

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Hepatologie und Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung des immunmodulatorischen Einflusses probiotischer und  
humanpathogener Hefen auf dendritische Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Richard Steinhagen  
aus Hamburg

Datum der Promotion: 10.03.2017

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Immunsystem des Menschen . . . . .	1
1.2	Dendritische Zellen . . . . .	2
1.2.1	Differenzierung dendritischer Zellen . . . . .	3
1.2.2	Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen . . . . .	4
1.2.3	Reifemarker dendritischer Zellen . . . . .	6
1.2.4	Zytokinsekretion dendritischer Zellen . . . . .	6
1.3	Aktivierung naïver T-Zellen . . . . .	7
1.4	Das mukosale Immunsystem des Darms . . . . .	7
1.5	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen . . . . .	8
1.6	Probiotika, Prebiotika, Synbiotika . . . . .	8
1.6.1	Taxonomische Position von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen CBS 5926 und <i>Saccharomyces boulardii</i> . . . . .	9
1.6.2	Medizinische Verwendung . . . . .	10
1.6.3	Außermedizinische Verwendung . . . . .	11
1.6.4	Zellwandaufbau . . . . .	11
1.7	<i>Candida albicans</i> . . . . .	12
1.7.1	Taxonomie und Eigenschaften . . . . .	12
1.7.2	Zellwandaufbau . . . . .	13
1.8	Entwicklung der Fragestellung . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien und Zusätze . . . . .	15
2.2	Puffer und Medien . . . . .	16
2.3	Angesetzte Puffer . . . . .	16
2.4	Reagenzien für die magnetische Zellseparation . . . . .	17
2.5	Antikörper . . . . .	17
2.6	Isotyp-Antikörper . . . . .	18
2.7	<i>Cytometric Bead Array</i> . . . . .	18
2.8	Hefepilzstämme . . . . .	18
2.9	Verbrauchsmaterialien . . . . .	19
2.10	Geräte . . . . .	20
2.11	Software . . . . .	21

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	Ficoll-dichtegradientenzentrifugation . . . . .	22
3.2	Magnetische Zellseparation . . . . .	22
3.2.1	Prinzip der magnetischen Zellseparation . . . . .	22
3.2.2	Isolation myeloider dendritischer Zellen . . . . .	23
3.2.3	Isolation naiver T-Zellen . . . . .	23
3.3	Überprüfung der Reinheit myeloider dendritischer Zellen und naiver T-Zellen . . .	24
3.4	Zellkultur . . . . .	24
3.4.1	Zellkultur myeloider dendritischer Zellen . . . . .	24
3.4.2	CFSE-Färbung . . . . .	24
3.4.3	Gemischte Lymphozytenreaktion . . . . .	25
3.5	Durchflusszytometrie . . . . .	26
3.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie . . . . .	26
3.5.2	Messung der Reifemarker myeloider dendritischer Zellen . . . . .	27
3.5.3	Messung der T-Zell-Proliferation . . . . .	27
3.6	Messung der Zytokinkonzentrationen . . . . .	27
3.6.1	Prinzip des <i>Cytometric Bead Array</i> . . . . .	28
3.6.2	Messung der Zytokine mit dem <i>Cytometric Bead Array</i> . . . . .	28
3.7	Herstellung hefekonditionierter Überstände . . . . .	29
3.7.1	Herstellung konventioneller Hefe-Überstände . . . . .	29
3.7.2	Bestimmung der mittleren Zellzahl der konventionellen Hefe-Kulturen . . .	29
3.7.3	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen CBS 5926, <i>Saccharomyces boulardii</i> und <i>Candida albicans</i> ATCC 2091 . . . . .	30
3.7.4	Herstellung von Hefe-Kulturen mit definierter Zellzahl . . . . .	31
3.8	Auftrennung der hefekonditionierten Überstände nach molekularer Größe mittels Membranpartitionschromatografie . . . . .	31
3.9	Herstellung der Elutionsreihe aus Hefe-Medien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen CBS 5926 . . . . .	32
3.10	Enzymatischer Verdau des hydrophilen Eluats mittels $\beta$ -Glukanase . . . . .	32
3.11	Monosaccharidanalyse . . . . .	33
3.11.1	LC-ESI-MS basierte Analyse der Monosaccharide . . . . .	33
3.12	Statistische Analyse . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1	Hohe Reinheit myeloider dendritischer Zellen und naiver T-Zellen nach magnetischer Zellseparation . . . . .	36
4.2	Zellkultur mit konventionellem Hefe-Überstand . . . . .	37
4.2.1	Die phänotypische Reifung der mDC wird durch ScÜ 1:8 gehemmt . . . . .	37

---

4.2.2	ScÜ 1:8 inhibiert in der gemischten Lymphozytenreaktion die Proliferation von T-Zellen . . . . .	39
4.2.3	Die aktiven Komponenten von Sc sind <3 kDa . . . . .	40
4.2.4	Die phänotypische Reifung der mDC von CED-Patienten wird durch Sc <3 kDa gehemmt . . . . .	41
4.2.5	Hydrophile Komponenten entfalten die hemmende Wirkung auf die mDC-Reifung . . . . .	42
4.2.6	Ein $\beta$ -Glukanase-Verdau hebt die hemmende Wirkung des hydrophilen Eluates nicht auf . . . . .	44
4.3	Hefe-Überstand definierter Zellzahl . . . . .	45
4.3.1	Biologische Replikate zeigen reproduzierbare Effekte . . . . .	45
4.3.2	Die Überstände probiotischer und humanpathogener Hefen entfalten vergleichbare immunmodulatorische Effekte . . . . .	46
4.3.3	Die hefekonditionierten Medien sind reich an Glykokonjugaten . . . . .	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zellen
<b>ATCC<sup>®</sup></b>	<i>american type culture collection<sup>®</sup></i>
<b>BC</b>	B-Zellen
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	bzw.
<b>Ca</b>	<i>Candida albicans</i> ATCC <sup>®</sup> 2091
<b>CaÜ</b>	<i>Candida albicans</i> ATCC <sup>®</sup> 2091-Überstand
<b>CCR</b>	Chemokin-Rezeptor
<b>CDAI</b>	<i>Crohn's Disease Activity Index</i>
<b>CED</b>	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
<b>CD</b>	<i>clusters of differentiation</i>
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>Da</b>	Dalton
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>FACS<sup>™</sup></b>	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FDA</b>	<i>American Food and Drug Administration</i>
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GALT</b>	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
<b>GFO</b>	<i>glutamine, dietary fibers, oligosaccharides</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GRAS</b>	<i>generally recognized as safe</i>
<b>h</b>	Stunden
<b>HCL</b>	Salzsäure
<b>Hex</b>	Hexose
<b>HexNAc</b>	N-Acetylglukosamin
<b>HS</b>	Humanserum Typ AB
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LC</b>	Langerhans-Zelle
<b>LC-ESI-MS</b>	<i>liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry</i>
<b>MACS<sup>®</sup></b>	<i>magnetic activated cell sorting system</i>
<b>mDC</b>	myeloide dendritische Zelle
<b>min</b>	Minuten
<b>MLR</b>	<i>mixed lymphocyte reaction</i>

---

<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>nTC</b>	naïve T-Zelle
<b>PBA</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Rinderserumalbumin
<b>PBMC</b>	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>pDC</b>	plasmazytoide dendritische Zelle
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Sb</b>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<b>SbÜ</b>	<i>Saccharomyces boulardii</i> -Überstand
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen CBS 5926
<b>ScÜ</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen CBS 5926-Überstand
<b>SEB</b>	Staphylokokken Enterotoxin B von <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>sog.</b>	sogenannte
<b>TC</b>	T-Zellen
<b>T<sub>eff</sub></b>	T-Effektorzellen
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>T<sub>reg</sub></b>	regulatorische T-Zellen
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor<math>\beta</math></i>
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>YPD</b>	Hefe Extrakt Pepton Dextrose

## Abstrakt

**Einleitung:** Für die Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wird insbesondere der Verlust von Toleranz gegenüber luminalen mikrobiellen Antigenen diskutiert. Eine zentrale Rolle in Entzündungsvorgängen nimmt die myeloide dendritische Zelle (mDC) ein. Die Interaktion von mDC und Hefen ist bei CED bisher wenig untersucht.

