Methoden eingegangen, jedoch ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

2.6.1 Indirekter ELISA

Eine gepufferte Lösung eines Antigens wird in jedes Well einer Mikrotiterplatte gegeben und eine gewisse Zeit inkubiert, um dem Antigen eine Adhärenz an den Kunststoff zu ermöglichen. Ein nicht reaktives Protein wird in Lösung dazugegeben, welches die noch frei gebliebene Kunststoffoberfläche abblocken soll. Als nächstes wird der primäre Antikörper zugegeben, der spezifisch an das Test-Antigen bindet, welches das Well beschichtet. Dann erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers, der an den primären bindet. Der sekundäre

Antikörper hat häufig ein Enzym angeheftet, dieses hat einen eher vernachlässigbaren Effekt auf die Bindungseigenschaften des Antikörpers. Ein Substrat für dieses Enzym wird hinzugegeben, das Substrat reagiert mit dem Enzym und währenddessen findet eine Farbreaktion statt. Die Farbveränderung zeigt, dass der sekundäre Antikörper an den primären bindet. Je höher die Konzentration des ursprünglich in dem Serum vorhandenen primären Antikörpers, desto stärker die Farbveränderung. Auch hier wird häufig ein Spektrometer genutzt, um quantitative Werte für die Farbstärke zu erhalten.

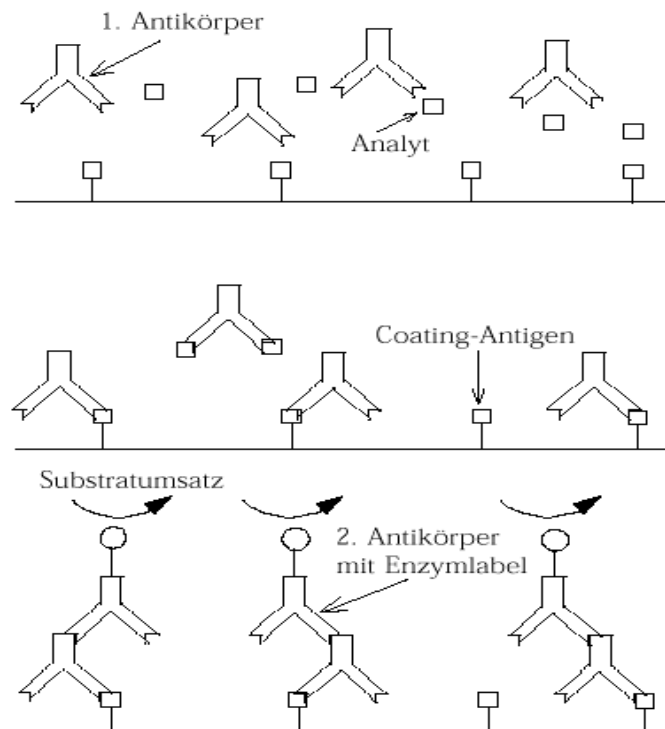


Abbildung 6: Prinzip des indirekten ELISA

(<http://www.fachdokumente.lubw.badenwuerttemberg.de>)

2.6.2 Sandwich-ELISA

Eine weniger gebräuchliche Variante des indirekten ELISA wird als Sandwich ELISA bezeichnet und findet Anwendung bei der Ermittlung von Antigenproben. Eine Oberfläche muss präpariert werden, auf der eine bekannte Menge von Antikörpern gebunden wird. Nichtspezifische Bindungsstellen werden blockiert. Die Antigen enthaltende Probe wird hinzugegeben und die Platte nach einer gewissen Inkubationszeit gewaschen, um die ungebundenen Antigene zu beseitigen. Ein spezifischer Antikörper wird hinzugegeben,

dieser bindet an das Antigen - daher "Sandwich": das Antigen haftet bei dieser Methode zwischen den beiden Antikörpern. Die Wells werden jetzt mit einem Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper (*detection antibody*) versetzt, welche spezifisch an die unspezifische Fc-Region des Antikörpers binden. Dann erfolgt das Waschen der Platte, um diese von ungebundenen Antikörper-Enzym-Konjugaten zu befreien. Eine Chemikalie muss in die Wells gegeben werden, welche durch das Enzym in Farbe, Fluoreszenz oder ein elektrochemisches Signal umgesetzt wird. Die Absorption, Fluoreszenz oder das elektrochemische Signal können jetzt gemessen werden, um das Vorhandensein und die Quantität des Antigens zu bestimmen.

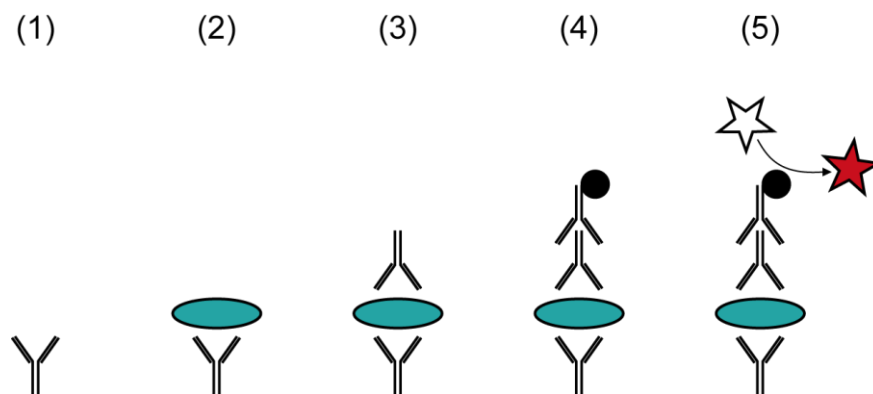


Abbildung 7: Sandwich ELISA. (1) Platte versetzt mit dem capture antibody; (2) Probe wurde hinzugegeben und Antigene binden an den capture antibody; (3) detection antibody dazu, Bindung an das Antigen; (4) enzyme-linked sekundärer Antikörper hinzu und Bindung an detection antibody; (5) hinzugegebenes Substrat wird durch das Enzym umgesetzt in eine nachweisbare Form. (http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunosorbent_Assay)

2.6.3 Kompetitiv-ELISA

Eine dritte Möglichkeit zur Durchführung des ELISA ist die der kompetitiven Bindung. Die Schritte innerhalb dieser Methode unterscheiden sich ein wenig von den beiden ersten Beispielen. Nicht markierte Antikörper werden gemeinsam mit der Probe, welche das Antigen enthält, inkubiert. Diese verbundenen Antikörper-Antigen-Komplexe werden dann auf Antigen-beschichtete Wells gegeben. Die Platte wird gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Je mehr Antigene sich in der Probe befinden, desto weniger werden die Antikörper fähig sein, an das Antigen zu binden, deshalb "kompetitiv". Spezifisch zu dem primären Antikörper wird ein sekundärer zugefügt, welcher sich mit dem

Enzym verbindet. Ein Substrat wird hinzugegeben und übrig gebliebene Enzyme rufen ein chromogenes oder fluoreszierendes Signal hervor. Die Reaktion wird gestoppt, um eine mögliche Sättigung des Signals zu vermeiden.

2.7 Testdurchführung

Das *human Il-8 ELISA Development Kit* enthielt alle Komponenten, die für eine quantitative Messung des natürlichen und/oder rekombinanten hll-8 in einem Bereich von 16 – 1000 pg/ml erforderlich waren. Der Nachweis wurde nach den genauen Anweisungen durchgeführt, die dem mitgelieferten Produktblatt entnommen wurden.

Der *Capture Antibody* beinhaltete 50 µg von aufbereiteten rabbit anti-hll-8, mit besonderer Antigenaffinität und 2,5 mg D-Mannitol. Die Ampulle musste vor dem Öffnen zentrifugiert und vor deren Verwendung mit 0,5 ml sterilem Wasser zu einer Konzentration von 100 µg/ml verdünnt werden. Der *Detection Antibody* beinhaltete 25 µg von biotinyliertem aufbereiteten *rabbit* anti-hll-8 und 2,5 mg D-Mannitol mit Antigenaffinität. Vor dem Öffnen war es ebenfalls erforderlich, die Ampulle zu zentrifugieren. Die Lösung wurde mit 0,25 ml sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 µg/ml gebracht. Der Human Il-8 Standard beinhaltete 1 µg rekombinantes hll-8, 2,2 mg BSA und 11 mg D-Mannitol. Nach dem Zentrifugieren wurde mit 1 ml sterilem Wasser eine Konzentration von 1 µg/ml hergestellt. Die so hergestellten Komponenten waren bei Lagerung in 2 – 8 °C für zwei Wochen haltbar. Alternativ konnten sie auch aliquotiert bei -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt werden. Für das *Avidin-HRP Conjugate* war es erforderlich, die 60 µl Ampulle nach Beschreibung in zehn 6 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße zu aliquotieren und bei -20 °C zu lagern. Bei einer solchen Lagerung sind die Aliquots bis zu zwei Jahre haltbar. Ein wiederholtes Einfrieren sollte jedoch nach dem Auftauen vermieden werden. Avidin sollte außerdem nur in Konjugation mit ABTS verwendet werden.

Für die Vorbereitung der *ELISA microplates* musste der *capture antibody* mit PBS zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml verdünnt werden und umgehend 100 µl von der verdünnten Lösung in jedes Well gegeben werden. Danach wurde die Platte abgedeckt über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. An dem darauf folgenden Tag wurde die Flüssigkeit aus den Wells abgesaugt und die Platte viermal mit 300 µl *wash buffer*/Well gewaschen.

Um nach dem vierten Waschvorgang letzte Rückstände der Flüssigkeit zu entfernen, sollte die Platte umgedreht auf einem Papiertuch vorsichtig ausgeklopft werden. Jeder Waschvorgang, der im Folgenden beschrieben wird, sollte genau nach dieser Anleitung durchgeführt werden. Nach diesem ersten Waschen musste in jedes Well 300 µl block buffer pipettiert und das Ganze für eine Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach einer Stunde war es erforderlich, die Flüssigkeit zu entfernen und die Platte wie oben beschrieben zu waschen. Während der Wartezeit von einer Stunde konnte die Herstellung der Standard-Verdünnung erfolgen. Dafür war es erforderlich, den Standard in einer Verdünnungsreihe von 1 ng/ml bis auf Null zu verdünnen und ohne Verzögerung 100 µl jeder einzelnen Lösung als Doppelbestimmung in die Wells zu geben. Dafür musste zunächst der Standard von der Einheit 1 µg/ml in 1 ng/ml überführt werden, was einer Verdünnung von 1:1000 entspricht. Die 1 µl von dem Human Il-8-Standard wurden für diesen Zweck in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 1 ml Verdünnungspuffer zugesetzt und bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext. Jetzt wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß 500 µl *Diluent* vorgelegt, aus der hergestellten Verdünnung 500 µl abgenommen, den vorgelegten 500 µl *Diluent* zugegeben und das ganze erneut auf dem Vortexer vermischt. Dieser Vorgang wurde noch weitere sechs Mal mit der jeweils zuletzt hergestellten Lösung wiederholt, um die erforderliche Verdünnung des Standards bis auf Null zu erhalten.

Nach diesem Vorgang hatte man acht Lösungen mit den folgenden Konzentrationen vorliegen:

1	ng/ml	0,0625	ng/ml
0,5	ng/ml	0,03125	ng/ml
0,25	ng/ml	0,015625	ng/ml
0,125	ng/ml	0,0078125	ng/ml.

Die letzte Konzentration war so weit verdünnt, dass sie den erforderlichen 0 ng/ml gleichgesetzt werden konnte und die Verdünnungsreihe nicht weiter fortgeführt werden musste. Von jeder einzelnen Probe wurden 100 µl/Well als Doppelbestimmung auf die *ELISA-Microplate* pipettiert.

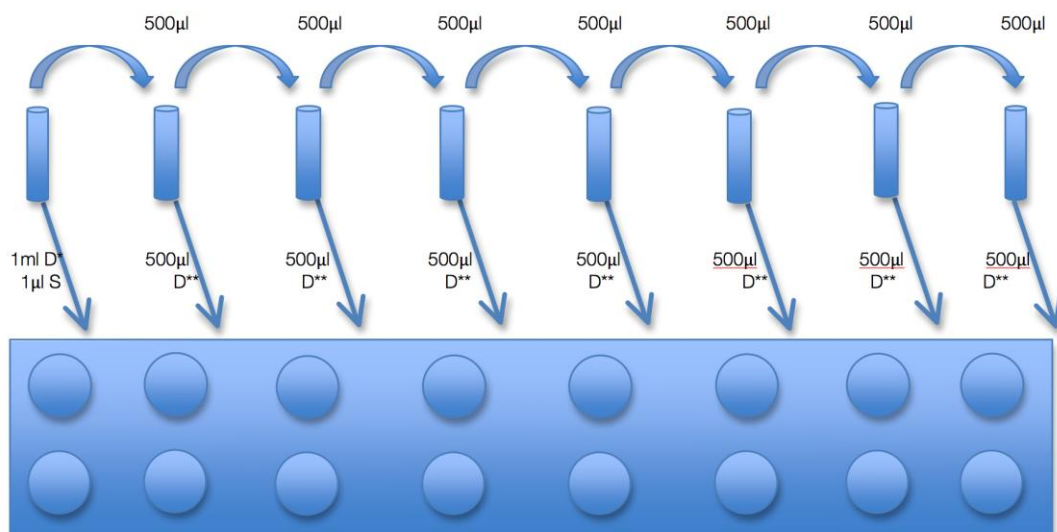


Abbildung 8: Versuchsaufbau

* In das erste Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1ml *Diluent* (D) und 1µl Standard (S) zur Herstellung der Verdünnungsreihe vorgelegt

** Jeweils 500µl *Diluent* (D) wurden in die sieben weiteren Gefäße vorgelegt

Der Standard wurde wie im Text beschrieben verdünnt und als Doppelbestimmung in die Wells der vorbereiteten ELISA-Platte pipettiert.

Im gleichen Arbeitsgang mussten jeweils 100 µl/well der zu untersuchenden Proben auf die restlichen Wells (ebenfalls als Doppelbestimmung) gegeben werden. Außerdem wurde eine Kontrolle als Doppelbestimmung in die Wells pipettiert, in denen sich jeweils nur das Medium befand und keine der zu untersuchenden Proben. Die abgeklebte Platte musste für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach den zwei Stunden wurden die

Wells entleert und erneut vier Mal gewaschen. Danach wurde der *Detection Antibody* mit dem Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 0,25 µg/ml verdünnt, davon jeweils 100 µl in jede der bestückten Wells pipettiert und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und wiederholter Reinigung durch viermaliges Waschen wurden 5,5 µl des *Avidin-HRP conjugate* auf eine Konzentration von 1:2000 mit *Diluent* verdünnt, indem es auf ein Volumen von insgesamt 11 ml aufgefüllt wurde. Jeweils 100 µl/well wurden aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden geleert, vier Mal gewaschen, auf einem Papiertuch vorsichtig abgeklopft und danach 100 µl der *ABTS Liquid Substrate Solution* in jedes Well gegeben. An dieser Stelle erfolgte die Inkubation unter visueller Kontrolle bis ein deutlicher Farbumschlag zu sehen war. Danach wurde die Reaktion mit 100 µl/well einer *ABTS Peroxidase Stop Solution* gestoppt und die Platte in einem ELISA Plate Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und 650 nm gelesen. Bei den erhaltenen Ergebnissen handelte es sich um Rohdaten in der Einheit nm. Es war erforderlich, die Ergebnisse nach der Fragestellung der zugrunde liegenden Arbeit statistisch auszuwerten.