**Methoden:** Aus Blut gesunder Probanden und Patienten mit CED wurden primäre CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC isoliert und mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Es wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD40 sowie des Migrationsmarkers CCR7, die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 sowie die Proliferation naiver CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (TC) in der allogenen gemischten Lymphozytenreaktion in Abhängigkeit von den verwendeten Hefemedien untersucht. Dafür wurden steril filtrierte Überstände der probiotischen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 (*Sc*) und die mittels Membranpartitionschromatographie hergestellten Filtrate verwendet. Das Filtrat *Sc* <3kDa wurde durch Elution in hydrophobe und hydrophile Fraktionen aufgetrennt und das erste Eluat mit einer  $\beta$ -Glukanase verdaut. Um die immunmodulatorischen Effekte probiotischer und humanpathogener Hefen zu vergleichen, wurden Überstände aus einer definierten Zellzahl von *Sc*, *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) sowie *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup> 2091 (*Ca*) hergestellt. Mittels vergleichender Immunphänotypisierung wurde die Expression von CD80, CD40 und CCR7 sowie die Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 gemessen. Die Struktur der immunmodulatorischen Komponenten der Hefemedien definierter Zellzahl wurde durch Monosaccharid- und Glykokonjugatanalyse näher charakterisiert.

**Ergebnisse:** Ein antiinflammatorischer Effekt des Überstands und der Filtrate von *Sc* auf mDC gesunder Probanden und Patienten mit CED wurde nachgewiesen. Die Proliferation naiver TC wurde durch *Sc* inhibiert. Die Membranpartitionschromatographie erlaubte die Eingrenzung des Molekulargewichts der aktiven Komponenten auf <3kDa. Die Elutionsreihe zeigte den positiven Effekt in den hydrophilen Eluaten. Der  $\beta$ -Glukanaseverdau hatte keinen Einfluss auf den Effekt. Immunphänotypisierungen zeigten unter Hinzufügen des Überstands von *Sc*, *Sb* und *Ca* einen reduzierten Anteil CD80-, CD40- sowie CCR7-positiver mDC. Auf der Ebene der Zytokine nahm die Sekretion von TNF- $\alpha$  ab und von IL-10 zu. Der antiinflammatorische Effekt wurde besonders effektiv durch die 1:8-Verdünnung entfaltet. Es wurden hydrophile Komponenten mit einem niedrigen Oligomerisierungsgrad als antientzündliche Komponenten vermutet. Eine Monosaccharidanalyse zeigte, dass Glukose und Mannose in den Überständen und Filtraten von *Sc*, *Sb* sowie *Ca* vorhanden waren. Mittels Glykokonjugatanalyse konnte das Vorhandensein von Oligosacchariden bestätigt werden.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zur Immunmodulation probiotischer und humanpathogener Hefen auf CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC durchgeführt. Hydrophile Oligosaccharide mit einem Grundgerüst aus Glukose oder Mannose sowie einem Molekulargewicht <3kDa werden als antiinflammatorische Moleküle der Hefemedien von *Sc*, *Sb* und *Ca* angesehen.

## Abstract

**Introduction:** Loss of tolerance against luminal microbial antigens is thought to be a critical factor in pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD). Myeloid dendritic cells (mDC) play a pivotal role in inflammatory responses. Interaction of mDC and yeast in IBD is not well studied yet.

**Methods:** Primary CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC from healthy controls and IBD patients were isolated and stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Immunophenotyping was performed to quantify expression of the costimulatory molecules CD80, CD40 and the migration marker CCR7, secretion of TNF- $\alpha$  and IL-10 as well as proliferation of CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naïve T cells (TC) in an allogenic mixed lymphocyte reaction. Therefore sterile filtrated *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 supernatant (*ScS*) was fractionized into filtrates using membrane partition chromatography. By elution series, *Sc* <3 kDa was divided into hydrophobic and hydrophilic eluates and the latter were digested using a  $\beta$ -glucanase. In order to compare immunomodulatory activities of probiotic and pathogenic yeast, *Sc*, *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) and *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup> (*Ca*) were cultured to a defined cell concentration and the supernatant was passed through a sterile filter. Comparative immunophenotyping was used to evaluate the number of CD80-, CD40-, CCR7-positive mDC and the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-10. Using a monosaccharide and glycoconjugate analysis, the structure of the active components within the yeast media was characterized.

**Results:** In brief, maturation of activated mDC from healthy controls and IBD patients was inhibited using *ScS* and its filtrates. Proliferation of naïve TC was inhibited using *ScS*. As evaluated by membrane partition chromatography, the molecular weight of the active components of *Sc* was <3kDa. The elution series indicated that hydrophilic components were responsible for the shown effect. Digestion with a  $\beta$ -glucanase did not affect the effect. Comparative immunophenotyping showed that supernatant of *Sc*, *Sb* and *Ca* reduced the number of CD80-, CD40- and CCR7-positive mDC. In addition, the secretion of TNF- $\alpha$  was attenuated and the secretion of IL-10 elevated. A serial dilution showed an optimal antiinflammatory effect using a 1:8 dilution. Thus, hydrophilic molecules with low oligomerisation might be the active components within the yeast media. As shown by monosaccharide analysis, glucose and mannose were represented within all media. A glycoconjugate analysis confirmed the presence of oligosaccharides.

**Conclusion:** This work performed comparative investigations of immunomodulation by probiotic and pathogenic yeast on CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC. Hydrophilic oligosaccharides with a glucose or mannose backbone and a molecular weight of <3kDa were regarded as antiinflammatory components within the yeast media of *Sc*, *Sb* and *Ca*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen besteht aus angeborenen und erworbenen Immunantworten, die unabhängig voneinander Pathogene bekämpfen können (Tabelle 1). Die erste unspezifische Immunantwort auf lokale Pathogene geschieht durch das angeborene Immunsystem. Dabei verhindern mechanische oder chemische Barrieren sowie zelluläre Abwehrmechanismen die Pathogenausbreitung im Gewebe. Das Epithel ist eine Form der mechanischen Barriere, die durch intrazelluläre Schlussleisten (engl. *tight junctions*) einen ungehinderten parazellulären Fluss von Pathogenen verhindert. Antibakteriell wirksame Defensine, Enzyme oder ein bestimmter pH-Wert stellen chemische Barrieren dar. Die zellulären Abwehrmechanismen erkennen fremde Antigene und phagozytieren diese. Solche Phagozyten können pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) erkennen. PAMP stellen hochkonservierte repetitive Sequenzen von Pathogenen dar. Die Phagozyten zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, ihre Umgebung auf fremde Antigene zu untersuchen. Durch ihre Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern-recognition receptors*, PRR) können sie PAMP erkennen [1]. Zu den PRR gehören u.a. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll-like receptors*, TLR), der Mannose-Rezeptor und die nukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomänenrezeptoren (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain like receptors*, NOD).

**Tabelle 1: Übersicht über wesentliche Bestandteile des humanen Immunsystems.**

	<b>Angeborene Immunantwort</b>	<b>Erworbene Immunantwort</b>
<b>Humorale Komponenten</b>	Zytokine Immunglobuline Komplementfaktoren Defensine Enzyme Reaktive Sauerstoffradikale	Immunglobuline Zytokine
<b>Zelluläre Komponenten</b>	Dendritische Zellen Granulozyten Monozyten, Makrophagen Natürliche Killerzellen Mastzellen	T-Lymphozyten B-Lymphozyten

Eine gesonderte Form der lokalen Pathogenabwehr stellt die mikrobielle Besiedelung, das sog. Mikrobiom, der mukosalen Grenzflächen dar, da durch die Konkurrenz ortsständiger und pathogener

Mikroorganismen um Nährstoffe ein unkontrolliertes Wachstum und Vermehrung der Pathogene verhindert wird [2]. Die ortsständigen Mikroorganismen haben sich im Vergleich zu Pathogenen an die lokalen Umweltbedingungen adaptiert und können auch direkt Einfluss auf diese durch sezernierte Stoffwechselprodukte nehmen.

Durch schnelles Wachstum und Invasion der Pathogene in tiefere Gewebeschichten bildet sich eine lokale Entzündung und die unspezifische angeborene Immunantwort kann die Pathogene alleine nicht eliminieren. Durch besondere Phagozyten, den antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC), kann die spezifische erworbene Immunantwort angestoßen werden. Zu den hochpotenten APC gehören die dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DC), welche phagozytierte PAMP intrazellulär prozessieren und naiven T-Zellen (engl. *naïve t cells*, nTC) präsentieren, dabei erkennen nTC diese Antigenfragmente erst, wenn diese von APC auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden und der hochvariable spezifische T-Zell-Rezeptor (engl. *t cell receptor*, TCR) die Kombination aus MHC-Molekül und passendem Antigen erkennt [1]. Durch die sich anschließende klonale Proliferation der spezifisch aktivierten TC zu T-Effektorzellen ( $T_{\text{eff}}$ ) wird die gezielte Pathogenbekämpfung initiiert. Dieser Prozess ist umfangreicher als die angeborene Immunantwort und braucht einige Tage bis Wochen.

### 1.2 Dendritische Zellen

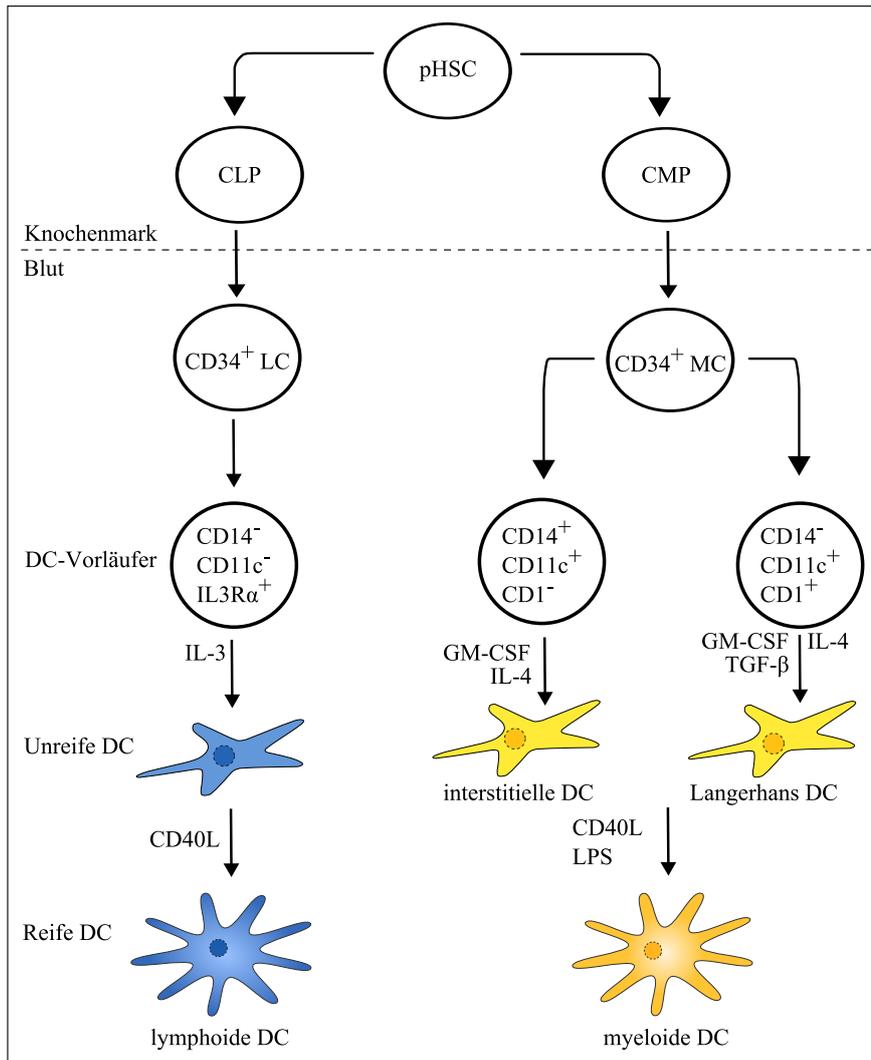
Der Berliner Medizinstudent Langerhans entdeckte 1868 die später nach ihm benannten DC der Epidermis und beschrieb sie als Zellen des Nervensystems [3]. 1973 beschrieben Steinman *et al.* in peripheren lymphoiden Organen von Mäusen einen Zelltyp, der bei der mikroskopischen Betrachtung mit verzweigten (lat. *dendriticus*) zytoplasmatischen Fortsätzen auffiel [4], dies trug zur Namensgebung bei. Da der Anteil der DC an den peripheren monozytären Zellen des Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) nur circa  $0,3 \pm 0,2\%$  beträgt [5], sind spezielle Methoden zur Isolierung der DC notwendig.

Die humanen DC werden in Untergruppen und ihren Subtypen zusammengefasst. Eine kleinere Gruppe bildet die Langerhans Zelle der Haut, die durch eine starke Expression von CD1a charakterisiert ist [6]. Der überwiegende Anteil zirkulierender DC wird von CD11c<sup>+</sup> myeloiden DC (*myeloid dendritic cells*, mDC) gebildet. Es gibt drei Subtypen der mDC. Der erste Subtyp ist die CD1c<sup>+</sup> mDC, die den Hauptvertreter im Blut und den lymphatischen Geweben darstellt [6]. Ausgestattet mit TLR1-10 können die CD1c<sup>+</sup> mDC u.a. bakterielles LPS erkennen [7]. Außerdem wird Dectin-1 und -2 exprimiert, was auf eine Rolle bei der Erkennung fungaler Antigene hindeutet [8]. Der zweite Subtyp wird durch die CD141<sup>+</sup> mDC gebildet, welche im Blut, den lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben vorkommt [6]. Diese CD141<sup>+</sup> mDC sind potente Zellen zur Kreuzpräsentation von Antigenen [9]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass CD141<sup>+</sup> mDC nekrotisches

Material aufnehmen und intrazellulär prozessieren [10]. Den dritten Subtyp stellen die CD16<sup>+</sup> mDC dar, welche charakterisiert sind durch eine signifikant höhere Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, sobald sie über die TLR aktiviert werden [11]. Die plasmazytoide DC (engl. *plasmacytoid dendritic cell*, pDC) ist nicht mit den typischen myeloiden Antigen ausgestattet, sondern charakterisiert durch die Expression von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 [12]. Sie sind im Blut und den lymphatischen Geweben vertreten [6] und charakterisiert durch eine Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  nach Stimulation mit viralen Antigenen [13]. Zur Erkennung von PAMP verfügen sie vor allem über die TLR7 und TLR9 [6].