2.8 Lösungen und Reagenzien

Medien

Ker-sfm; Keratinocyte-SFM Serum Free Medium (Gibco, Invitrogen Katalog #17005-042)

DMEM/Ham's F-12 (1:1) (Biochrom AG, F4815)

Zellkulturmedium (Ker-VM); 500ml Flasche Ker-sfm	+25µg/ml BPE
("Keratinocyten-Vollmedium")	+ 0,2ng/ml EGF
("low density" medium)	+ 0,3mM CaCl ₂
bis zu einer Konfluenz von ca. 30%	+100U/ml Penicillin
	+100µl/ml Streptomycin

Supplements for Keratinocyte-SFM Serum Free Medium (Gibco, 37000-015)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom, A2212)

Amphotericin B (PromoCell, C-42040)

L-Glutamin (Biochrom, K0282)

Das GIBCO-Ker-sfm-Kulturmedium musste - wie von Rheinwald (2005) beschrieben - modifiziert und Penicillin/Streptomycin hinzugegeben werden. Das Medium wurde entwickelt, um bei geringerer Zelldichte klonales Wachstum zu fördern. Es enthält allerdings nicht in ausreichender Menge Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, um die Keratinozyten bei höherer Dichte gesund zu erhalten. Deswegen war es essentiell, die Keratinozyten zu passagieren, bevor ihr Wachstum eine Konfluenz von 1/3 überschritten hat. CaCl₂ unterstützt optimales Wachstum, während die Zellen über die Ausbildung von Cadherin und Desmosomen Zellkontakte bilden und damit deren Kolonisierung ermöglicht wird. Vor der Verwendung des supplementierten Gibco Ker-sfm war es erforderlich, das Medium steril zu filtrieren (Porengröße des Sterilisationsfilters 0,2 µm). Das Medium konnte nach diesem Vorgang für mindestens einen Monat bei 4 °C aufbewahrt werden. Für alle Medien war es erforderlich, sie nur so kurz wie möglich Licht auszusetzen, da sich deren Qualität dadurch verschlechtert.

Passagiermedium (DF); **DMEM/Ham's F-12 + 10% FKS**

2x freezing Medium; DMEM/Ham's F-12 + 20% FKS, 20% DMSO,
2h über Nacht bei 4°C äquilibrieren, steril filtrieren
und bei -80°C lagern

Versuchsmedium (DF-K) ("high density" Medium) bis zu einer Konfluenz von 100%

DF-K Medium aus ker-sfm (250ml, ohne Supplemente) und DMEM/Ham's F-12 im
Verhältnis 1:1 gemischt

+ 25µg/ml BPE (bovine pituitary extract)

+ 0,2ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor)

+ 1,5 mM L-Glutamin

+ 100U/ml Penicillin

+ 100µl/ml Streptomycin

+ 5ml Amphotericin

Abdaulösung; GIBCO Trypsin/EDTA-Lösung, Invitrogen Katalognummer #25300062
(Trypsin Konzentration 0,05 % – 0,2 %, EDTA Konzentration 0,01 % –
0,02 % in PBS⁻ pH 7,2). Die 500 ml Flasche sollte in 40 ml/Tube
aliquotiert werden, um ein zu häufiges Auftauen und erneutes
Einfrieren zu vermeiden.

Für den Proteinnachweis

Human IL-8 ELISA Development Kit (PeproTech, Katalognummer #900-K18)

ELISA Microplates (Nunc MaxiSorp Prod. #439454)

Tween-20 (Sigma Cat. #P-7949)

BSA (Sigma Cat. #A-7030)

ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. #A3219)

ABTS Peroxidase Stop Solution (1% SDS) (KPL Cat. # 50-85-01)

Dulbecco's PBS 10x (Gibco BRL Cat. #14200-075)

Lösungen

Vor deren Herstellung war darauf zu achten, dass alle Lösungen Raumtemperatur besaßen.

PBS: 10xPBS mit sterilem Wasser (pH 7,2) verdünnt zu 1xPBS

Wash Buffer: 0,05 % Tween-20 in PBS

Block Buffer: 1 % BSA in PBS*

Diluent: 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA in PBS*

*Steril filtriert für eine Woche bei 4 °C haltbar.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Auswertung

Die Auswertung der vorliegenden Rohdaten des ELISA erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Klinische Studien“ der Abteilung Medizinische Statistik im Zentrum Informatik, Statistik und Epidemiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Bei der Hauptauswertung bzw. den statistischen Methoden wurden die deskriptiven Merkmale und Grafiken mit der Datenanalysesoftware STATISTICA Version 10 des Herstellers StatSoft erstellt. Zu der Auswertung der Hauptversuche wurde eine Varianzanalyse mit der Software SAS Version 9.3 durchgeführt. Die Varianzanalyse (ANOVA nach der englischen Bezeichnung *analysis of variance*), bildet eine große Gruppe unterschiedlicher datenanalytischer und strukturprüfender Verfahren.

3.2 Ausdruck der p-Werte

Das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests wird als p-Wert bezeichnet. A priori formulierte Hypothesen werden mit dessen Hilfe überprüft. Vor der weiteren Verarbeitung der Rohdaten wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt (Signifikanzniveau α), welche den sogenannten Fehler 1. Art (Nullhypothese) abzulehnen, obwohl sie richtig ist, begrenzt. Zu den am häufigsten gewählten Niveaus zählen $\alpha = 0,05$ und $\alpha = 0,01$. Der Wert ist nicht nur ein Maß für die Stärke des Effekts. Er ist außerdem abhängig von der Variabilität der Daten und dem Umfang der zu untersuchenden Stichprobe. Dabei gilt, je umfangreicher die Stichprobe, desto wahrscheinlicher ist es, dass man sehr kleine p-Werte erhält. Damit erscheint die statistische Signifikanz zunächst bedeutender, es kann aber auch nur ein geringer oder sogar bedeutungsloser Effekt vorliegen (Lange 2000, Bender und Lange 2007). Das Signifikanzniveau bezeichnet also die höchst zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit und wurde in allen Tests der vorliegenden Arbeit mit $\alpha = 5\%$ festgelegt. Wenn der Wert $\alpha \leq 5\%$ ist, welches einem p-Wert von 0,05 entspricht, liegt eine hohe Signifikanz des Messergebnisses vor. Bei einem Wert $> 5\%$ und $\leq 10\%$ wird das Ergebnis als schwach signifikant bezeichnet. Zusammenfassend kann man sagen, dass die

statistische Signifikanz über den p-Wert die Informationsqualität beschreibt. Diese ist umso höher, je kleiner α ist (Markel 1991).

Bei dem vorliegenden Modell waren besonders die unterschiedlichen Messwerte bezüglich der verschiedenen Konzentrationsstufen, der Zeit und der Bakterienkultur von Interesse. Dabei wurden sämtliche Kombinationen der Faktoren auf einer Platte gemessen. Die Haupteffekte haben folgende Faktorstufen:

Konzentration:	0 (Kontrolle) 1 (1:1) 10 (1:10) 100 (1:100) 1000 (1:1000)
Zeit:	6 Stunden 24 Stunden
Gruppe:	Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) Lactobacillus salivarius (L.s.).

Das Auslesen der ELISA - Platten erfolgte in einem dafür vorgesehenem Plate Reader unter den zuvor (siehe „Material und Methoden“, S. 30) beschriebenen Bedingungen und festgelegten Einstellungen des Gerätes. Nach der Messung im vorgesehenen Gerät erhält man die in der folgenden Tabelle 2 zusammengetragenen Rohdaten. Bei der Standardreihe handelt es sich um einen quantitativen Nachweis, eine Verdünnungsreihe bekannter Antigenkonzentration. Mit deren Hilfe konnte eine Kalibrierungskurve für die gemessenen Werte (optische Extinktion) angefertigt werden. Dieses Vorgehen war erforderlich, da anhand dieser Graphik die Expression des Interleukin – 8 ermittelt werden konnte. Aus den Doppelbestimmungen der dreifachen Wiederholungen wurde der Mittelwert errechnet und zur weiteren Auswertung herangezogen.

Tabelle 2: Rohdaten der Auswertung mittels ELISA

Werte als Doppelbestimmung und in dreifacher Wiederholung

II-8 ELISA

		Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5						
Gruppe 1	Platte											
	1	1.329	1.205	1.160	1.059	0.902	0.889	0.655	0.646	0.458	0.456	
	Std											
	2	0.935	0.934	0.745	0.729	0.502	0.505	0.354	0.348	0.261	0.241	
	3	1.013	1.007	0.770	0.785	0.535	0.571	0.373	0.390	0.256	0.272	
		Std 6	Std 7	Std 8	K							
		0.313	0.315	0.221	0.225	0.172	0.174	0.108	0.095			
		0.203	0.173	0.164	0.164	0.140	0.121	0.038		0.039		
		0.182	0.180	0.150	0.146	0.123	0.125	0.085		0.038		
Gruppe 2	Verd.	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	K						
	L.s.											
	4	0.718	0.688	0.831	0.798	0.813	0.782	0.295	0.381	1.011	0.933	
	5	0.717	0.695	0.659	0.649	0.684	0.636	0.421	0.406	0.703	0.687	
	6	0.697	0.713	0.654	0.655	0.640	0.647	0.409	0.378	0.716	0.706	
		Verd.	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	K					
		7	1.060	1.068	1.186	1.110	1.162	1.202	0.411	0.387	1.048	1.104
		8	0.961	0.920	1.120	1.045	0.883	0.861	0.585	0.534	0.683	0.704
		9	0.911	0.878	1.052	1.014	0.870	0.941	0.522	0.503	0.721	0.709
Gruppe 3	Verd.	1:1 6h	1:10 6h	1:100 6h	1:1000 6h	K						
	LGG											
	10	0.781	0.735	0.765	0.745	0.538	0.528	0.258	0.250	0.921	0.895	
	11	0.796	0.742	0.556	0.639	0.476	0.438	0.288	0.264	0.792	0.786	
	12	0.687	0.981	0.513	0.534	0.380	0.436	0.264	0.273	0.786	0.814	
		Verd.	1:1 24h	1:10 24h	1:100 24h	1:1000 24h	K					
		13	0.953	0.949	0.979	0.969	0.926	0.966	0.250	0.247	1.037	1.073
		14	0.882	1.132	0.929	0.871	0.851	0.691	0.496	0.219	0.957	0.878
		15	0.983	0.931	0.958	0.955	0.800	0.712	0.299	0.279	1.031	1.203

3.3 Konstruktion der Standardkurven mit Hilfe der Verdünnungsreihe

Tabelle 3: Standardisierte Werte zur Konstruktion der folgenden Kalibrierungskurven

(Graphik 1-3) mit dazugehörigen logarithmischen Konzentrationen.

Abszisse	II-8 [ng/ml]	II-8 [pg/ml]	ln	Extinktion (I ₀)		
				1	2	3
1	1	1000	6,908	1,267	0,935	1,010
2	0,5	500	6,215	1,109	0,737	0,778
3	0,25	250	5,521	0,895	0,504	0,553
4	0,125	125	4,828	0,651	0,351	0,382
5	0,0625	62,5	4,135	0,457	0,251	0,264
6	0,03125	31,25	3,442	0,314	0,188	0,181
7	0,015625	15,625	2,749	0,223	0,164	0,148
8	0,0078125	7,8125	2,056	0,173	0,131	0,124

Die Herstellung der Verdünnungsreihen wurde bereits unter dem Punkt „Material und Methoden“ (S. 35) ausführlich beschrieben. Daraus konnten die folgenden drei Standardkurven (Graphiken 1 - 3) abgeleitet werden. Die erforderlichen Konzentrationen (1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 und 0,0078125) und deren Einheit (Pikogramm pro Milliliter; pg/ml) waren von dem Hersteller des *Human II-8 ELISA Development Kit* vorgegeben und werden im Folgenden als Standardwerte bezeichnet.

Für alle der drei Kalibrierungsgraphen der entsprechenden Verdünnungsreihe war es erforderlich, die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen zu bestimmen und umzurechnen. Die Verdünnungsreihe wurde nach Anleitung des Herstellers in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) angefertigt und musste dann in die geforderte Einheit pg/ml umgerechnet werden, bevor logarithmiert und die Gerade abgeleitet werden konnte.

Da die Messwerte gewissen Schwankungen unterliegen, wurde eine einfache lineare Regression eingefügt und auf eine Interpolation verzichtet. Auch aufgrund des annähernd linearen Zusammenhangs zwischen den Messwerten und der linearen Funktion bietet sich eine Regressionsgerade statt einer Interpolation an.

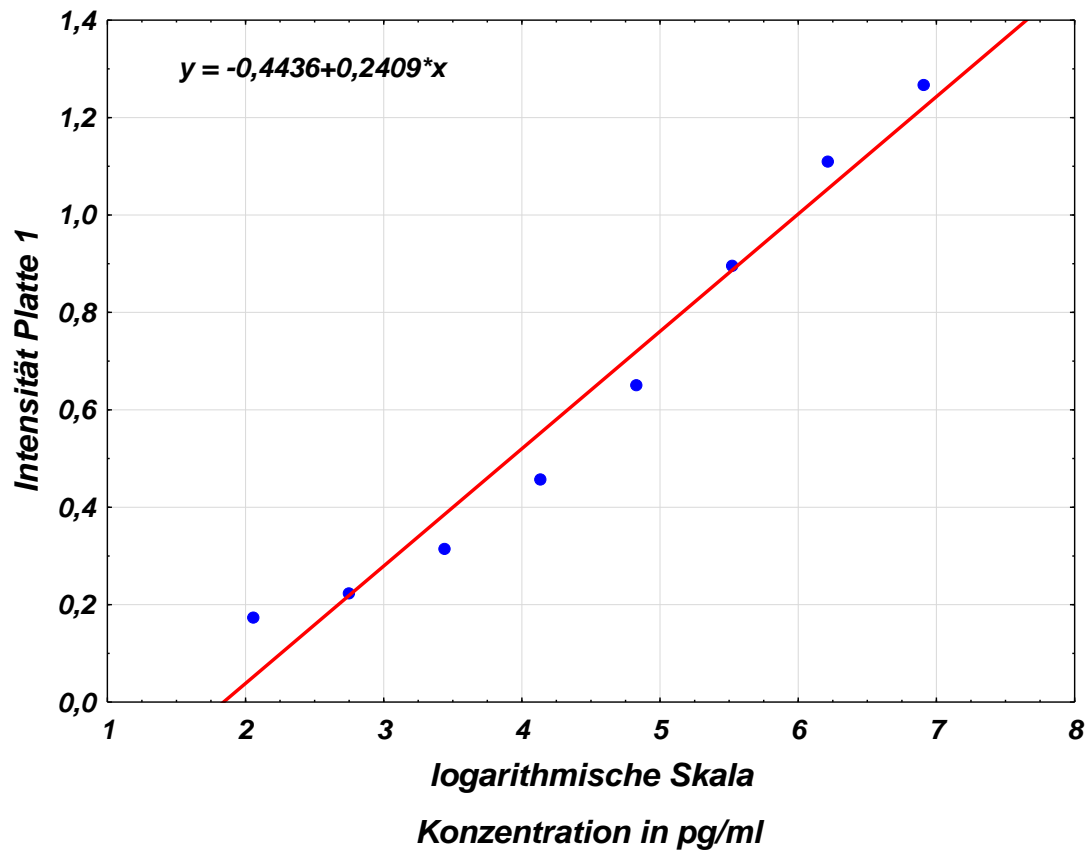
Das beschriebene Vorgehen wurde gleichermaßen für alle Standardproben durchgeführt (siehe Tabelle 3). Diese befanden sich insgesamt auf drei Platten. Mit den Ergebnissen konnte für jede Platte eine Gerade approximativ bestimmt werden. Als Folge nicht identischer Messergebnisse unterscheiden sie sich in ihrer Gleichung.

Die dazugehörige Funktion der Geraden kann auf der Graphik selbst abgelesen werden. In den drei Gleichungen steht y für die gemessene Extinktion und x für die Konzentration des Zytokins.

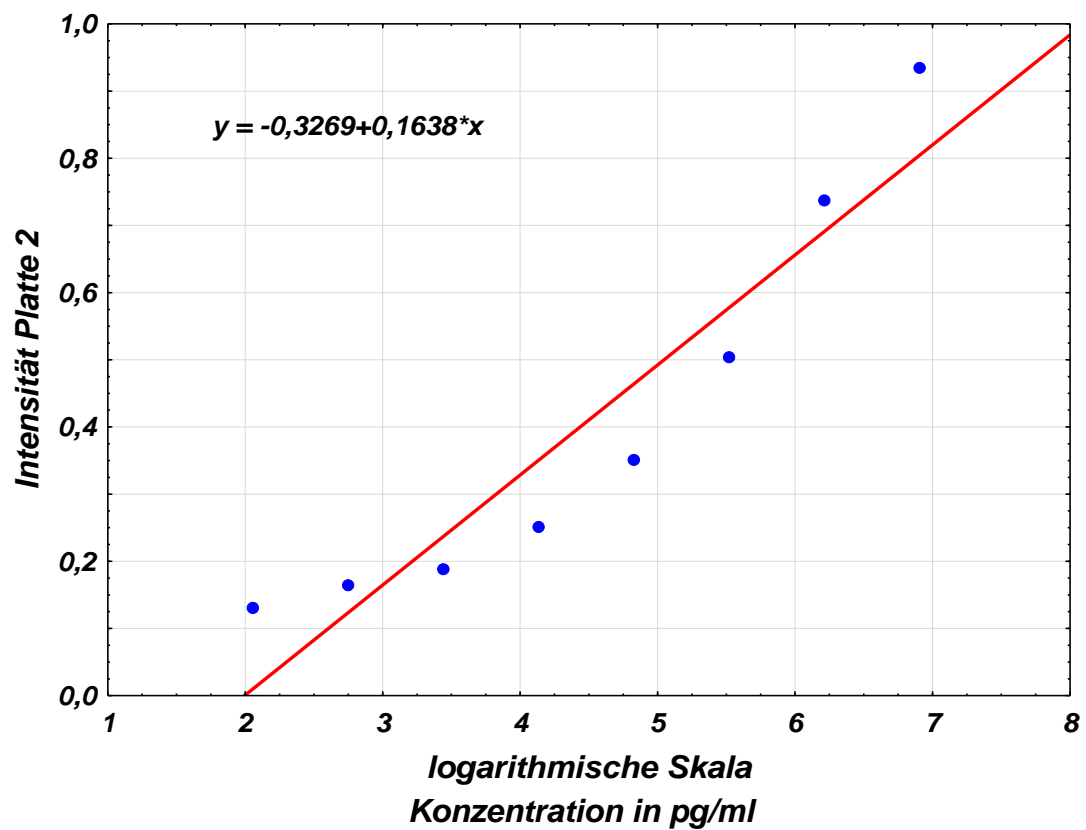
Jeweils auf der y -Achse der drei Graphen ist demnach die mittels ELISA gemessene Lichtintensität aufgetragen, welche durch eine enzymatische Farbreaktion hervorgerufen wird. Die zur Messung erforderliche Wellenlänge der Strahlung war von dem Hersteller des Kits festgelegt und sollte 405 nm betragen.

Für jede einzelne Probe der drei ELISA-Platten konnte anhand der gemessenen optischen Dichte die vorhandene Menge an IL-8 bestimmt werden, indem sie von der x -Achse bei entsprechender Intensität abgelesen wurden.

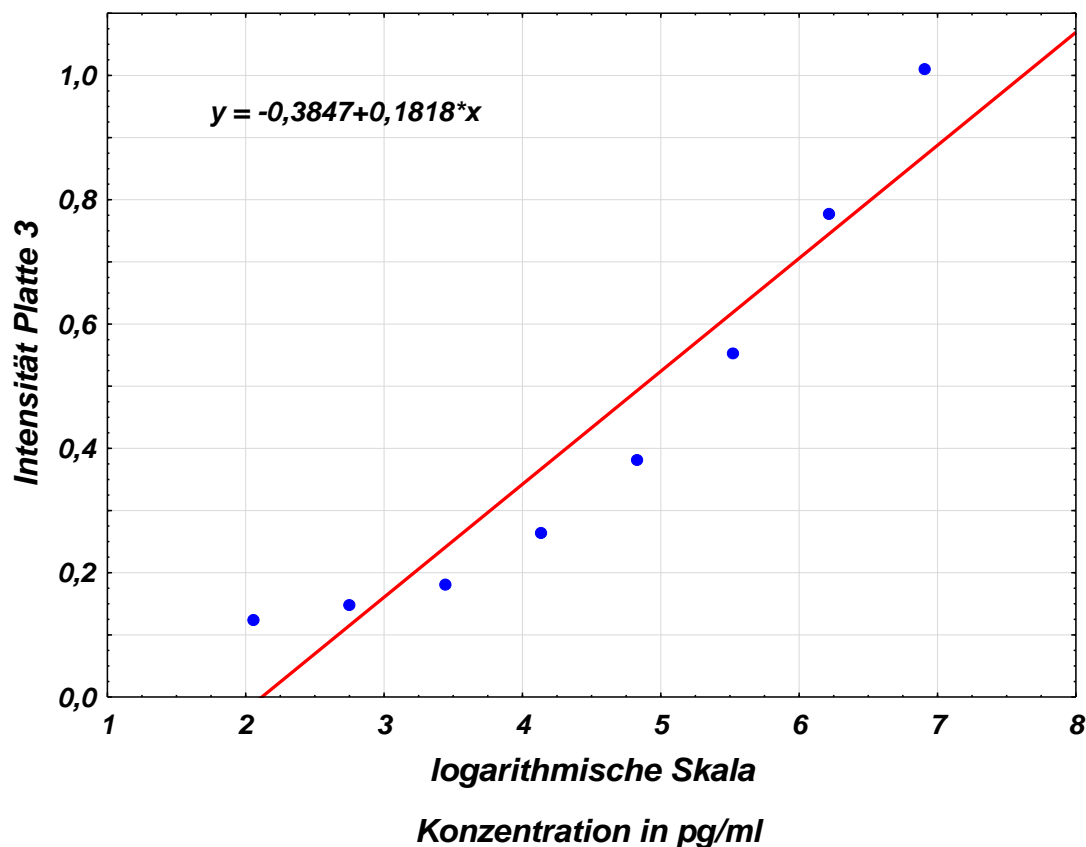
Da die abgelesenen Werte noch den logarithmierten Konzentrationen entsprachen, wurde mit Hilfe einer Exponentialfunktion zurückgerechnet, um nach nochmaliger Umrechnung die geforderte Einheit Pikogramm zu erhalten.



Graphik 1: Bei 405nm gemessene Extinktion und anhand der Standardverdünnungsreihe konstruierte Regressionsgerade



Graphik 2: Bei 405nm gemessene Extinktion und anhand der Standardverdünnungsreihe konstruierte Regressionsgerade



Graphik 3: Bei 405nm gemessene Extinktion und anhand der Standardverdünnungsreihe konstruierte Regressionsgerade

Die vorangestellten drei Abbildungen (Graphik 1-3) dienen zur graphischen Darstellung der in Tabelle 2 aufgeführten Messergebnisse. Aus ihnen kann mittels der gemessenen Lichtintensität auf die vorhandene Menge des Zytokins Interleukin-8 geschlossen werden. Für die Angabe der Menge an Il-8 gilt die vom Hersteller geforderte Einheit pg/ml.

In den Tabellen 4 und 5 wurde die Bezeichnung Gruppe für die beiden unterschiedlichen Bakterienextrakte L.s. und LGG gewählt. Die festgelegte Nummerierung der in Spalte zwei aufgeführten Versuche entspricht jener von Tabelle 2. Die Messergebnisse der Versuche 1 - 3 wurden nachfolgend nicht mehr mit aufgeführt, da es sich bei diesen um die Ergebnisse der Standardreihe handelt, welche bereits zur Ableitung der Kalibrierungsgraphen herangezogen wurden. Jeweils dieselbe Nummerierung des Versuchs stellt die Ergebnisse einer Konzentrationsreihe dar. Zu jedem Ansatz lassen sich aus den beiden Tabellen die gemessenen Extinktionswerte der Konzentrationen 0, 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 ablesen. Die Konzentration 0 kann auch als Kontrolle bezeichnet werden, deren gemessene

Konzentration die basale Menge an Il-8 wiedergibt. Bei den Extinktionswerten eines Versuches handelt es sich bereits um die errechneten Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus Tabelle 2. Die aufeinanderfolgenden Ansätze mit derselben Konzentration wurden als Dreifachbestimmung angefertigt, um damit aussagekräftigere Messergebnisse zu erhalten. In der letzten Spalte der beiden Tabellen sind die anhand der Extinktion errechneten Konzentrationen der vorhandenen Menge an Il-8 zusammengetragen.

In Tabelle 4 werden die gemessenen Extinktionswerte nach Stimulation der Keratinozyten mit L.s. für 6 Stunden (Versuch 4 – 6) und für 24 Stunden (Versuch 7 – 9) aufgezeigt.

Tabelle 4: Mittelwerte, Extinktion und standardisierte Werte der Zytokinkonzentration in pg/ml auf Grundlage der Rohdaten aus Tabelle 1 für L.s.

Gruppe	Versuch	Konzentration	Zeit in Std.	Extinktionswert Ordinate	Konzentration Abszisse
Ls	4	0	6	0,972	356,487
Ls	5	0	6	0,695	512,195
Ls	6	0	6	0,711	414,450
Ls	4	1:1	6	0,703	116,705
Ls	5	1:1	6	0,706	547,773
Ls	6	1:1	6	0,705	400,995
Ls	4	1:10	6	0,815	185,397
Ls	5	1:10	6	0,654	398,776
Ls	6	1:10	6	0,655	303,740
Ls	4	1:100	6	0,798	172,765
Ls	5	1:100	6	0,660	413,654
Ls	6	1:100	6	0,644	285,907
Ls	4	1:1000	6	0,338	25,649
Ls	5	1:1000	6	0,414	91,849
Ls	6	1:1000	6	0,394	72,279
Ls	7	0	24	1,076	548,952
Ls	8	0	24	0,694	507,526
Ls	9	0	24	0,715	423,670
Ls	7	1:1	24	1,064	522,277
Ls	8	1:1	24	0,941	2292,698
Ls	9	1:1	24	0,895	1137,176
Ls	7	1:10	24	1,148	740,178
Ls	8	1:10	24	1,083	5455,588
Ls	9	1:10	24	1,033	2436,042
Ls	7	1:100	24	1,182	852,376
Ls	8	1:100	24	0,872	1509,135
Ls	9	1:100	24	0,906	1208,107
Ls	7	1:1000	24	0,399	33,040
Ls	8	1:1000	24	0,560	223,962
Ls	9	1:1000	24	0,513	139,086

Es werden die Konzentrationen aus Tabelle 4 nach der Stimulation mit L.s. über 6 Stunden miteinander verglichen, indem man zunächst die Werte der jeweils selben Ansätze betrachtet. Bei Ansatz 4 beträgt der Extinktionswert 0,972. Dies entspricht einer Menge von 356,49 pg/ml. Die Angabe stellt die basal vorhandene Menge an Il-8 dar, ohne dass ein Stimulanz hinzugegeben wurde. Aufgrund dessen wurde die Konzentration als 0 bezeichnet und kann auch als Kontrollwert bezeichnet werden. Nach einer 1:1 Stimulation wurde über den Extinktionswert 0,703 eine Menge von 116,71 pg/ml berechnet. Bei weiterer Anhebung der Konzentration auf ein Verhältnis von 1:10 erfolgte an dieser Stelle entgegen der Erwartungen ein Anstieg der Il-8-Menge auf 185,4 pg/ml. Nach der 1:100 Stimulation wurde eine Menge von 172,76 pg/ml gemessen. Diese war damit noch immer über derjenigen, die nach erfolgter 1:1 Inkubation gemessen wurde. Erst nach erfolgtem Einsatz eines Verhältnisses von 1:1000 sinkt der Wert wieder und befindet sich mit 25,65 pg/ml weit unter der Menge, die basal vorhanden war. Die Ergebnisse des Ansatzes Nr. 5 weisen ein ähnliches, inhomogenes Muster auf, welches nicht der Erwartung entspricht, dass bei Konzentrationserhöhung des Probiotikums ein gleichmäßiges Absinken des Zytokins erfolgt. Die gemessene Il-8-Menge steigt zunächst über den basalen Wert hinaus, fällt dann bei weiterer Konzentrationserhöhung, steigt noch einmal an, um dann nach der 1:1000 Stimulation wie bei Ansatz 4 weit unter den Ausgangswert zu fallen. Betrachtet man die Ergebnisse von Versuch 6, kann man bei Konzentrationserhöhung des Keimes L.s. ein homogenes Absinken der Il-8 Menge beobachten. Die Ausgangsmenge beträgt 414,45 pg/ml, bei Erhöhung auf 1:1 401 pg/ml, bei 1:10 noch 303,74 pg/ml, bei 1:100 285,91 pg/ml und bei 1:1000 noch 72,27 pg/ml.

Die Ergebnisse nach einer 24 Stunden Stimulation mit demselben Extrakt sind ebenfalls Tabelle 3 zu entnehmen und beinhalten die Ansätze 7 – 9. Bei 8 und 9 fällt auf, dass nach einer 1:1 Stimulation die Werte zunächst über die basalen hinaus steigen und nicht wie angenommen sinken. Die höchsten Werte wurden bei einer Konzentration von 1:10 gemessen. Nach einer 1:1000 Stimulation wurde auch hier nur noch ein geringer Anteil der basal vorhandenen Menge des Zytokins gemessen.

Zur Veranschaulichung dienen die Balkendiagramme aus Graphik 4. Im Folgenden wird weiter auf die Angabe der Extinktionswerte verzichtet, diese sind den Tabellen direkt zu entnehmen.

In Tabelle 5 wurden die Ergebnisse nach gleichem Prinzip zusammengetragen. Diese beziehen sich jedoch auf die Stimulation der Zellen mit LGG. Die Versuche 10 – 12 geben dabei die gemessenen Werte nach einer Stimulationszeit von 6 Stunden wieder und die Versuche 13 – 15 analog für eine Dauer von 24 Stunden.