### 1.2.1 Differenzierung dendritischer Zellen

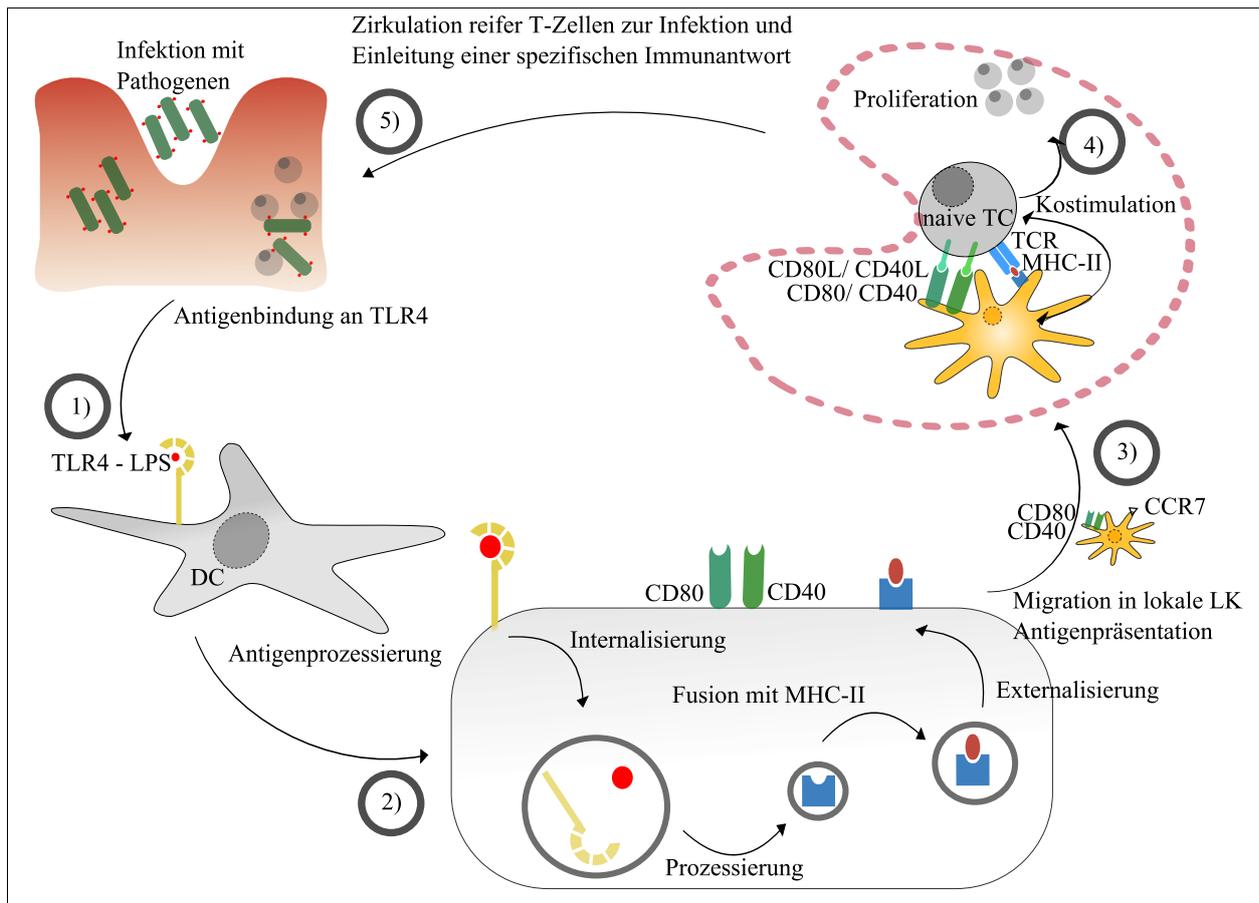
Die Entwicklung der korpuskulären Bestandteile des Blutes beginnt im Knochenmark. Neben den Lymphozyten differenzieren sich auch die DC aus hämatopoetischen Stammzellen [14] (Abbildung 1). Diese pluripotenten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (engl. *pluripotent hematopoietic stem cells*, pHSC) können sich zu CD34<sup>+</sup> gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (engl. *common myeloid progenitor*, CMP) oder zu CD34<sup>+</sup> gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP) entwickeln [15]. Aus der CLP entwickelt sich die CD34<sup>+</sup> lymphoide Zelle (engl. CD34<sup>+</sup> *lymphoid cell*, CD34<sup>+</sup> LC). Dagegen reift die CMP zur CD34<sup>+</sup> myeloiden Zelle (engl. CD34<sup>+</sup> *myeloid cell*, CD34<sup>+</sup> MC). Aus der CD34<sup>+</sup> MC entwickeln sich die CD1<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> oder CD1<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> Vorläuferzellen der DC im Blut. Im Gegensatz zum Maus-Model ist die Abstammung der humanen DC und ihrer Subtypen noch nicht vollständig verstanden [16]. Es wird angenommen, dass der Großteil der DC eine Differenzierungsform der CMP ist und sich circa 10% aus der CLP entwickeln [17]. Im Rahmen einer Immunreaktion sind hauptsächlich inflammatorische CD11c<sup>+</sup> DC involviert [18]. CD1c wird vor allem von CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>-</sup> DC exprimiert [19]. Neben den DC können auch B-Zellen und Granulozyten positiv für CD1c sein.



**Abbildung 1: Differenzierung dendritischer Zellen.** Die Entwicklung der DC beginnt im Knochenmark. Aus den pHSC entstehen die CLP und CMP. Die CLP differenziert sich in die  $CD34^+$  LC, aus der sich die  $CD14^- CD11c^- IL3R\alpha^+$  Vorläuferzelle entwickelt. Unter dem Einfluss von IL-3 entsteht die unreife lymphoide DC und anschließend durch CD40L die reife lymphoide DC. Aus der CMP entsteht die  $CD34^+$  MC. Daraus entwickeln sich zwei Zelltypen. Einerseits entsteht daraus die  $CD1^- CD11c^+ CD14^+$  Vorläuferzelle, die sich unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 zur interstitiellen DC entwickelt. Andererseits bildet sich noch die  $CD1^+ CD11c^+ CD14^-$  Vorläuferzelle, die sich durch GM-CSF, TGF- $\beta$  und IL-4 zur Langerhans Zelle entwickelt. Unter dem Einfluss von CD40L oder LPS entwickelt sich daraus die reife mDC. Adaptiert nach [15].

### 1.2.2 Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Die Antigenaufnahme durch mDC stellt einen wesentlichen Stimulus zur phänotypischen und funktionellen Reifung dar. Auf Charles Janeway geht die Theorie zurück, das angeborene Immunsystem erkenne nicht den individuellen pathogenen Fremdorganismus, sondern die PAMP [20]. Die DC können verschiedene PAMP erkennen, initiieren als hochpotente APC die erworbene zelluläre und humorale Immunantwort und nehmen deshalb eine Schlüsselstellung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem ein [21].



**Abbildung 2: Schema der Antigenprozessierung und -präsentation der DC.** 1) DC erkennen das LPS gram<sup>-</sup> Bakterien durch Komplexbildung mit TLR4. 2) Nach Internalisierung des TLR4-LPS-Komplexes ins Zytosol und Prozessierung in Antigenfragmente fusionieren diese mit MHC-II. Der entstandene MHC-II-Komplex wird externalisiert und fusioniert mit der Zellmembran. 3) Phänotypisch reife, CCR7 exprimierende DC migrieren in regionale Lymphknoten (LK) und präsentieren naiven TC das an MHC-II gebundene Antigenfragment. 4) Durch die kostimulatorischen Signale CD80 und CD40 werden naive TC aktiviert. Das erste Signal stellt die Erkennung des spezifischen auf MHC-II präsentierten Antigenfragments mittels TCR dar. Das zweite Signal wird durch die Komplexbildung der kostimulatorischen Moleküle ausgelöst. Daraufhin wird die Differenzierung und Proliferation der TC eingeleitet. 5) Reife TC zirkulieren mit dem Blut zum Ort der Infektion und leiten die spezifische Immunantwort ein.