Tabelle 5: Mittelwerte, Extinktionen und standardisierte Werte der Zytokinkonzentration in pg/ml auf Grundlage der Rohdaten aus Tabelle 1 für LGG

Gruppe	Versuch	Konzentration	Zeit in Std.	Extinktionswert y-Achse	Konzentration in pg/ml x-Achse
LGG	10	0	6	0,908	273,316
LGG	11	0	6	0,789	909,210
LGG	12	0	6	0,800	676,209
LGG	10	1:1	6	0,758	146,637
LGG	11	1:1	6	0,769	804,705
LGG	12	1:1	6	0,834	815,271
LGG	10	1:10	6	0,755	144,822
LGG	11	1:10	6	0,598	282,440
LGG	12	1:10	6	0,524	147,762
LGG	10	1:100	6	0,533	57,625
LGG	11	1:100	6	0,457	119,787
LGG	12	1:100	6	0,408	78,280
LGG	10	1:1000	6	0,254	18,098
LGG	11	1:1000	6	0,276	39,674
LGG	12	1:1000	6	0,269	36,341
LGG	13	0	24	1,055	503,125
LGG	14	0	24	0,918	1992,349
LGG	15	0	24	1,117	3866,775
LGG	13	1:1	24	0,951	326,727
LGG	14	1:1	24	1,007	3440,829
LGG	15	1:1	24	0,957	1603,731
LGG	13	1:10	24	0,974	359,459
LGG	14	1:10	24	0,900	1790,467
LGG	15	1:10	24	0,957	1599,326
LGG	13	1:100	24	0,946	320,015
LGG	14	1:100	24	0,771	814,591
LGG	15	1:100	24	0,756	530,849
LGG	13	1:1000	24	0,249	17,690
LGG	14	1:1000	24	0,358	65,253
LGG	15	1:1000	24	0,289	40,679

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach erfolgter Stimulation mit LGG miteinander verglichen, die Werte sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Ansätze 10–12 beinhalten die gemessenen Werte nach erfolgter Stimulation über 6 Stunden und die Ansätze 13–15 geben gleiches für die Stimulation über 24 Stunden wieder.

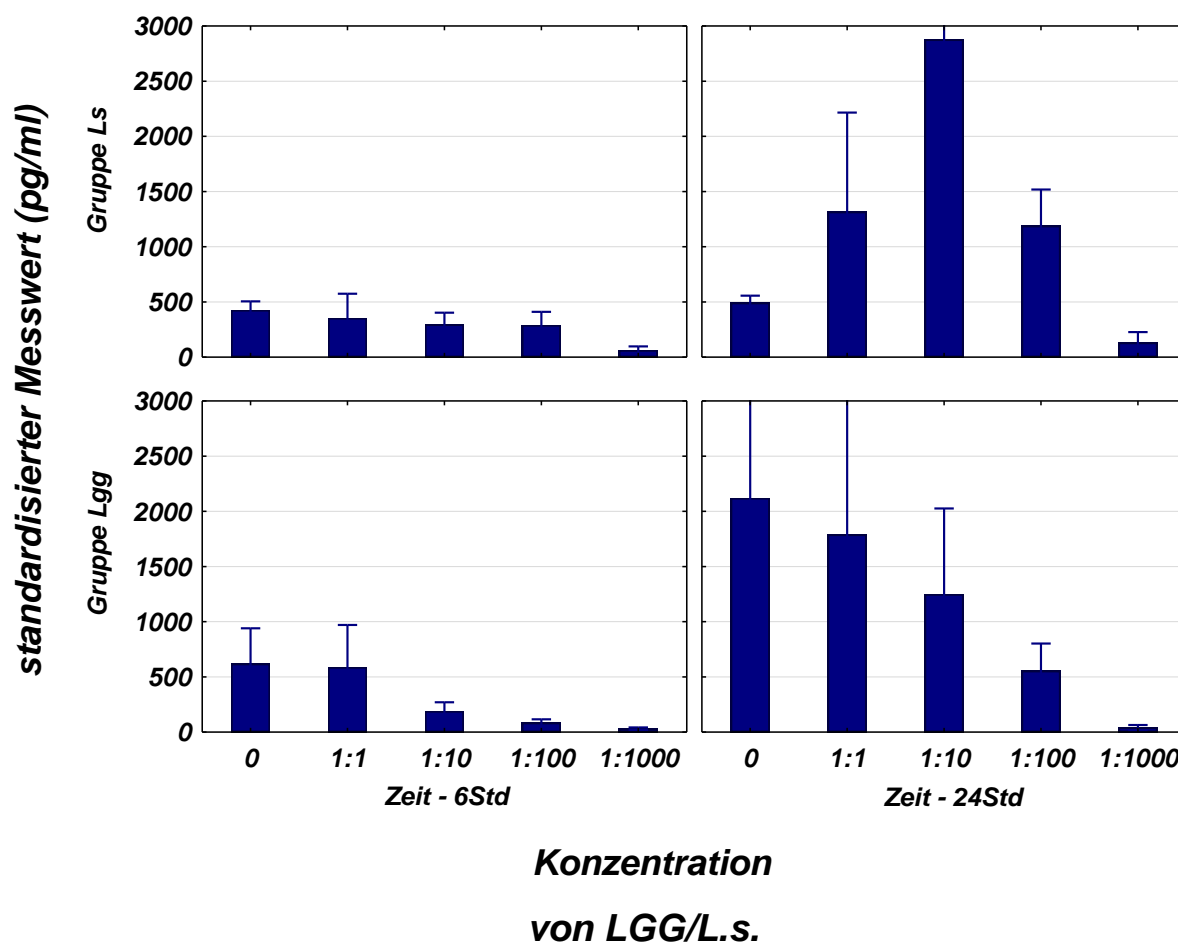
Die Zytokinmenge bei Ansatz 10 und 11 sinkt bei jeder Konzentrationserhöhung des Probiotikums. Die basale Menge beträgt bei Ansatz 10 273,32 pg/ml. Nach der Inkubation der Zellen mit dem LGG-Extrakt über 6 Stunden in einem Verhältnis von 1:1 sinkt der Wert auf 146,64 pg/ml. Nach einer Erhöhung auf 1:10 beträgt die Il-8-Menge 144,82 pg/ml, nach 1:100 noch 57,63 pg/ml und nach einer 1:1000 Stimulation wurden nur noch 18,1 pg/ml gemessen. Gleichmaßen ist bei Ansatz 11 zu beobachten, dass der Wert kontinuierlich absinkt. Nach einer 1:1 Stimulation innerhalb der Platte 12 wird zunächst ein Anstieg über die basale Menge von 676,21 pg/ml hinaus verzeichnet, und bei weiterer Anhebung auf 1:10 wieder ein Absinken auf 147,76 pg/ml, welches sich bei weiterer Konzentrationserhöhung fortsetzt. Nach einer 1:1000 Stimulation beträgt die vorhandene Menge an Il-8 nur noch 36,34 pg/ml.

Betrachtet man die Werte nach erfolgter Inkubation über 24 Stunden, ist bei Ansatz 15 bei jeder Konzentrationserhöhung ebenfalls ein Absinken auffällig. Bei Ansatz 13 und 14 steigt zwar innerhalb der Konzentrationserhöhung die gemessene Menge an Il-8, jedoch nur bei Ansatz 14 über den basalen Wert hinaus.

Vergleicht man abschließend nicht die Ergebnisse ein und desselben Versuchs bei Konzentrationserhöhung (0, 1:1, 1:10, 1:100 auf 1:1000), sondern die Ergebnisse der einzelnen Dreifachwiederholung einer Konzentration miteinander, ist auffällig, dass die Werte sehr inhomogen sind. Innerhalb einer Gruppe und einer Konzentration unterliegen viele der Ergebnisse in pg/ml großen Schwankungen. Außerdem ist eine Abhängigkeit zwischen den Werten der unterschiedlichen Ansätze und denen der gleichen Konzentration auffällig. Betrachtet man z.B. die drei Ergebnisse der Konzentration 0 von L.s. über eine Stimulationsdauer von 6 Stunden, ist der erste Wert der kleinste, der zweite der höchste und der dritte der mittlere. Gleiches gilt für die Konzentrationen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000

und kann zum Teil auch auf die Ergebnisse der 24-Stunden Stimulation mit L.s. und die 6- und 24-Stunden-Stimulation von LGG angewendet werden.

Zur Verlaufsdarstellung der gemessenen Il-8-Menge in pg/ml (Werte in Tabelle 3 und 4) bei der Erhöhung der Konzentration von L.s. bzw. LGG und einer Inkubation über 6 bzw. 24 Stunden wurden die nachfolgenden Balkendiagramme (Graphik 4) erstellt.



Graphik 4: Standardisierter Messwert von Il-8 in pg/ml (y-Achse) als Gegenüberstellung der beiden Gruppen (LGG und L.s.) in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen und den Faktor Zeit.

Zum einen verdeutlicht diese Graphik, welche Auswirkung eine Erhöhung der Konzentration von LGG/L.s. zur Stimulation von Plattenepithelzellen der Gingiva auf die Menge des gemessenen Zytokins hat, zum anderen, was eine Verlängerung der Stimulationsdauer bewirkt.

Als Erklärung dient das Säulendiagramm unten links, die drei anderen können auf die gleiche Weise gelesen werden. Dargestellt sind die gemessenen Werte von Il-8 in pg/ml (standardisierter Wert, y-Achse) nach Stimulation der Keratinozyten mit LGG. Der probiotische Stamm wurde in den unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000) auf die Zellen gegeben und über sechs Stunden inkubiert. Bei der Konzentration 0, also ohne Hinzugabe von LGG, wurde die größte Menge des Zytokins gemessen. Nimmt man eine Erhöhung der LGG-Konzentration vor, ist ein Absinken der basalen Menge an Il-8 zu verzeichnen. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass die exakt errechneten Werte über die Menge des Interleukins in pg/ml für jeden einzelnen Untersuchungsansatz den Tabellen 4 und 5 direkt zu entnehmen sind. Alle Werte nach einer 1:1000 Stimulation sind ähnlich niedrig.

3.4 Signifikanz der einzelnen Effekte, interpretiert anhand der gemessenen Menge von Interleukin-8

Tabelle 6: Drei faktorielle *Repeated-Measures-ANOVA*. Grün hinterlegt sind statistisch signifikante Ergebnisse. Gelb hinterlegt sind statistisch schwach signifikante Ergebnisse, von welchen sich eine Tendenz ableiten lässt.

	Effekt	p-Wert	Interpretation
1.	Gruppen	0.3601	Nicht signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (L.s., LGG)
2.	Konzentration	0.0023	Signifikanz bei Veränderung der Konzentration (0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000)
3.	Gruppe*Konzentration	0.0731	Nicht signifikant
4.	Zeit	0.0047	Signifikanter Unterschied bei veränderter Inkubationszeit (6h, 24h)
5.	Gruppe*Zeit	0.1758	Nicht signifikanter Unterschied
6.	Konzentration*Zeit	0.0665	Nicht signifikanter Unterschied
7.	Gruppe*Konzentr*Zeit	0.1101	Nicht signifikanter Unterschied

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 6 wurden die errechneten p-Werte zusammengetragen. Anhand derer konnte durch die gemessene Menge an Il-8 die Interpretation der Ergebnisse erfolgen. So konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Veränderung eines Effektes einen signifikanten Unterschied an der gemessenen Menge von Il-8 hervorruft.

Durch den Vergleich der beiden Gruppen L.s. und LGG (1. in Tabelle 6) wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Bakterienstämme hinsichtlich ihrer Wirkung auf die vorhandene Il-8-Menge signifikant unterscheiden.

Zwar wurden bei den Gruppen differierende Messwerte ermittelt, allerdings können diese im direkten Vergleich als nicht signifikant interpretiert werden (Graphik 4 und Tabelle 6). Die Feststellung bestätigt die der Arbeit vorangestellte Vermutung, dass das Ergebnis zur Wirkung beider Stämme ähnlich sein könnte, da es sich bei beiden um Bakterien probiotischer Stämme handelt. Dieses war von Bedeutung, um die folgenden Ergebnisse auch innerhalb der Gruppen direkt miteinander in Bezug setzen zu können.

Betrachtet man die Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Inkubationsansätze von oralen Keratinozyten mit dem Stamm L.s. bzw. LGG jeweils in einem Verhältnis von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 (2. in Tabelle 6), kann anhand der p-Werte eine Signifikanz aus den untersuchten Ergebnissen gefunden werden.

Vergleicht man jedoch LGG mit den dazugehörigen Konzentrationen von L.s. gleicher Konzentrationen (3. in Tabelle 6), ist keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Der p-Wert ist $> 5\%$ und $\leq 10\%$ und wurde in der Tabelle gelb unterlegt, da das Ergebnis noch als schwach signifikant bezeichnet werden bzw. von einer Tendenz gesprochen werden kann. Die Diskussion der Bedeutung dessen erfolgt nachstehend, wenn der Faktor Zeit hinzugezogen wird.

Die Rolle des Zeitfaktors ist bei den durchgeführten Untersuchungen als entscheidend zu bewerten. Die Inkubation der Keratinozyten erfolgte mit dem Keim LGG über 6 Stunden und über 24 Stunden, analog mit L.s. ebenfalls für 6 und 24 Stunden. Der Vollständigkeit

halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass keine Inkubation der Zellen mit beiden Stämmen gleichzeitig erfolgte.

Bei dem isolierten Vergleich der vorhandenen Menge des Zytokins nach einer Inkubationszeit von 6 und 24 Stunden ist demnach eine Signifikanz zu verzeichnen (Punkt 4 in Tabelle 6). Daraus folgt, dass nach veränderter Inkubationszeit ein Unterschied in der gemessenen Menge von Il-8 vorliegt. Stellt man jedoch die Ergebnisse der beiden Gruppen nach der Inkubation mit oralen Keratinozyten hinsichtlich des Faktors Zeit gegenüber, wurden durch die vorhandene Menge an Il-8 nicht signifikante Unterschiede festgestellt (5. in Tabelle 6). Die Tendenz der gemessenen Zytokinmenge ist gleich. Innerhalb beider Gruppen sinken die Werte bei deren Konzentrationserhöhung. Dieses Ergebnis kann durch die zugrundeliegende Vergleichbarkeit beider Gruppen erklärt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse, wenn die Konzentrationen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 den Inkubationszeiten von 6 bzw. 24 Stunden gegenübergestellt werden, ist eine schwache Signifikanz das Resultat, denn der p-Wert beträgt 0,0665 und ist somit wieder $> 5\%$ und $\leq 10\%$. Das heißt, dass innerhalb beider Gruppen eine ähnliche Tendenz der gemessenen Zytokinmenge resultiert, wenn über die gleiche Zeit stimuliert wurde. Bei beiden sinkt die gemessene Menge an Il-8, wenn die Konzentration des probiotischen Extrakts erhöht wird.

Nicht bezeichnend ist der Unterschied, wenn man die Faktoren „Gruppe“, „Konzentration“ und „Zeit“ als Einheit betrachtet und miteinander vergleicht (Punkt 7 in Tabelle 6). Dies ist wieder durch die Analogie der beiden probiotischen Stämme hinsichtlich ihrer Wirkung zu erklären und bedeutet, dass sich die ausgewählten Stämme miteinander vergleichen lassen.

Aus den beiden folgenden Tabellen lässt sich für die beiden Haupteffekte ein Maß für die Streuung ablesen.

Tabelle 7: Werte für den Haupteffekt Konzentration

Konzentration	Mittelwert	Std. Abweichung
0	915.355	1034.77
1:1	1012.96	992.496
1:10	1153.67	1554.33
1:100	530.258	471.337
1:1000	66.967	60.714

In Tabelle 7 wurden die Mittelwerte zu dem Haupteffekt „Konzentration“ eingetragen. Durch diese wird veranschaulicht, dass bei einer Erhöhung der Konzentration von LGG/L.s. von 0 bis auf 1:1000 die gemessene Menge an Il-8 sinkt.

Tabelle 8: Werte für den Haupteffekt Zeit

Zeit	Mittelwert	Std. Abweichung
6 Std	294.96	252.589
24 Std	1176.72	1279.00

Für den Haupteffekt „Zeit“ gilt, dass bei einer Erhöhung der Stimulationsdauer von 6 auf 24 Stunden größere Mengen von Il-8 gemessen wurden (Tabelle 8).

4 Diskussion

4.1 Zell- und Bakterienkultivierung

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die TERT - immortalisierte humane orale Keratinozytenzelllinie OKF6/TERT-2 verwendet. Die Zellen wurden von dem *Harvard Skin Disease Research Center, Cell Culture & Microscopy Core* erworben. Sie wurden nach Anleitung aufgetaut, zur Vermehrung ausgesät und nach Passagierung erneut eingefroren. Dabei war es erforderlich, dass die Zellen subkultiviert wurden, bevor sie eine Konfluenz von $\frac{1}{3}$ erreichten. Während dieser Phase der Arbeit konnten Erfahrungen im Umgang mit den Zellen, mit ihrem Wachstumsverhalten, der Morphologie und den für die einzelnen Durchführungen erforderlichen Medien gemacht werden. Dem Zellkulturmedium wurde eine geringe Menge an Kalzium zugesetzt, um ein optimales Wachstum der OKF6/TERT-2-Zellen zu gewährleisten. Wachsen Zellen z.B. in einem Medium mit zu niedrigem Kalziumgehalt (0,15 mM), bilden sich innerhalb der Zellkontakte keine Desmosomen aus und es kommt lediglich zu einer Vernetzung der Zellen über Papillen. Erhöht man den Kalziumgehalt, wird die Verbindung zu benachbarten Zellen über Desmosomen hergestellt (Oda und Watson 1990, Huang et al. 1998). Außerdem kann durch den Kalziumgehalt des externen Mediums die Motilität von Fibroblasten beeinflusst werden. Diese könnten Bestandteil der entnommenen Probe sein und eine Verunreinigung darstellen. Über deren intrazellulären Kalziumgehalt kann die Kontraktilität der enthaltenen Proteine kontrolliert, die Motilität der Fibroblasten verringert und so ein Überwachsen der Keratinozyten mit diesen verhindert werden (Gail et al. 1973, Goldfine et al. 1981).

Außerdem wurde serumfreies Medium zur Kultivierung verwendet, mit welchem die Zellen weniger differenziert wachsen sollten (Papaioannou et al. 1999). Zur Durchführung der Versuche war es erforderlich, das Kulturmedium gegen ein Versuchsmedium auszutauschen. Dieses sollte das Wachstum und somit die Vitalität der Zellen bis zu einer Konfluenz von 100% gewährleisten. Es war außerdem darauf zu achten, dass die Keratinozyten nicht länger als acht Tage subkultiviert wurden, auch wenn sie bis dahin die gewünschte Konfluenz noch nicht erreicht hatten. Wurden die Zellen länger kultiviert, waren sie schlechter mit Trypsin/EDTA zu lösen und konnten weniger erfolgreich erneut

ausgesät werden. Die Zellen einer gesunden und gut wachsenden Population stellten sich im Mikroskop als kleine Zellen dar, die laut Protokoll des *Harvard Skin Disease Research Center* eine Verdoppelungszeit von ungefähr 24 bis 40 Stunden aufweisen sollten, welche auch bei uns beobachtet werden konnte. Mittlere bis große Keratinozyten werden zu schnell alt bzw. waren zu alt. Der Anteil solch alternder Zellen in Kultur steigt kontinuierlich an.

Die verwendeten Bakterienextrakte wurden von der Medizinischen Hochschule Hannover, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde bezogen. Dabei handelte es sich um die beiden apathogenen probiotischen Stämme *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus GG*.

Während der Zellkultur wurde berücksichtigt, dass zur Durchführung der Stimulation keine Zellen verwendet wurden, welche eine Konfluenz von $\frac{1}{3}$ überschritten oder mehr als acht Tage kultiviert wurden. Damit wurde das Risiko möglicher Differenzierungen innerhalb der Zellen gering gehalten.

Zur eigentlichen Versuchsdurchführung, dem Versetzen der Zellen mit den Stimulanzen, war es erforderlich, die Zellen bis auf eine höhere Konfluenz heranwachsen zu lassen. Das Zellkulturmedium musste durch das Versuchsmedium ausgetauscht werden, angeleitet durch das Protokoll zur Kulturmethode der Zellen von der Arbeitsgruppe um Jim Rheinwald der *Harvard Medical School* (Rheinwald 2005). Durch sie war bekannt, dass eine höhere Konfluenz der Zellen ein Medium mit einer höheren Konzentration an Nährstoffen erforderlich macht, um weiteres Wachstum zu gewährleisten.

Bei dem Versuchsmedium handelte es sich um eine 1:1 Mischung des Zellkulturmediums *ker-sfm* (*low-density-Medium*) mit einem Medium, das als DF-K (*high-density-Medium*) bezeichnet wurde. DF-K wurde hergestellt, indem kalzium- und glutaminfreies DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit Ham's F-12 im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Dieses wurde supplementiert durch das Hinzufügen vorgegebener Mengen an BPE (*Bovine Pituitary Extract*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin. Vor der Stimulation wurde das Zellkulturmedium durch das Versuchsmedium ersetzt.

Nach 24 Stunden erfolgte das Hinzufügen probiotischer Extrakte bekannter Konzentration und die Inkubation dessen über 6 bzw. 24 Stunden. Durch die Aminosäure L-Glutamin sollte während der Stimulationsdauer eine ausreichende Sekretion der Zellen bei gleichzeitiger Begrenzung des Wachstums sichergestellt werden.

Dongari-Bagtzoglou und Kashleva arbeiteten innerhalb ihrer Untersuchungen zu der Entwicklung eines hoch reproduzierbaren, dreidimensionalen oralen Mukosamodells ebenfalls mit den Zellen, welche für die vorliegende Arbeit herangezogen wurden. Sie beschreiben in dieser, dass es mehrere Untersuchungsansätze gibt, um die Reaktion der menschlichen Mundschleimhaut auf äußere Reize in vitro zu untersuchen. Kurzlebige Zellen haben demnach im Allgemeinen eine geringere metabolische Kapazität als aktiv wachsende Zellen in vivo. Außerdem weisen sie eine variable konstitutive und induzierbare Expression von Proteinen auf, welche auch Spenderabhängig zu sein scheint (Dongari-Bagtzoglou und Kashleva 2006).

4.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis sezernierter Proteine wird das antikörperbasierte Nachweisverfahren ELISA als konventionelle Methode angesehen. Werden durch diese Methodik Zytokine nachgewiesen, müssen sich die Proteine auch in der Probe befinden (mRNA wird nicht gemessen). Durch Stadnyk wurde 1994 bestätigt, dass die Ergebnisse des ELISA jedoch keine Aussage darüber treffen, ob das gebildete Zytokin auch biologische Aktivität aufweist. Diese Erkenntnis muss bei der Beurteilung der Ergebnisse eingeschlossen werden. Auf der anderen Seite fehlt es bei Nachweisverfahren für die biologische Aktivität eines Stoffes oft an der nötigen Spezifität und sie sind in vielerlei Hinsicht anfällig für nichtspezifische Inhibitoren (Stadnyk 1994, Cannon et al. 1993).

Für die quantitative Messung wurden die Proben als Doppelbestimmung aufgetragen. Bei der Auswertung erfolgte zunächst die Berechnung der Mittelwerte, mit welchen im Weiteren gerechnet wurde. Diese Vorgehensweise erfolgte als Mehrfachanalyse (dreifach) an unterschiedlichen Tagen, um die Präzision der Ergebnisse zu überprüfen.

4.3 Auswertung

Die Fragestellung dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob die Gabe von probiotischen Bakterienextrakten auf orale Zellen eine Auswirkung auf die vorhandene Menge an Il-8 hat. Das Ergebnis ist ein messbarer Unterschied der Zytokinmenge bei nicht stimulierten Zellen zu denen, die mit Probiotika stimuliert wurden.

Die Entscheidung, welche Stimulanzen Teil der Untersuchung werden sollten, fiel auf *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus salivarius*, da beide zu den meist untersuchten Bakterien probiotischer Stämme zählen (Riboulet-Bisson et al. 2012, Yli-Knuutila et al. 2006). Lebende probiotische Bakterien oral aufzunehmen, um die Gesundheit zu verbessern, ist eine Methode mit langer, historischer Entwicklung. Als man anfing, sich für die Dinge zu interessieren, welche die Gesundheit der intestinalen Flora positiv beeinflussen könnten, stieg gleichermaßen das Interesse an einer neuen Therapieform mit Probiotika (Macfarlane und Cummings 2002).

Sie werden im Allgemeinen als lebende Mikroorganismen beschrieben, die einen positiven Effekt auf die Gesundheit desjenigen haben, der sie eingenommen hat (Broussard und Surawicz 2004). Als sogenannte Nahrungsergänzungsmittel gewinnt so ihre medizinische Relevanz an Bedeutung. Im Intestinum sind Probiotika z.B. in der Lage, ein übermäßiges Wachstum von pathogenen Bakterien zu unterdrücken, die Resistenz des Darms gegenüber bakteriellen Pathogenen zu steigern und Krankheitsprozesse positiv zu beeinflussen (Schlee et al. 2008). Verabreicht man z.B. einem Säugling eine Milchnahrung mit *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus thermophilus*, sinkt die Häufigkeit einer akuten Diarrhoe (Saavedra et al. 1994). Für eine Colitis ulcerosa ist typisch, dass die Bakterienflora im Darm von der physiologischen abweicht und ein Mangel an Mukosa-assoziierten Milchsäurebakterien vorliegt (Zhang M et al. 2007). Innerhalb der letzten Jahre erfolgten zahlreiche Studien zur Prävention und zur Behandlung von Durchfallerkrankungen, speziell bei Kindern, aber auch bei Erwachsenen. Dabei waren die am häufigsten verwendeten Probiotika *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* ssp, *Streptococcus* ssp und die Hefe *Saccharomyces boulardii*.

Die meisten der Untersuchungen liefern einen klaren Beweis für einen dosisabhängigen Nutzwert der beiden effektivsten Stämme *Lactobacillus GG* und *Saccharomyces boulardii* (Guandalini 2011). Eine Studie zeigte, dass speziell LGG vor Antibiotika-induzierten Diarrhoen schützen kann, indem inhibitorische Substanzen freigesetzt werden, die das Überwachsen pathogener Bakterien verhindern (Siitonen et al. 1990). Innerhalb dieser Studie wurde 16 gesunden Männern zwischen 18 und 24 sieben Tage lang das Antibiotikum Erythromycin verabreicht. Die Hälfte der Männer konsumierte parallel dazu einen Joghurt/Tag, der mit 125 ml *Lactobacillus GG* angereichert war, wohingegen die andere Hälfte einen Placebojoghurt erhielt. Die *Lactobacillus-GG*- Gruppe hatte genau zwei Tage eine Diarrhoe, die Placebogruppe acht.

Gegenstand zweier anderer Studien war der therapeutische Effekt von LGG bezüglich Patienten mit einer periodisch auftretenden Infektion durch *Clostridium difficile*, einem der häufigsten Krankenhauskeime, welcher unter besonderen Umständen lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen hervorrufen kann (Biller et al. 1995, Gorbach et al. 1987). Das Ergebnis beider Studien war, dass die Gabe von LGG die Patienten vor der sonst immer wieder auftretenden Infektion bewahrte. Allerdings wurde keine Kontrollgruppe mit in die Untersuchungen einbezogen und die Zahl der Patienten war sehr gering (n=5 und 4).

Eine Reisediarrhoe wird als solche bezeichnet, wenn innerhalb von 24 Stunden drei oder mehr Passagen ungeformten Stuhls auftreten, bezogen auf Menschen, die normalerweise in industrialisierten Ländern leben und in tropische oder semitropische Regionen reisen. Betroffen sind 20–50 % der Reisenden (Ericsson und DuPont 1993). Innerhalb zweier Studien wurde untersucht, ob die Verabreichung von *Lactobacillus GG* das Auftreten einer Reisediarrhoe verhindern kann. Bei 820 Reisenden in zwei Ferienorten in der Türkei betrug die Inzidenz einer Diarrhoe 43 % (178 von 418 Teilnehmern) in der Kontrollgruppe und 38 % (153 von 402) in der *Lactobacillus-GG*- Gruppe (Oksanen et al. 1990). Die Ergebnisse beider Ferienorte werden in der Arbeit miteinander verglichen, sie weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Allerdings wiesen die Probanden des einen Urlaubsortes nach einer Behandlung mit LGG eine signifikant reduzierte Inzidenz einer Diarrhoe von 24 % (17 von 71) auf, in der Placebogruppe betrug sie 40 %, dieses entspricht 30 von 76

Teilnehmern. Der Autor der Arbeit schlussfolgert, dass *Lactobacillus GG* das Auftreten einer Reisediarrhoe reduzieren kann.

Die im Handel erhältlichen Präparate werden in Form von Kapseln oder Pulvern, im Joghurt, als joghurtähnliche Produkte oder Milch verkauft. Sie überleben die Passage in den Gastrointestinaltrakt und üben dort einen mehr oder weniger starken positiven Effekt aus (de Roos und Katan 2000). Die genannten Quellen verdeutlichen, dass Gegenstand der meisten wissenschaftlichen Arbeiten die Wirkung probiotischer Bakterien im Gastrointestinaltrakt ist. So gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt wenig wissenschaftliche Texte, welche die Wirkung probiotischer Stämme auf die orale Gesundheit zum Thema haben; auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

Bezogen auf die vorliegende Arbeit kam es nach der Stimulation der Zellen zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen Zytokinmenge, verglichen mit der basal gemessenen Menge. Vergleicht man die Ergebnisse hinsichtlich der beiden probiotischen Stämme miteinander, bestätigt sich die vorangestellte Vermutung, dass beide Bakterien eine ähnliche Wirkung haben. Erklärt wird dies durch die Verwendung zweier Bakterien, welche sich hinsichtlich ihrer Stammzugehörigkeit nicht unterscheiden. Zwar handelt es sich bei LGG und L.s. um probiotische Bakterien, es kann aber nicht generell behauptet werden, dass sich alle Bakterien dieser Art bezüglich ihrer Eigenschaften gleichen.

Nimmt man bei beiden Extrakten (LGG, L.s.) eine Veränderung in der Konzentration vor, resultiert ein p-Wert von 0,0023 und somit ein deutlich signifikantes Ergebnis. Für die nach einer Stimulation gemessene Menge an Il-8 ist es also von Bedeutung, in welcher Menge ein Extrakt auf die Zellen gegeben wird. Verglichen mit der basalen Menge des Zytokins kommt es bei der Zugabe der Extrakte im Verhältnis 1:1 zu einem Absinken der Zytokinmenge. Bei weiterer Erhöhung über 1:10 und 1:100 auf 1:1000 sinkt Il-8 weiter ab. Das kann bedeuten, dass die eingesetzten probiotischen Stämme die vermutete entzündungsmodulierende Eigenschaft, nämlich die Inhibition des Zytokins Il-8 aufweisen. Außerdem ist ein adjuvanter Effekt zu verzeichnen, wenn die Extrakte in höherer Konzentration hinzugegeben werden. Die Zytokinmenge sinkt mit jeder weiteren Konzentrationserhöhung.