Unreife DC sind mit verschiedenen PRR ausgestattet, mit denen sie vor allem die epithelialen Grenzflächen der Organe auf körperfremde und körpereigene Antigene kontrollieren. Im Rahmen einer Infektion mit gram<sup>-</sup> Bakterien erkennen die mDC das LPS als typischen Zellmembranbestandteil. LPS wird dann über TLR4 als pathogen identifiziert [7] (Abbildung 2). Die Aktivierung des TLR4 durch die Antigenbindung leitet die Reifung der DC und die rezeptorvermittelte Phagozytose des TLR4-LPS-Komplexes ein und initiiert die Prozessierung im Phagosom. Anschließend werden die degradierten Peptide mit dem MHC-II im Phagosom verknüpft, zur Zellmembran transportiert und anderen Zellen des Immunsystems präsentiert [22]. Die Kopplung von degradierten Antigenfragmenten an MHC-II ist vorwiegend für Antigene des Extrazellulärraums vorbehalten. Die Aktivierung der unreifen DC über die Antigenbindung an den TLR initiiert die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Expression kostimulatorischer Moleküle [15].

### 1.2.3 Reifemarker dendritischer Zellen

Die Aktivierung unreifer DC leitet neben der Phagozytose von Antigenen auch die phänotypische Reifung der DC ein. Die vermehrte Expression des Migrationsmarkers CCR7 führt zur Zirkulation in sekundäre lymphatische Organe [23]. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 [24–26] und CD40 [27, 28] sind für die Einleitung einer primären Immunantwort durch TC notwendig. Die Einwanderung der reifenden DC in lymphatische Gefäße geschieht entlang eines Konzentrationsgradienten der Zytokine CCL19 und CCL21, die von den Stromazellen und den hochendothelialen Venolen der darmassoziierten lymphatischen Gewebe (engl. *gut associated lymphoid tissue*, GALT) freigesetzt werden [23, 29]. Im Parakortex angelangt, der aufgrund der hohen Anzahl naiver TC auch TC-Zone genannt wird, werden die MHC-gebundenen Antigenfragmente den naiven TC präsentiert. Daraufhin bildet sich eine sog. immunologische Synapse aus [30]. Die Vergrößerung der Zelloberfläche durch Zunahme der Zellausläufer geht mit vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle einher und wird als phänotypische Reifung bezeichnet [31], was einer verbesserten Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dient. Nach abgeschlossener Reifung der DC kann das für die TC-Aktivierung notwendige zweite Signal erfolgen. Es ist charakterisiert durch Komplexierung kostimulatorischer Moleküle (Abbildung 2). Dabei binden die auf den DC vorkommenden Moleküle CD80 und CD40 an den von TC exprimierten Rezeptoren CD28 und CD154 (CD40L) [27, 32, 33].

### 1.2.4 Zytokinsekretion dendritischer Zellen

Die funktionelle Reifung und die dabei sezernierten Zytokine und die auf dem MHC-Komplex präsentierten Antigene in sekundären lymphatischen Organen sind wesentliche Stimuli für die Art und Weise der nachfolgenden Immunantwort durch TC. Von mDC freigesetzte Zytokine können pro- bzw. antiinflammatorisch wirken.

Bakterielles LPS stimuliert mDC neben der Ausreifung kostimulatorischer Moleküle auch zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine [34]. Die während der DC-Reifung zunehmende Zytokin-konzentration erhöht auch die Ausbildung kostimulatorischer Moleküle. IL-10 aktivierter mDC kann das Ausreifen von T<sub>H</sub>2-Zellen induzieren [35] und TNF- $\alpha$  die DC zur Einwanderung in lokale LK stimulieren.

Für bestimmte Erkrankungen sind abweichende Zytokinsekretionen nachgewiesen worden. So produzieren mDC von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 [34, 36], IL-8 [34, 37] und TNF- $\alpha$  [34].

### 1.3 Aktivierung naiver T-Zellen

Die TC gesteuerte spezifische Immunantwort erfordert die Reifung naiver  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  TC zu T-Effektor-Zellen ( $T_{eff}$ ). Die  $T_{eff}$  sind TC, die sich in ihren Funktionen im Rahmen der Immunantwort unterscheiden. So besitzen zytotoxische  $CD8^+$   $T_{eff}$  die Aufgabe, virusinfizierte Zellen zu eliminieren. Die Gruppe der  $CD4^+$   $T_{eff}$  ist umfangreicher und wird durch die T-Helfer-Zellen ( $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$ ,  $T_{h17}$ ) und T-Regulator-Zellen ( $T_{reg}$ ) repräsentiert. Durch freigesetzte Zytokine können T-Helfer-Zellen weitere Zellen des Immunsystems aktivieren. Während die  $T_{eff}$  an der direkten Bekämpfung einer Infektion beteiligt sind, sind für die  $T_{reg}$  immunregulatorische Eigenschaften charakteristisch. So können sie beispielsweise die spezifische Immunantwort durch  $T_{eff}$  abschwächen oder Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen induzieren.

Die Aktivierung und Proliferation einer naiven TC erfordert zwei Signale. Das erste Signal ist die Präsentation eines MHC-II gebundenen Antigens, das aufgrund hoher Spezifität und Bindung zum TCR, der sog. Avidität, die naiven TC aktiviert. Das zweite Signal stellt die Expression und Ausreifung der kostimulatorischen Moleküle dar [38]. Nach Komplexbildung der kostimulatorischen Moleküle, werden die Proliferation und die Differenzierung der naiven TC eingeleitet (Abbildung 2). Die Konzentration verschiedener Zytokine, die durch die APC ausgeschüttet werden, kann die Differenzierung der aktivierten  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  Zellen in verschiedene Subtypen dirigieren.

### 1.4 Das mukosale Immunsystem des Darms

Das mukosale Immunsystem ist an die Darmmukosa angeschlossen und steht in direktem Kontakt zu luminalen Antigenen, die sich hauptsächlich aus der intestinalen mikrobiellen Flora, dem sog. intestinalen Mikrobiom, und den Nahrungsmittelantigenen zusammensetzen. Die resorptive Oberfläche des menschlichen Intestinaltrakts ist von Größe, Alter und Ernährung eines Individuums abhängig und beträgt circa  $400 \text{ m}^2$  [39]. Da der Gastrointestinaltrakt der Hauptort bakterieller Besiedelung ist [40], werden die APC täglich mit zahlreichen Antigenen konfrontiert.

Der Großteil der luminalen Darmflora besteht aus Bakterien, Pilzen, Archaea und Protozoen [41]. Die Anzahl an Bakterien pro Gramm Darminhalt beträgt im Dünndarm  $1 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$  und nimmt im Dickdarm auf  $1 \times 10^{12} \text{ g}^{-1}$  zu. Die fünf Hauptvertreter sind die *Bacteroidetes*, die *Firmicutes*, die *Actinobacteria* sowie die *Proteobacteria*. Interdigitierende DC können mit ihren Zytoplasmaausläufern an den Epithelzellen vorbei das Darmlumen auf pathogene und nicht-pathogene Antigene hin untersuchen. Der Chemokin-Rezeptor für CX3C ermöglicht ihnen die Aufnahme luminaler Antigene [42].