Je mehr von den einzelnen Extrakten auf einen Keratinozyt einwirken können, desto größer scheint die Inhibition der Il-8-Sekretion.

Fedorak und Madsen fassten 2004 in ihrer Arbeit über Probiotika und deren Einsatz bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die dosisabhängige Wirkweise innerhalb verschiedener therapeutischer Einsätze diverser Bakterien zusammen. Aufgeführt ist unter anderem eine Studie zur Wirksamkeit von LGG bei Kindern mit Morbus Chron. In dieser wurde 4 Kindern 2×10^{10} Lactobacillus GG zweimal täglich in Tablettenform verabreicht und das über 6 Monate verteilt. Die Ergebnisse zeigten, dass Lactobacillus GG die Barrierefunktion im Darm verbessern kann (Gupta et al. 2000).

Gegenwärtig steht außer Frage, dass Epithelzellen bei deren Schädigung oder einer Entzündung mit einer verstärkten Sekretion von Zytokinen beginnen. Stadnyk hat bereits 1994 beschrieben, dass Epithelien unterschiedlicher Herkunft unter gewissen Umständen beginnen, Zytokine zu sezernieren, denen pleiotrope Effekte zugeschrieben werden. Während entzündlicher Prozesse befindet sich die Produktion der Zytokine auf dem höchsten Niveau. Wenn man demnach die epitheliale Zytokinproduktion beeinflussen könnte, würde das entzündliche Erkrankungen besser kontrollierbar machen (Stadnyk 1994). Die Entwicklung und Funktion der Epithelzellen wird beeinflusst von deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix und Basallamina (Lin und Bissell 1993). Diese Interaktion kann auf zwei verschiedene Arten und Weisen erfolgen; zum einen über die Bindung spezifischer Adhäsionsmoleküle, die sich als Komponente auf der Oberfläche befinden, um Proteine und Glykosaminoglykane zu konstituieren; zum anderen über eine Rückmeldung an mit der extrazellulären Matrix assoziierten Molekülen, einschließlich der Zytokine (Jiang et al. 2012).

Der Effekt „Zeit“ hat den p-Wert 0,0047 und kann als stark signifikant bezeichnet werden. Verlängert man die Inkubationszeit der Keratinozyten mit dem jeweiligen Extrakt, kommt es zu einer veränderten Menge des Zytokins. Verglichen wurden zunächst die 6-Stunden-Werte einer Gruppe mit den 24-Stunden-Werten derselben Gruppe. Die Ergebnisse von einer Stimulation mit LGG über 24 Stunden entsprechen den Erwartungen und sinken bei Konzentrationserhöhung auf gleiche Weise. Zur Signifikanz trägt jedoch bei, dass die basale

Zytokinmenge von LGG nach 24 Stunden, verglichen mit der von LGG über 6 Stunden, fast um das Dreifache erhöht ist. Aufgrund der höheren basalen Menge des Zytokins erfolgt bei Zugabe des LGG-Extrakts und dessen Konzentrationserhöhung eine Reduktion der gemessenen Il-8-Menge in größeren Schritten. Das heißt, der Differenzbetrag von der basalen Menge des Zytokins zu der Menge, die nach 6 Stunden und einer 1:1 Stimulation gemessen wurde, ist bei der 24-Stunden-Stimulation um ein Vielfaches höher. Bei jeder Konzentrationserhöhung von LGG wurde nach der Stimulation über 24 Stunden ein Rückgang der gemessenen Il-8-Menge verzeichnet, die von größerem Ausmaß war als die Differenzen innerhalb der Konzentrationserhöhung über 6 Stunden. Das bedeutet, dass auch wenn eine größere Menge an Il-8 vorliegt, die Reduktion des Zytokins nach der Stimulation im Verhältnis annähernd proportional stattfindet. Je mehr Zytokin als Ausgangsmenge gemessen wird, desto größer ist die Abnahme nach der Stimulation. Entscheidend ist, dass nach jeder 1:1000 Stimulation, unabhängig von der ursprünglichen Menge, fast kein entzündungsförderndes Il-8 mehr zu messen ist. Die mögliche Relevanz hinsichtlich des klinischen Einsatzes beruht darauf, dass, wenn eine ausreichend hohe Konzentration von 1:1000 als Stimulanz eingesetzt wird, man unabhängig von der Stimulationszeit gleiche Ergebnisse erhält.

Erwartungsgemäß ist die Zytokinmenge nach einer 1:1000 Stimulation über 6 und 24 Stunden etwa gleich niedrig. Bei den Keratinozytenstimulationen mit L.s. über 6 Stunden und mit LGG über 6 und 24 Stunden fällt die gemessene Menge an Il-8 bei Konzentrationserhöhung nach gleichem Muster. Der dazugehörige p-Wert von der Kombination der Effekte Konzentration x Zeit beträgt 0,0665 und wird als nicht signifikant bezeichnet. An dieser Stelle kann jedoch von einer schwachen Signifikanz gesprochen werden, da die Ergebnisse der gemessenen Il-8-Menge nach einer Stimulation der oralen Zellen mit L.s. über 24 Stunden nicht den Erwartungen entsprechen und ein anderes Muster aufzeigen. Das heißt, nicht die basale Menge weist hier den höchsten Messwert auf, sondern die Il-8-Menge nach einer 1:10 Stimulation. Bis zu diesem steigt die Il-8-Konzentration signifikant und fällt ab 1:100 erneut ab. Dieses entspricht nicht dem Muster der anderen Ergebnisse und kann nicht in ausreichendem Maß geklärt werden. Möglich könnte an dieser Stelle eine Fehlerfortpflanzung sein, welche mathematisch durch das Gauß'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz beschrieben wird. Dieses beruht auf der Annahme,

dass wenn bereits zum frühen Zeitpunkt fehlerbehaftete Eingangsgrößen bestimmt werden, sich im weiteren Verlauf Fehler hinzuaddieren, und das Endergebnis dementsprechend von dem richtigen abweicht. Mögliche Fehler können systematischer oder zufälliger Art sein oder auf Messgerätefehler zurückgehen; es können aber auch mehrere fehlerbehaftete Größen gleichzeitig auftreten.

Schlee et al. (2008) bestätigten in ihren Untersuchungen zur Induktion von β -Defensin 2 durch probiotische Laktobazillen und VSL#3 (ein Cocktail aus vier probiotischen Laktobazillen, drei Bifidum- und einer Streptococcus-Spezies) eine zeit- und dosisabhängige Wirkweise von Probiotika. Abbildung 10 (a) zeigt einen Höchststand der Expression von hBD-2-mRNA nach 6 h Inkubation mit Caco-2-Zellen, ein bemerkenswertes Absinken der Konzentration und ein Erreichen der basalen Menge nach 12 Stunden. Sie zeigen außerdem, dass die Induktion von hBD-2 dosisabhängig erfolgt (b). Die niedrigste Konzentration von 1×10^6 Bakterien pro ml übt keinen Effekt auf die hBD-2 Expression aus. Erst eine Konzentration von 1×10^7 /ml hat einen induzierenden Effekt.

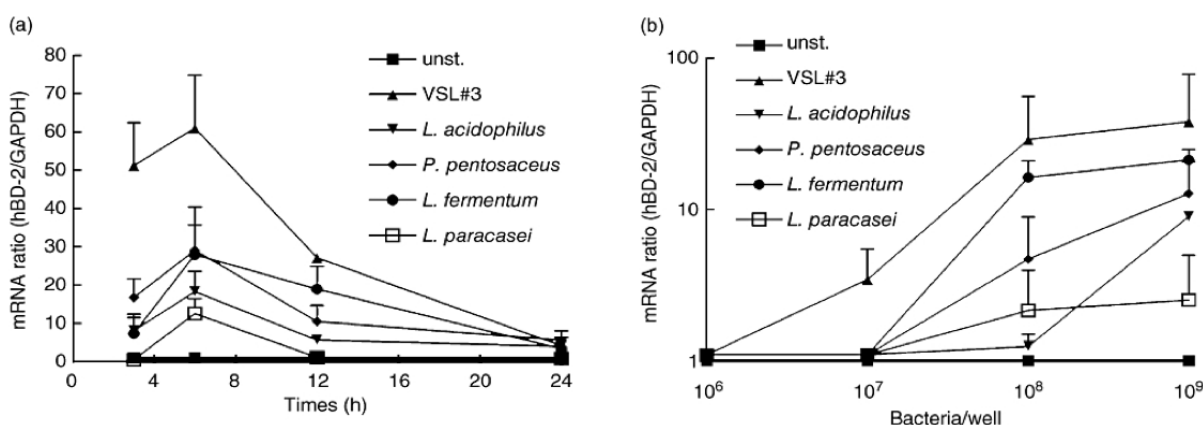


Abbildung 9: (a) Probiotika aktivieren zeitabhängig hBD-2)-Promotor
(b) Stimulation der Caco-2-Zellen mit $10^6 - 10^9$ hitzeinaktivierten Bakterien pro ml (Schlee et al. 2008)

4.4 Einfluss einzelner Faktoren auf das Vorhandensein von Il-8

Es war von Interesse, nach einer Stimulation oraler Keratinozyten mit probiotischen Extrakten zu untersuchen, ob sich der basal vorhandene Wert an Il-8 verändert. Außerdem sollte untersucht werden, in welcher Weise sich z.B. eine Konzentrationserhöhung der

Extrakte oder eine Verlängerung der Stimulationsdauer auf die vorhandene Menge des Zytokins auswirkt. Gearbeitet wurde mit Extrakten zweier probiotischer Stämme.

Eine basale Produktion von Il-8 wurde zum früheren Zeitpunkt bereits durch diverse Autoren bestätigt (Kiss et al. 1999, Sfakianakis et al. 2001a/b). Dies konnte auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Die Ergebnisse geben keinen Verlauf der Sekretion wieder, sondern nur die zu einem Zeitpunkt gemessene Menge an Interleukin-8 nach einer Stimulation oraler Keratinozyten mit probiotischen Bakterienextrakten. Würde man noch weitere Stimulationen mit anderen Konzentrationen oder anderen probiotischen Extrakten durchführen, bzw. Veränderungen der Stimulationsdauer vornehmen, sind aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit differierende Werte zur gemessenen Menge an Il-8 zu erwarten.

Interleukin-8 gehört zu der CXC-Chemokinfamilie, eine Gruppe kleiner Zytokine, welche von Makrophagen und anderen Zelltypen, wie Epithel- und Endothelzellen, sezerniert werden. Außerdem werden sie als pro-inflammatorische Zytokine bezeichnet. Diese sind innerhalb einer Immunantwort in der Lage, durch bestimmte Botenstoffe die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems einzuleiten und damit entzündungsbedingte Erkrankungen zu verursachen bzw. zu fördern. Il-8 wird auch als *Monocyte Derived Neutrophil-Chemotactic Factor* bezeichnet. Es ist wie kein anderes Zytokin in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und gehört mit zu den Hauptmediatoren der inflammatorischen Antwort (Wolff et al. 1998). Die Hauptfunktion besteht in der Ausführung der Chemotaxis, eine durch Freisetzung von Signalmolekülen eingeleitete Rekrutierung von Zellen des Immunsystems an den Ort der entzündlichen Reaktion. Bei der positiven Chemotaxis bindet ein Chemokin an spezifische Rezeptoren von Makrophagen oder Granulozyten, welche daraufhin Pseudopodien ausbilden und sich amöboid zum Ort des Geschehens fortbewegen.

Werden die immunmodulierenden Zellen von dem Entzündungsort wegrecrutiert, wird dies als negative Chemotaxis bezeichnet (Modi et al. 1990, Kohidai und Csaba 1998).

Aufgrund dieser bedeutenden Faktoren wurde Il-8 zum Gegenstand dieser Arbeit gemacht. Es tritt häufig in Verbindung mit entzündlichen Prozessen auf und spielt z.B. eine entscheidende Rolle als Signalstoff bei der meist bakteriell verursachten Erkrankung des

Zahnfleischs, Gingivitis (Lee et al. 2012, Ertugrul et al 2012). Die Interleukin-8-Sekretion wird verstärkt durch oxidativen Stress, weitere Entzündungszellen werden rekrutiert und anhand der Parameter der Mediatoren kann der Ort der Entzündung lokalisiert werden (Vlahopoulos et al. 1999).

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass anti-inflammatorische Zytokine (wie z. B. Il-10 und Transformierender Wachstumsfaktor- β) zu einer Reduktion der entzündlichen Reaktion beitragen. Solche anti-inflammatorischen Proteine werden von Th₂-Zellen produziert und hemmen in Folge die Synthese von Th₁-Zytokinen. Aus diesem Grund wurde Il-10 in der Vergangenheit zunächst als Cytokine Synthesis Inhibitory Factor bezeichnet (Fiorentino et al. 1989) und erst 1990 in Interleukin-10 umbenannt (Moore et al. 2001). Il-10 besitzt, wie schon der veralteten Bezeichnung entnommen werden kann, eine suppressive Wirkung auf Entzündungen, indem es die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Phagozyten inhibiert.

Eine Erklärung der Bedeutung dessen, angewendet auf die orale Gesundheit des Menschen, kann an dieser Stelle nicht mit ausreichender Sicherheit erfolgen und sei aufgrund dessen im Folgenden nur spekulativ erwähnt, da die Versuche in vitro vorgenommen wurden. Würde man in vivo vergleichbare Ergebnisse erhalten, so könnte man annehmen, dass durch die Einwirkung eines probiotischen Extraktes auf Keratinozyten der Mundhöhle entzündliche Prozesse in ihrem Verlauf inhibiert werden könnten. Den probiotischen Stämmen könnte so, ähnlich dem Zytokin Interleukin-10, eine anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben werden.

Dieses kann durch die vorliegende Arbeit nicht hinreichend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Der beschriebene denkbare Effekt und dessen Bedeutung für den klinischen Einsatz probiotischer Extrakte wird im Folgenden noch einmal aufgegriffen und diskutiert.

4.5 Bedeutung des oralen Biofilms

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass es, um einen anti-inflammatorischen Effekt zu erzielen, von Bedeutung ist, in welcher Konzentration und über

welche Zeit die probiotischen Bakterien auf die Zellen einwirken. Demzufolge könnte wiederum aus klinischer Sicht angenommen werden, dass es von signifikanter Bedeutung ist, in welcher Konzentration das Stimulanz auf die Zellen gegeben wird und über welchen Zeitraum die Stimulation erfolgt. Wird ein Probiotikum in höherer Konzentration auf Zellen gegeben, reduziert sich die gemessene Menge an Il-8. Erfolgt die Stimulation nicht über 6 Stunden, sondern über 24, ist die Reduktion von Il-8 um ein Vielfaches höher.

Erkenntnisse über die Wirkung von Probiotika in Bezug auf die orale Gesundheit liegen in geringer Anzahl vor und sind erst seit wenigen Jahren Thema medizinischer Forschung. Nach Jahren des genannten erfolgreichen Einsatzes zur Reduktion gastro-intestinaler Beschwerden sind sie gegenwärtig zunehmend Thema in der Zahnheilkunde. Ihr Einsatz zur Förderung der oralen Gesundheit resultierte auch aus der besonderen Unbedenklichkeit, mit der sie verwendet werden können. Möglichkeiten zur Verabreichungsform müssen weiter diskutiert werden, wie z.B. deren denkbarer Einsatz in Kaugummis oder Lutschtabletten (Meurman und Stamatova, 2007).