Die Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen oder dem intestinalen Mikrobiom wird als orale Toleranz bezeichnet [43]. Das intestinale Mikrobiom liegt bei Gesunden als ökologisches Gleich-

gewicht vor, das durch die Konkurrenz um Nährstoffe und ökologische Nischen aufrechterhalten wird. Dieses Gleichgewicht, aber auch das von Epithelzellen produzierte TGF- $\beta$  stimulieren die DC, überwiegend antiinflammatorisch wirkendes IL-10 zu sezernieren, das eine T<sub>H</sub>2 Immunantwort einleitet [44].

Dieses Gleichgewicht kann durch Umwelteinflüsse zerstört werden, sodass eine Dysbiose entsteht [45]. Die Bedeutung des mikrobiellen Gleichgewichts für den Aktivierungszustand des Immunsystems wird deutlich, wenn beispielsweise Antibiotika die residente Flora zerstören und sich über eine Infektion mit *Clostridium difficile* eine pseudomembranöse Enterokolitis entwickelt [46]. Es konnte gezeigt werden, dass eine rekurrende *Clostridium difficile* Infektion durch ein Fäkaltransplantat und damit der Wiederherstellung des mikrobiellen Gleichgewichts therapiert werden kann [47].

### 1.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU) stellen die beiden Hauptentitäten der CED dar. Der MC zeichnet sich im Gegensatz zur CU durch eine transmurale Entzündungsreaktion aus. Neben den klinischen Manifestationen Abdominalschmerzen, Diarrhoe, rektaler Blutabgang, Mangelernährung und Gewichtsverlust, die für beide Entitäten charakteristisch sein können, geht der MC noch mit einer Neigung zur Ausbildung von Fisteln einher. Beide Krankheiten verlaufen chronisch-schubförmig und die Prävalenz nimmt weltweit in allen ethnischen Gruppen zu [48]. Für beide Entitäten wird eine multifaktorielle Genese diskutiert. Eine der Haupthypothesen ist die fehlgeleitete immunologische Toleranz des mukosalen Immunsystems gegenüber dem intestinalen Mikrobiom [49], die zur Daueraktivität der TC und damit zur Aufrechterhaltung der Immunreaktion führt. Zur Therapie der CED werden neben Steroiden, Immunsuppressiva und sog. Biologika auch Probiotika eingesetzt.

### 1.6 Probiotika, Prebiotika, Synbiotika

Probiotika (gr. *pro bios*, für das Leben) sind definiert als lebende Organismen, die sich positiv auf die Gesundheit des Menschen auswirken [50]. Die häufig verwendeten probiotischen Präparate enthalten *Escherichia coli* Nissle 1917, Laktobazillen, Bifidobakterien, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 (*Sc*) und *Saccharomyces boulardii* (*Sb*). Bei den prebiotischen Präparaten handelt es sich um Substanzen, welche nicht verdaut werden können und die das Wachstum einiger bevorzugter residenter Kommensalen fördern können [51]. Synbiotische Präparate sind Kombinationen aus Pro- und Prebiotika.

### 1.6.1 Taxonomische Position von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 und *Saccharomyces boulardii*

Hefen, wie die *Saccharomycetes*, sind taxonomisch definiert als eukaryotische Einzeller, die sich per Knospung (engl. *budding*) teilen können [52]. *Saccharomyces* wurde ursprünglich über morphologische, sexuelle und physiologische Eigenschaften klassifiziert [53]. *Sb* und *Sc* zeigen ein ähnliches metabolisches Profil unter definierten Wachstumsbedingungen [54]. Das genetische Fingerprinting zeigte für die ribosomale DNA-Sequenz *ITS1* eine hohe Übereinstimmung mehrerer *Sb*-Stämme mit klinischen *Sc*-Isolaten [54]. Vergleichende genomische Hybridisierungen wiesen nach, dass *Sb* ein Stamm von *Sc* ist [55]. Auch mittels genetischen Fingerabdrucks konnte die enge Verwandtschaft von *Sb* zu *Sc* nachgewiesen werden [56]. Eine Analyse auf Homogenität der offenen Leserahmen (engl. *open reading frames*) von *Sc* und *Sb* wies eine Übereinstimmung in 95% nach [55]. Diese Untersuchungen deuten daraufhin, dass *Sb* zur Spezies *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 gehört. Taxonomisch ist *Sb* deshalb als *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 registriert [57] (Abbildung 3).

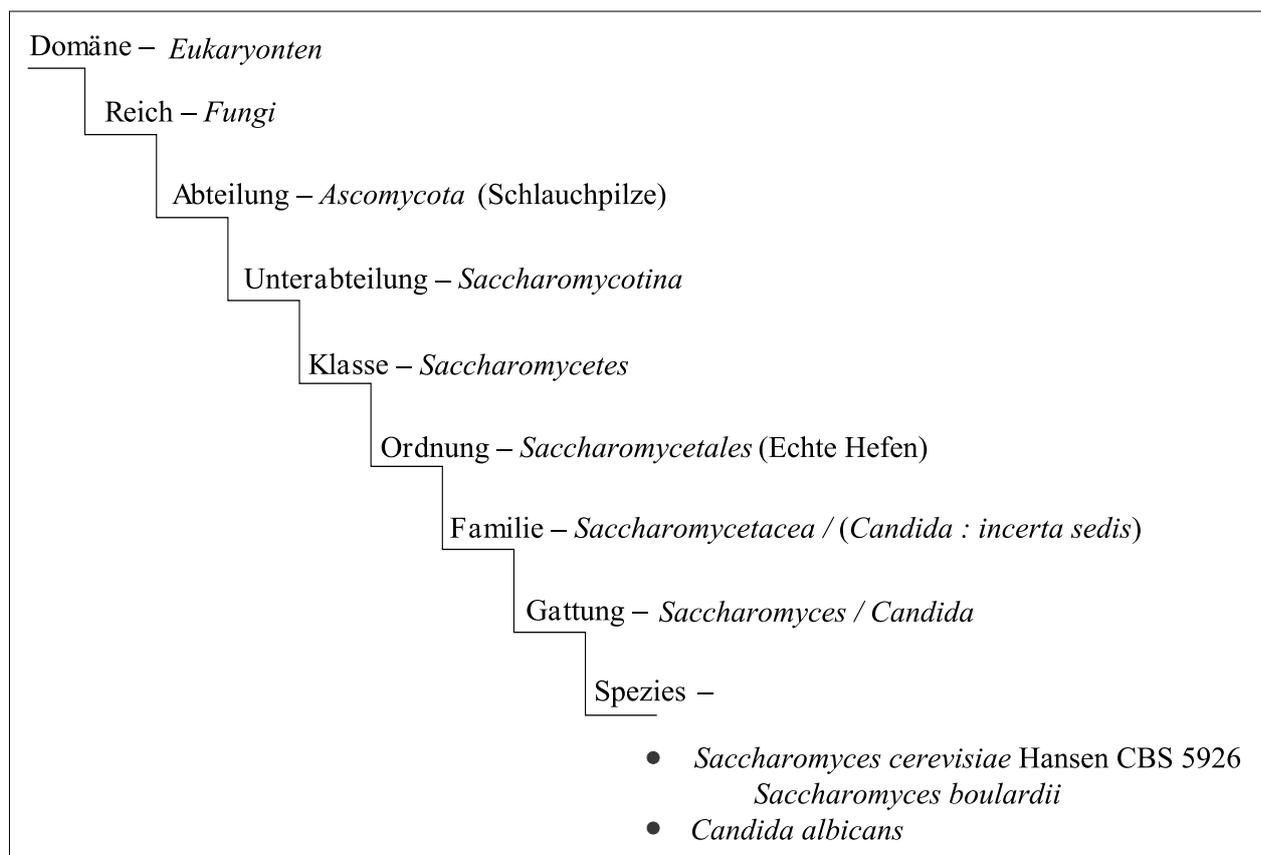


Abbildung 3: Die taxonomische Einordnung von *Sc*, *Sb* und *Ca*. Lat. *incerta sedis* = unsichere Stellung.