Studien berichten über einen möglichen antikariogenen Effekt von Probiotika und über deren denkbaren Einsatz zur Behandlung von Erkrankungen des Zahnhalteapparates (Flichy-Fernandez et al. 2010). Im Mund können Probiotika einen Biofilm bilden, der für die vorkommenden Gewebe einen schützenden Belag gegen orale Erkrankungen darstellt. Der Biofilm hält z.B. pathogene Bakterien von den Geweben fern. In Abwesenheit des Biofilms können Pathogene in die Gewebe eindringen. Der Biofilm konkurriert so mit den kariogenen und parodontal pathogenen Bakterien (Hannig und Hannig 2010, Vitkov et al. 2005, Caglar et al. 2005, Comelli et al., 2002).

Probiotika können die Menge von *Streptococcus mutans*, einem Leitorganismus der Zahnkaries, reduzieren (Nase et al. 2001, Nikawa et al. 2004).

Ergebnisse einer in vitro Studie zeigen, dass *Lactobacillus GG* die Kolonisation von kariogenen Pathogenen inhibiert, wodurch die Inzidenz einer Karies bei Kindern reduziert wird (Ahola et al. 2002). Nase et al. berichten 2001 in ihrer Studie, dass Kinder, welche Milch trinken, die mit dem probiotischen Keim LGG versetzt wurde, gegenüber der

Kontrollgruppe, deren Milch keine Probiotika enthält, ebenfalls eine reduzierte Kariesanfälligkeit aufweisen.

Grudianov et al. (2002) verabreichten ihren Probanden probiotische Tabletten innerhalb einer Studie zur Gingivitis und verschiedenen Formen der Parodontitis. Das Ergebnis war eine Reduktion der vorliegenden entzündlichen Erkrankungen.

In einer weiteren Studie benutzten 42 gesunde Patienten ein Kaugummi, welches das Probiotikum *Lactobacillus reuteri* enthielt. Bei den Ergebnissen war das deutlich reduzierte Volumen an Sulkusfluid auffällig, außerdem die reduzierten Level von TNF-alpha sowie Interleukin-8 und die signifikant reduzierten Blutungen (Twetman et al. 2009).

4.6 Das Konzept Full Mouth Disinfection (FMD)

Den aufgeführten Studien entsprechend ist ein gezielter klinischer Einsatz bestimmter Probiotika denkbar. So z.B. bei dem Vorliegen von bakteriell bedingten entzündlichen Erkrankungen, welche die Mundschleimhaut oder das Parodontium betreffen. Probiotika könnten auch als ergänzendes Mittel des Konzepts *Full Mouth Disinfection* (FMD) eingesetzt werden. Ein Konzept, innerhalb dessen im Therapieverlauf einer Parodontitis eine Desinfektion aller oralen Strukturen mit vorgegebenen Hilfsmitteln (z.B. Chlorhexidin) durchgeführt wird (Keller et al. 2012).

Die FMD wird als Erweiterung der Initialbehandlung von parodontalen Erkrankungen verstanden, um den Therapieerfolg zu maximieren und außerdem die Gefahr einer Reinfektion zu minimieren. Entscheidend ist die Einhaltung der vorgegebenen Schritte, wie die Anwendung ganz bestimmter Lösungen zur Desinfektion und die unbedingt erforderliche Compliance des Patienten (Aimetti et al., 2012).

Diverse orale Nischen - wie die Zunge oder die Tonsillen - erschweren die sorgfältige Keimzahlreduktion in der Mundhöhle und bieten den Bakterien optimale Refugien, aus denen heraus sie auch nach einer gründlichen Reinigung die Zähne und das Zahnfleisch erneut besiedeln können. Diese entstandenen Lücken bei der supragingivalen Plaquekontrolle führen zur subgingivalen Rekolonisierung und dem Wiederauftreten

entzündlicher Veränderungen. Das Konzept der *Full Mouth Disinfection* basiert zum einen auf verschiedenen wissenschaftlichen Publikationen (Eberhard et al. 2008, Quirynen et al. 2006), zum anderen auf langfristigen praktischen Erfahrungen in Ausbildung und Klinik. Jedoch kann verglichen mit der herkömmlichen Behandlung einer Parodontitis kein zusätzlicher positiver Effekt innerhalb des Therapieverlaufes aufgeführt werden (Kinane und Papageorgakopoulos 2008). Beide Therapieformen existieren somit nebeneinander und können adäquat durchgeführt zu dem Heilungsprozess dieser Erkrankung beitragen.

Der Einsatz von Probiotika kann außerdem dazu beitragen, eine Halitosis zu kontrollieren. Nach einer Aufnahme von *Weissella cibaria*, ist eine reduzierte Menge an flüchtigen organischen Schwefelverbindungen, produziert von *Fusobacterium nucleatum*, messbar (Kang et al. 2006). Dieses könnte aus der Fähigkeit von *Weissella cibaria* resultieren, Wasserstoffperoxid zu bilden, welches wiederum das *Fusobacterium nucleatum* inhibiert. *Streptococcus salivarius* hat ebenfalls inhibierende Wirkung auf flüchtige Schwefelverbindungen. Das als opportunistisch pathogen eingestufte Bakterium konkurriert um die Kolonisierung mit den Schwefelwasserstoff-produzierenden Arten (Burton et al. 2005).

Eine *Candida albicans* gehört außerdem zu den führenden Infektionen der Mundhöhle. Am häufigsten tritt die Pilzerkrankung bei älteren und immunsupprimierten Patienten auf. Das Ergebnis einer Studie zu diesem Thema zeigte eine reduzierte Prävalenz der Erkrankung nach dem Verzehr von Käse, welcher die probiotischen Stämme *Lactobacillus GG* und *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS* enthielt (Hatakka et al. 2007).

Verhindert man durch den Einsatz von Probiotika das Voranschreiten einer Entzündung in der initialen Phase, wäre ein denkbarer positiver Nebeneffekt, den Einsatz systemisch wirkender Antibiotika zu reduzieren. So könnte versucht werden, die gegenwärtig immer häufiger auftretenden Resistenzen zu dezimieren.

Da jede Entzündung im Körper auch einen negativen Effekt auf die allgemeine Gesundheit haben kann, ist es von besonderem Interesse, Entzündungsfreiheit zu erlangen. Das besonders gut durchblutete Gewebe der Mundhöhle ist ständigen mechanischen Reizen und bakteriellen Einflüssen ausgesetzt. Entzündetes Gewebe ist hyperämisch und

bakterielle Erreger gelangen bei kleinsten Verletzungen, z.B. beim Zähneputzen oder bei der Anwendung von Zahnseide in den Blutkreislauf. Bevorzugt bei Menschen mit prädisponierenden Faktoren wie eine bereits durchgemachte Endokarditis oder dem Vorliegen eines zyanotischen Herzfehlers kann dies vor allem bei Kindern zu einer Bakteriämie führen (Al-Karaawi et al. 2001).

An dieser Stelle sei noch einmal auf Zhang et al. hingewiesen. Sie beschreiben in ihren Untersuchungen zur Il-8 Degradation, dass epitheliale Zellen die primäre Barriere für Infektionen, welche durch parodontale Pathogene induziert werden, darstellen. Die Produktion chemotaktischer Zytokine, Il-8 eingeschlossen, stelle einen Mechanismus des Wirts dar, um auf Infektionen dieser Art zu reagieren. In der Studie wurde herausgefunden, dass gingivale und orale Epithelzellen Il-8 produzieren. Allerdings konnte nach einer Infektion mit dem parodontal pathogenen Keim *Porphyromonas gingivalis* keine Akkumulation des Zytokins gemessen werden. Durch die Northern Blot Analyse wurde bewiesen, dass auch infizierte Epithelzellen dennoch Il-8 mRNA exprimieren, suggerierend, dass das Zytokin nach der Sekretion eliminiert werde (Rizzo et al. 2012).

4.7 Schlussfolgerung

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach der Stimulation oraler Keratinozyten mit probiotischen Extrakten ein Absinken der basal vorhandenen Menge an Il-8 in vitro messbar ist. Ein entscheidendes Element bei dem Einsatz der ausgewählten Bakterien ist die Abhängigkeit vom Faktor „Zeit“, also über welche Dauer die Bakterien auf die Zellen einwirken können und in welcher Konzentration diese zur Stimulation aufgebracht werden.

Das Ergebnis scheint klinisch jedoch nicht relevant. Es tritt zwar eine Veränderung der Zytokinmenge ein, jedoch ist diese sehr gering und unterliegt auch innerhalb der einzelnen Gruppen gewissen Schwankungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die

probiotischen Extrakte nur sehr limitiert an einem entzündlichen Geschehen in der Mundhöhle teilnehmen würden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob nach einer Stimulation oraler Keratinozyten mit probiotischen Extrakten eine messbare Veränderung der basal vorhandenen Menge des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 stattfindet. Wenn durch die Gabe eines Probiotikums eine veränderte Zytokinmenge hervorgerufen wird, könnte es im Übertragenen bedeuten, das Stimulans nehme Einfluss auf die orale Gesundheit. Auf diese Hauptfrage zurückkommend kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse postuliert werden, dass die beiden ausgewählten Bakterienextrakte einen Effekt auf ein entzündliches Geschehen ausüben könnten, indem sie ein Absinken der basalen Menge von Il-8 induzieren. Allerdings kann die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gegebenheiten in vivo mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden und sind aus diesem Grund nicht ohne weiteres auf die Gegebenheiten im Mund anwendbar.

Nach einer Stimulation der oralen Keratinozyten mit einem probiotischen Extrakt ist ein Absinken der basal vorhandenen Zytokinmenge zu verzeichnen. Je höher das Verhältnis gewählt wurde, in welchem das Probiotikum auf die Zellen gegeben wurde, desto größer war der erfasste Rückgang. Zwar konnte eine zeit- und dosisabhängige Reduktion von Il-8 beobachtet werden, jedoch waren die ermittelten Ergebnisse eher inhomogen und insgesamt von der Menge sehr gering, so dass abschließend keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden können. Ein weiterer möglicher Untersuchungsansatz wäre, vor der Inkubation der Zellen mit den Extrakten eine entzündliche Veränderung - z.B. durch eine zusätzliche Gabe von Endotoxinen - hervorzurufen, um mit höheren Ausgangswerten von Il-8 arbeiten zu können, und so die Ergebnisse in ihrer Aussagekraft positiv zu beeinflussen. Zur Fortführung dieses Gedankenganges wäre ein größerer Stichprobenumfang von Vorteil.

Möchte man einen denkbar positiven Effekt der probiotischen Extrakte klinisch nutzen, um z.B. entzündliche Veränderungen innerhalb der Mundhöhle zu beeinflussen, ist es notwendig, zusätzliche Untersuchungen in vivo durchzuführen, um zu schauen, ob eine orale Gabe den gleichen Effekt hat.

6 Literaturverzeichnis

- Adams MR** (1999): Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotech* 68, 171-178
- Ahola AJ**, Yli-Knuuttila 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
- Aimetti M**, Romano F, Guzzi N, Carnevale G (2012): Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol* 39, 284-294
- Al-Karaawi ZM**, Lucas VS, Gelbier M, Roberts GJ (2001): Dental procedures in children with severe congenital heart disease: a theoretical analysis of prophylaxis and non-prophylaxis procedures. *Heart* 85, 66-68
- Allen SJ**, Crown SE, Handel TM (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820
- 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
- Baron JM**, Holler D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK (2001): Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 116, 541-548
- Bazan JF**, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* 385, 640-644
- Bender R und Lange S**: „Was ist der p-Wert?“ – Artikel Nr. 7 der Statistik-Serie in der DMW – What is the p-value?; Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen, Köln; 132: e15 – e16 *Dtsch Med Wochenschr* 2007
- Biller JA**, Katz AJ, Flores AF, Buie TM, Gorbach SL (1995): Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21, 224-226
- Bischoff SC**: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, S. VII, 76-89, 108-109, 151
- Bondarenko VM** (2006): [Applied aspects of molecular biology of Bifidobacteria and *Lactobacillus*]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2, 89-97
- Broussard EK**, Surawicz CM (2004): Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutr Clin Care* 7, 104-113

Bunout D, Barrera G, Hirsch S, Gattas V, de la Maza MP, Haschke F, Steenhout P, Klassen P, Hager C, Avendano M, Petermann M, Munoz C (2004): Effects of a nutritional supplement on the immune response and cytokine production in free-living Chilean elderly. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28, 348-354

Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR (2005): The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Dis* 1, 29-31

Caglar E, Kargul B, Tanboga I (2005): Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis* 3, 131-137

Campanelli R, Palermo B, Garbelli S, Mantovani S, Lucchi P, Necker A, Lantelme E, Giachino C (2002): Human CD8 co-receptor is strictly involved in MHC-peptide tetramer-TCR binding and T cell activation. *Int Immunol* 14, 39-44

Cannon JG (2000): Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci* 15, 298-303

Cannon JG, Nerad JL, Poutsiaika DD, Dinarello CA (1993): Measuring circulating cytokines. *J Appl Physiol* 75, 1897-1902

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (2000): Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *J Food Prot* 63, 1369-1376

Clyne B, Olshaker JS (1999): The C-reactive protein. *J Emerg Med* 17, 1019-1025

Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser JR (2002): Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci* 110, 218-224

De Keersmaecker SC, Braeken K, Verhoeven TL, Perea Velez M, Lebeer S, Vanderleyden J, Hols P (2006): Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for response to defensins. *Appl Environ Microbiol* 72, 4923-4930

de Roos NM, Katan MB (2000): Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 71, 405-411

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

Dietrich A: Untersuchungen zur Biotransformation in der Haut am Beispiel der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Erfassung fremdstoffmetabolischer Enzymaktivitäten zur

Charakterisierung der Cytochrom- Isoenzyme der Familie 1A/ 1B und 4A. Diplomarbeit - Math.-Nat.- Tech.-Fak. MLU Halle- Wittenberg 2005

Dinarelo CA (1991): Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77, 1627-1652

Donadio S, Monciardini P, Sosio M (2007): Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep* 24, 1073-1109

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H (2006): Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc* 1, 2012-2018

Doron S, Gorbach SL (2006): Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4, 261-275

Eberhard J, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington H, Jepsen S (2008): Full-mouth treatment concepts for chronic periodontitis: a systematic review. *J Clin Periodontol* 35, 591-604

Enk CD, Mahanty S, Blauvelt A, Katz SI (1996): UVB induces IL-12 transcription in human keratinocytes in vivo and in vitro. *Photochem Photobiol* 63, 854-859

Ericsson CD, DuPont HL (1993): Travelers' diarrhea: approaches to prevention and treatment. *Clin Infect Dis* 16, 616-624

Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A (2012): Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 48, 44-51

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

Fedorak RN, Madsen KL (2004): Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 10, 286-299

Fernandez EJ, Lolis E (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469-499

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095

Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Penarrocha-Oltra D, Penarrocha-Diago M (2010): Probiotic treatment in the oral cavity: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15, e677-680