### 1.6.2 Medizinische Verwendung

Metchnikoff stellte die Theorie auf, dass sich eine falsche Zusammensetzung der intestinalen Flora negativ auf den Menschen auswirkt und die Lebenszeit verkürzen kann [58]. Diese Dysbiose sollte durch die Einnahme von probiotischen Laktobazillen reversibel sein. Neuere Theorien gehen von direkten immunmodulatorischen Effekten durch die Probiotika selbst aus [59].

*Sc* wird von der *American Food and Drug Administration* (FDA) als allgemein sicher eingestuft (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) und kann damit pharmazeutisch als Probiotikum eingesetzt werden. Neben positiven Effekten bei der Behandlung der Dysbiose [45] ist eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Hefen *Sb* und *Sc* die pharmazeutische Verwendung zur Vorbeugung von Reisedurchfall und zur Behandlung von akuten Durchfällen. Die Verwendung probiotischer Präparate ist nicht auf die Therapie infektiöser Darmerkrankungen beschränkt. Auch zur Therapie von CED werden sie eingesetzt. Bei Patienten mit CU mit milden bis moderaten klinischen Schüben erzielte die Kombination aus medikamentöser Therapie und der probiotischen Hefe *Sb* eine klinische und endoskopische Remission [60]. Eine weitere Studie wies nach, dass Patienten mit MC statistisch signifikant länger in Remission bleiben, wenn sie zusätzlich zur medikamentösen Therapie *Sb* erhielten [61]. Allerdings kann gegenwärtig aufgrund fehlender randomisierter klinischer Studien und teilweise gegensätzlicher Ergebnisse kein abschließendes Urteil über die Wirksamkeit zur Remissionsinduktion des MC noch für die Remissionserhaltung der CU getroffen werden [62, 63]. Im Rahmen einer Infektion mit *Clostridium difficile* wurde nachgewiesen, dass eine von Hefen produzierte 54 kDa Protease die Clostridiumtoxine A und B spalten und die dadurch verursachte Entzündung einer pseudomembranösen Enterokolitis verhindern kann [64]. Neben den Unterschieden in der therapeutischen Effektivität innerhalb der Gruppe der Probiotika konnte ein dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden [65]. Im Vergleich zur Monotherapie wird durch eine synbiotische Therapie ein ausgeprägterer Therapieeffekt erlangt [66].

*Sc* ist ein saprophytischer Organismus im humanen Bronchial-, Verdauungs- sowie dem Genitourethralsystem [67]. Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem konnten Fungämien mit *Sc* nachgewiesen werden, nachdem diese mit Probiotika behandelt wurden [68]. Solche Nebenwirkungen stellen sich vor allem bei immunkompromittierten Menschen ein, wenn *Sc* die mukosale Barriere überwinden und eine mikrobiologisch nachweisbare Fungämie auslösen kann. Aus diesem Grund ist eine Therapie immunsupprimierter Patienten mit *Sc* nicht empfohlen. Die Infektionen mit probiotischen Hefen haben besonders bei immunsupprimierten Patienten in den letzten Jahren zugenommen, sind aber mit einem Anteil von 0,1-3,6% aller Fungämien verschwindend gering [69]. Im Allgemeinen nimmt die Bedeutung der Fungämien zu, da heutzutage deutlich häufiger immunablative Verfahren durchgeführt werden. Einer der häufigsten Infektionswege einer nosokomialen *Sc*-Infektion ist die deszendierende Infektion über zentrale Venenkatheter [70].

### 1.6.3 Außermedizinische Verwendung

*Sc*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces paradoxus* und *Saccharomyces bayanus* werden zur fermentativen Produktion von Bier, Wein und der Herstellung von Brot genutzt [52]. Die Fermentation (lat. *fermentum*, Gärung) stellt einen biologischen Vorgang dar, bei dem die Prozessierung organischer Verbindungen durch Enzyme bestimmter Mikroorganismen durchgeführt wird. *Sc* ist auch eines der wichtigsten eukaryotischen Modellorganismen in der molekularen Gentechnik [71], an dem die Vorgänge der Glykosylierung verstanden wurden [72].

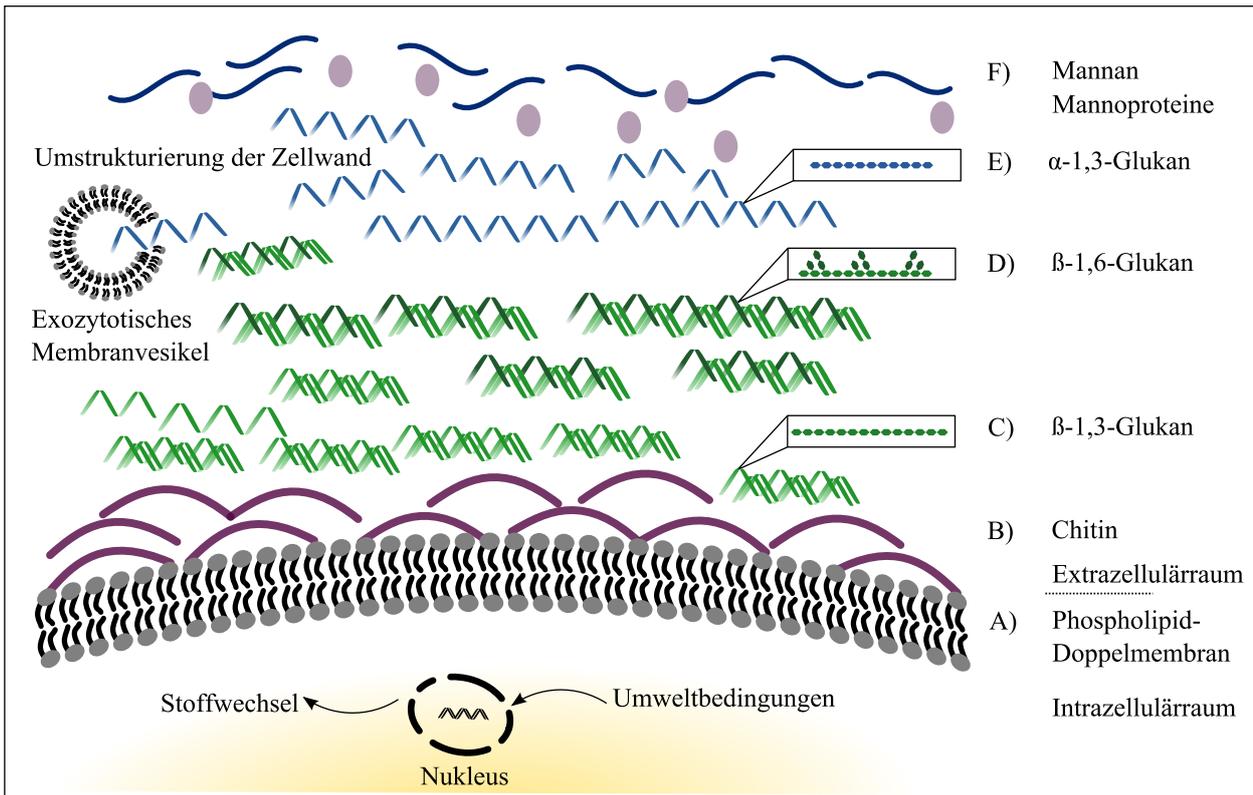
### 1.6.4 Zellwandaufbau

Die Zellwand von *Saccharomyces* hat die Funktion, die intrazellulären Stoffwechselprozesse von der Umwelt zu trennen. Damit wird einerseits der intrazelluläre hoch osmolale Raum vom extrazellulären niedrig osmolalen Raum getrennt. Andererseits bildet sie auch eine physikalische Barriere, die zur Aufrechterhaltung der rundlichen Zellform dient und darüber hinaus die Anpassung an exogene Stresssituationen ermöglicht. Die Hefezelle kann auf extreme Umweltbedingungen mit einem reduziertem Stoffwechsel reagieren und Hyphen ausbilden. Unter optimalen Bedingungen kann sich die Zelle unter Einbeziehung der Zellwand teilen.