- Fraser IP**, Koziel H, Ezekowitz RA (1998): The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10, 363-372
- Fux CA**, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005): Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13, 34-40
- Gail MH**, Boone CW, Thompson CS (1973): A calcium requirement for fibroblast motility and proliferation. *Exp Cell Res* 79, 386-390
- Garcia-Lloret MI**, Ignacio Santos J (1990): [Cytokines and their role as health and disease mediators. New approaches to old problems]. *Bol Med Hosp Infant Mex* 47, 797-808
- Gardiner GE**, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK, Ross RP, Stanton C (2000): Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol* 66, 2605-2612
- Gibson GR**, Fuller R (2000): Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr* 130, 391S-395S
- Goldfine SM**, Schroter EH, Izzard CS (1981): Calcium-dependent shortening of fibroblasts induced by the ionophore, A23187. *J Cell Sci* 50, 391-405
- Goldin BR**, Gorbach SL (2008): Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis* 46, 96-100
- Gorbach SL**, Chang TW, Goldin B (1987): Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* 2(8574), 1519
- Gourbeyre P**, Denery S, Bodinier M (2011): Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol* 89, 685-695
- Grudianov AI**, Dmitrieva NA, Fomenko EV (2002): [Use of probiotics Bifidumbacterin and Acilact in tablets in therapy of periodontal inflammations]. *Stomatologiya (Mosk)* 81, 39-43
- Guandalini S** (2011): Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 45 Suppl, S149-153
- Gupta P**, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S (2000): Is *Lactobacillus GG* helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31, 453-457
- Hall-Stoodley L**, Costerton JW, Stoodley P (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108

- Hamilton-Miller JM** (2003): The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* 22, 360-366
- Hamilton-Miller JM**, Gibson GR, Bruck W (2003): Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *Br J Nutr* 90, 845
- Hannig C**, Hannig M (2010): Natural enamel wear--a physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Med Hypotheses* 74, 670-672
- Hatakka K**, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, Korpela R (2007): Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly--a randomized controlled trial. *J Dent Res* 86, 125-130
- Hehlgans T**, Pfeffer K (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20
- Horn F**, Armbruster M, Berghold S, Blaeschke F, Grillhösl C, Helferich S, Moc I, Pritsch M, Schneider N, Ziegler P: *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, S. 408, 409, 410, 411
- http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/20044/a_s099b.gif; Zugriff am 19.02.2012, 19h10
- <http://2011.igem.org/wiki/images/1/17/Biofilmdevelopment.jpg>; Zugriff am 05.03.2012, 10h13
- http://www.nhl-info.de/infopool/images/Immunantwort_2.jpg; Zugriff am 11.02.2012, 22h37
- http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf; Zugriff am 06.01.2013, 21h28
- http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA#cite_note-3; Zugriff am 19.02.2012, 20h
- Huang GT**, Haake SK, Kim JW, Park NH (1998): Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol* 13, 301-309
- Iliev ID**, Tohno M, Kurosaki D, Shimosato T, He F, Hosoda M, Saito T, Kitazawa H (2008): Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCTGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand J Immunol* 67, 370-376
- Isaacs A**, Lindenmann J (1987): Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 7, 429-438

- Jiang Y**, Lu X, Man C, Han L, Shan Y, Qu X, Liu Y, Yang S, Xue Y, Zhang Y (2012): Lactobacillus acidophilus induces cytokine and chemokine production via NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol* 19, 603-608
- Kang MS**, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS (2006): Inhibitory effect of Weissella cibaria isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 33, 226-232
- Keller MK**, Hasslof P, Dahlen G, Stecksén-Blicks C, Twetman S (2012): Probiotic supplements (Lactobacillus reuteri DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries Res* 46, 140-146
- Kinane DF**, Papageorgakopoulos G (2008): Full mouth disinfection versus quadrant debridement: the clinician's choice. *J Int Acad Periodontol* 10, 6-9
- Kirjavainen PV**, Salminen SJ, Isolauri E (2003): Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36, 223-227
- Kiss M**, Kemeny L, Gyulai R, Michel G, Husz S, Kovacs R, Dobozy A, Ruzicka T (1999): Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone on the IL-8/IL-8 receptor system in a cultured human keratinocyte cell line and dermal fibroblasts. *Inflammation* 23, 557-567
- Klein G**, Pack A, Bonaparte C, Reuter G (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41, 103-125
- Kohidai L**, Csaba G (1998): Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular Tetrahymena pyriformis. *Cytokine* 10, 481-486
- Koster MI** (2009): Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 7-10
- Kroemer G**, Moreno de Alboran I, Gonzalo JA, Martinez C (1993): Immunoregulation by cytokines. *Crit Rev Immunol* 13, 163-191
- Kupper TS** (1990): Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86, 1783-1789
- Kürschner U**: Untersuchungen zur Toxizität und Biotransformation an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Nat. Diss. Halle/ Saale 2007
- Laing KJ**, Secombes CJ (2004): Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28, 443-460
- Lang F**, Lang P: Basiswissen Physiologie. 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2007, S. 15f.

- Lange S** (2000): Statistische Signifikanz und klinische Relevanz. *Z Hautkr* 75, 225-229
- Lee A**, Ghaname CB, Braun TM, Sugai JV, Teles RP, Loesche WJ, Kornman KS, Giannobile WV, Kinney JS (2012): Bacterial and salivary biomarkers predict the gingival inflammatory profile. *J Periodontol* 83, 79-89
- Lin CQ**, Bissell MJ (1993): Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 7, 737-743
- Ljunggren HG**, Karre K (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244
- Lodinova-Zadnikova R**, Sonnenborn U (1997): Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate* 71, 224-232
- Lodinova-Zadnikova R**, Tlaskalova H, Bartakova Z (1991): The antibody response in infants after colonization of the intestine with *E. coli* O83. Artificial colonization used as a prevention against nosocomial infections. *Adv Exp Med Biol* 310, 329-335
- Lotz M** (1995): Interleukin-6: a comprehensive review. *Cancer Treat Res* 80, 209-233
- Luger TA**, Schwarz T, Krutmann J, Kock A, Urbanski A, Kirnbauer R (1990): Cytokines and the skin. *Curr Probl Dermatol* 19, 35-49
- Lüllmann-Rauch R**: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, S. 38-39, 342-343, 359, 519-528
- Macfarlane GT**, Cummings JH (2002): Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 15, 501-506
- Mach T** (2006): Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. *J Physiol Pharmacol* 9, 23-33
- Madison KC** (2003): Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231-241
- Markel MD** (1991): The power of a statistical test. What does insignificance mean? *Vet Surg* 20, 209-214
- Marks JG**, Miller JJ: Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology. 4. Auflage; W.B.Saunders Co., Michigan 2006, S. 213ff.
- Marteau P**, Shanahan F (2003): Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 725-740

- McCarthy J**, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F (2003): Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52, 975-980
- McFarland LV**, Dublin S (2008): Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 14, 2650-2661
- Metcalf D** (1986): The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67, 257-267
- Meurman JH**, Stamatova I (2007): Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* 13, 443-451
- Modi WS**, Dean M, Seuneez HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ (1990): Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet* 84, 185-187
- Montrose DC**, Floch MH (2005): Probiotics used in human studies. *J Clin Gastroenterol* 39, 469-484
- Moore KW**, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765
- 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
- Newman MG**, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA: *Carranza's Clinical Periodontology*. 9. Auflage; W.B.Saunders Co., Philadelphia 2006, S. 201-212, 221-226, 343-248, 391-394
- Nikawa H**, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takemoto T, Aimi R (2004): *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 95, 219-223
- Oda D**, Watson E (1990): Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 589-595
- Oksanen PJ**, Salminen S, Saxelin M, Hamalainen P, Ihantola-Vormisto A, Muurasniemi-Isoviita L, Nikkari S, Oksanen T, Porsti I, Salminen E, et al. (1990): Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med* 22, 53-56
- Owsianowski M**, Busch FW, Bonnekoh B, Orfanos CE (1991): Long-term cultured adult human keratinocytes secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin-3 after cytokine exposure in vitro. *Skin Pharmacol* 4, 158-164

- Pan Y**, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D (1997): Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387, 611-617
- Papaoannou W**, Cassiman JJ, Van den Oord J, De Vos R, van Steenberghe D, Quirynen M (1999): Multi-layered periodontal pocket epithelium reconstituted in vitro: histology and cytokeratin profiles. *J Periodontol* 70, 668-678
- Peran L**, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J (2005): Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 11, 5185-5192
- Prakash S**, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A (2011): The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J Biomed Biotechnol* 2011, 981214
- Proksch E**, Brandner JM, Jensen JM (2008): The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-1072
- Quirynen M**, Teughels W, van Steenberghe D (2006): Impact of antiseptics on one-stage, full-mouth disinfection. *J Clin Periodontol* 33, 49-52
- Rassow J**, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie. MLP Duale Reihe. 2. Auflage*; Thieme Verlag, Stuttgart 2008, S. 645, 650, 692-710, 730f.
- Reid G** (2008): Probiotic Lactobacilli for urogenital health in women. *J Clin Gastroenterol* 2, 234-236
- Rheinwald JG** (2005): *Human Keratinocyte Culture Methods*. Harvard Medical School
- Rheinwald JG**, Green H (1977): Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265, 421-424
- Rheinwald JG**, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, De Luca M, Catricala C, O'Toole KM (2002): A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 22, 5157-5172
- Riboulet-Bisson E**, Sturme MH, Jeffery IB, O'Donnell MM, Neville BA, Forde BM, Claesson MJ, Harris H, Gardiner GE, Casey PG, Lawlor PG, O'Toole PW, Ross RP (2012): Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PloS one* 7, e31113

- Rizzo A**, Bevilacqua N, Guida L, Annunziata M, Romano Carratelli C, Paolillo R (2012): Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Cytokine* 60, 197-204
- Rossi D**, Zlotnik A (2000): The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242
- Rottman JB** (1999): Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet Pathol* 36, 357-367
- Saarela M**, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84, 197-215
- Saavedra JM**, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH (1994): Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-1049
- 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 MK**, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, Sarna S, Valtonen V, Jarvinen A (2002): *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35, 1155-1160
- 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, 147-171
- Schell MA**, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F (2002): The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Natl Acad Sci U S A* 99, 14422-14427
- Schlee M**, Harder J, Koten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K (2008): Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol* 151, 528-535
- Schulze J**, Sonnenborn U, Ölschläger T, Kruis W: Probiotika, Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Sonderausgabe; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008, S. 2-5, 82, 86, 130-133, 177-179
- Sfakianakis A**, Barr CE, Kreutzer D (2001a): Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol* 72, 1413-1419

- Sfakianakis A**, Barr CE, Kreutzer DL (2001b): Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced expression of IL-1alpha and IL-1beta in human gingival epithelial cells: role in IL-8 expression. *Eur J Oral Sci* 109, 393-401
- Siitonen S**, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, Kirkkola AL (1990): Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 22, 57-59
- Silbernagl S**, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, S.94-100
- Silva M**, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL (1987): Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 1231-1233
- Sims PJ**, Wiedmer T (1995): Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 6, 275-282
- Sleator RD** (2010): Probiotic therapy - recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathog* 2, 5
- Stadnyk AW** (1994): Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 8, 1041-1047
- Strieter RM**, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. (1995): The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270, 27348-27357
- Svedmyr E**, Jondal M (1975): Cytotoxic effector cells specific for B Cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1622-1626
- Sverdrup BM**, Kallberg H, Klareskog L, Alfredsson L (2012): Usage of skin care products and risk of rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Arthritis Res Ther* 14, R41
- Tabasco R**, Sanchez-Patan F, Monagas M, Bartolome B, Victoria Moreno-Arribas M, Pelaez C, Requena T (2011): Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol* 28, 1345-1352
- Teitelbaum JE**, Walker WA (2002): Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22, 107-138
- Thomas C**, Hagedorn M, Kolesnikova L, Salfelder K, Weyers I, unter Mitarbeit von Grimm I: Atlas der Infektionskrankheiten. 1. Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart 2010, S. 85, 477ff.
- Tonetti MS**, Freiburghaus K, Lang NP, Bickel M (1993): Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res* 28, 511-513

Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S (2001): Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* **73**, 393S-398S

Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C (2009): Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand* **67**, 19-24

Vanderhoof JA (2008): Probiotics in allergy management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2**, 38-40

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

Vitkov L, Hannig M, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hermann A (2005): Ex vivo gingival-biofilm consortia. *Lett Appl Microbiol* **41**, 404-411

Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR (1999): Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* **94**, 1878-1889

Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, Sanders ME (2011): Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* **69**, 392-403

Whicher JT, Evans SW (1990): Cytokines in disease. *Clin Chem* **36**, 1269-1281

Williams IR, Kupper TS (1996): Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* **58**, 1485-1507

Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A (1998): Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med* **188**, 1757-1762

Yan F, Polk DB (2006): Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**, 717-721

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

Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ (1999): IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog* **26**, 275-280

Zhang M, Liu B, Zhang Y, Wei H, Lei Y, Zhao L (2007): Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* **45**, 496-500

Zlotnik A, Yoshie O (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für das Ermöglichen der vorliegenden Dissertation, für die umfassende Betreuung während der wissenschaftlichen Arbeit in der AG orale Biologie und Geweberegeneration und für die entgegengebrachte Geduld bei der Korrektur.

Dr. rer. nat. Joachim Volk der Medizinischen Hochschule Hannover aus dem Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde danke ich für die großzügige Bereitstellung der probiotischen Extrakte und die stets freundliche Unterstützung. Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Jörg Eberhard für seine stets konstruktive Zusammenarbeit.

Antonia Hellmann danke ich für den stets bereichernden Gedankenaustausch, während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke den Mitstreiterinnen der AG für die tolle Atmosphäre und motivierende Einstellung während des wissenschaftlichen Arbeitens. Mein herzlicher Dank gilt dabei Frau Christa Bode für die freundliche Unterstützung beim Erlernen der Grundfertigkeiten wissenschaftlicher Methoden und für ihre stets kompetenten Anregungen bei der Diskussion auftretender Fragen. Außerdem danke ich Frau Gabriele Wolf aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Betreuung während der Durchführung des ELISA und der Abteilung Klinische Chemie für die Bereitstellung des ELISA Plate Reader.

Besonders möchte ich auch David Ellenberger aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen danken für seine geduldige und äußerst kompetente Unterstützung bei der Auswertung meiner statistischen Daten.

Lebenslauf

Am 22. Februar 1980 wurde ich, Mirjam Mujakovic, als einziges Kind der Eheleute Sonja Mujakovic, geb. Gundlach, und Peter Mujakovic in Kassel geboren. Von 1986 bis 1990 besuchte ich die Grundschule in Waldau. 1990 wechselte ich auf die Offene Schule Waldau, eine Versuchsschule des Landes Hessen, welche ich 1996 mit dem Realschulabschluss beendete. In demselben Jahr begann ich meine 3½ jährige Ausbildung zur Zahntechnikerin, nach deren Abschluss ich bis zum Sommer im Jahr 2003 weiter in meinem Ausbildungsbetrieb arbeitete. Ab August bis Frühjahr 2006 absolvierte ich mein Abitur auf dem Hessenkolleg Kassel, einer Schule für Erwachsene des Landes Hessen. Darauffolgend begann ich im Wintersemester 2006/07 das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen und legte im März 2009 das Physikum ab. In den Semesterferien 2010 begann ich das wissenschaftliche Arbeiten in der Abteilung Prothetik, der AG orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Miosge. Das Studium der Zahnmedizin beendete ich im Wintersemester 2011/12 in der Regelstudienzeit.

Seit dem 01.04.2012 arbeite ich als Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Claar & Kollegen in Kassel.