Die Zellwand ist ein Geflecht aus mehreren Schichten (Abbildung 4). Die erste Schicht, die Zellmembran, liegt dem Intrazellulärraum direkt an und besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht (A). Daran schließt sich ein Netzwerk aus Chitin (B) und  $\beta$ -Glukanen an.  $\beta$ -Glukane sind Polysaccharide, die aus  $\beta$ -glykosidisch verknüpften D-Glukose-Monomeren aufgebaut sind. Die 1,3- $\beta$ -Glukane (C) bilden teilweise einfach oder dreifach helikale Strukturen aus [73, 74]. Mit 30-50% stellen die 1,3- $\beta$ -Glukane den Hauptanteil der Zellwand dar und sind in der zweiten Schicht lokalisiert (Tabelle 2). Sie sind außerdem mit 1,6- $\beta$ -Glukanen (D) verknüpft.  $\alpha$ -Glukane (E) schließen sich nach extrazellulär an. Der äußere Teil der Zellwand wird von Mannoproteinen gebildet, die mit Mannanen (F), einem Polymer aus D-Mannose-Monomeren und O-Glykanen verknüpft sind.

**Tabelle 2: Die Zellwandbestandteile von *Sc*.** Adaptiert nach [75].

Makromolekül	% der Zellwandtrockenmasse
Mannoprotein	40
1,3- $\beta$ -Glukan	30-50
1,6- $\beta$ -Glukan	5-10
Chitin	1,5-6



**Abbildung 4: Modell des Zellaufbaus von Hefezellen.** A) Eine Phospholipiddoppelmembran trennt den Intrazellulärraum der Hefezellen vom Extrazellulärraum. B) Ein Chitingeflecht schließt sich nach extrazellulär an. C)  $\beta$ -1,3-Glukane können als einfach oder dreifach helikale Strukturen vorliegen. D) Über kovalente Bindungen sind  $\beta$ -1,6-Glukane an  $\beta$ -1,3-Glukane verknüpft. Die äußersten Schichten der Zellwand bestehen aus E)  $\alpha$ -1,3-Glukanen und F) Mannanverbindungen. Die Zellwandkomponenten für den kontinuierlichen Prozess der Zellwandumstrukturierung werden in exozytotischen Membranvesikeln bereitgestellt. Modifiziert nach [76].

## 1.7 *Candida albicans*

### 1.7.1 Taxonomie und Eigenschaften

Die Spezies *Candida albicans* (*Ca*) ist ein der Gattung *Candida* angehörender diploider Hefepilz (Abbildung 3). Da *Ca* verschiedene Wachstumsformen zeigt, wird er auch als pleomorpher Pilz bezeichnet. Dabei kann *Ca* unter Ausbildung von Pseudohyphen und Hyphen oder in Hefenform wachsen. Die Form des Wachstums wird auch durch die Zelldichte beeinflusst [77]. So löst eine Zelldichte  $>10^7 \text{ ml}^{-1}$  hefeähnliches Wachstum und eine Zelldichte  $<1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  Hyphenbildung aus [78]. Die Vermehrung erfolgt mittels Knospung. *Ca* ist ein heterotropher, fakultativ anaerober Pilz mit der Fähigkeit, zahlreiche Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen verwerten zu können. Als saprophytischer Organismus menschlicher Epithelien kann sich *Ca* aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit bei verschiedenen Umweltbedingungen vermehren. So kann sich die Hefe beispielsweise bei einem pH-Wert von 4 auf der Vaginalschleimhaut und bei einem pH-Wert von 7,4 im Blut vermehren. Ist das Immunsystem eines Menschen geschwächt, kann *Ca* eine lokale

Infektion hervorrufen. Häufige durch *Ca* verursachte Erkrankungen sind mukokutane Infektionen des Oropharynx, der Vagina, der Haut und der Nägel sowie systemische *Ca*-Infektionen. Dadurch wechselt sich der Status vom Saprophyt zum Pathogen. Die Einwanderung von *Ca* ins Blut kann zur lebensbedrohlichen systemischen Infektion, der Candida-Sepsis, führen. Der Ursprung systemischer Fungämien scheint häufig der Gastrointestinaltrakt zu sein [79]. Die für *Ca* spezifischen Pathogenitätsfaktoren sind die Hyphenbildung, die Expression von Adhäsinen und Invasinen, die Biofilmbildung, der Phänotypwechsel und die Sekretion hydrolytischer Enzyme [78]. *Ca* ist der häufigste humanpathogene Hefepilz. Die Invasion, Infektion und Immunreaktion wird durch die Zellwandkomponenten ausgelöst.

### 1.7.2 Zellwandaufbau

Die Struktur der Zellwand von *Ca* ist geschichtet [80]. Abhängig von den Wachstumsbedingungen werden Zellwandstrukturen auf- und abgebaut, sodass die Zusammensetzung der Zellwand von *Ca*, in Übereinstimmung zu *Sc* und *Sb*, keinen statischen Zustand sondern einen dynamischen Prozess der Umstrukturierung darstellt. Die Reihenfolge der aufeinanderfolgenden Schichten ähnelt der Zellwand von *Sc*, allerdings kommen bei *Ca* keine  $\alpha$ -Glukane vor [81]. Die innerste Schicht wird von einer direkt intrazellulär anliegenden Phospholipiddoppelmembran gebildet, an die sich ein Chitingerüst anschließt [82]. Nach extrazellulär folgt eine Schicht aus einfach oder dreifach helikalen 1,3- $\beta$ - oder 1,6- $\beta$ -Glukanen, die mit dem Chitin verknüpft sein können. Die folgende Schicht wird von Mannoproteinen gebildet, die mit den Glukanen über O-Glykosylierung oder über N-Glykosylierung kovalent verbunden sind. Nach extrazellulär schließt ein breites Geflecht aus Mannan ab (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Die Zellwandbestandteile von *Ca*.** Adaptiert nach [83].

<b>Makromolekül</b>	<b>% der Zellwandtrockenmasse</b>
Mannoprotein	38-40
1,6- $\beta$ -Glukan	43-53
1,3- $\beta$ -Glukan	30-39
Chitin	2-6

## 1.8 Entwicklung der Fragestellung

Unsere Arbeitsgruppe hat nachgewiesen, dass hefekonditioniertes Medium von *Sb* die phänotypische Reifung CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> mDC inhibieren kann [84, 85]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Antwort auf die Frage angestrebt, ob die taxonomisch verwandte probiotische Hefe *Sc* vergleichbare entzündungshemmende Effekte auf die Reifung von mDC entfaltet.

Daraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Können die immunmodulatorischen Effekte der Hefe-Medien von *Sb* auch durch Hefemedien der genetisch verwandten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 erzeugt werden?
2. Entfalten die Hefemedien der pathogenen Hefe *Ca* vergleichbare antiinflammatorische Effekte auf *in vitro* Entzündungsreaktionen?
3. Welche chemischen und strukturellen Eigenschaften haben die immunmodulatorischen Komponenten der mit *Sc*, *Sb* und *Ca* konditionierten Medien?

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Zusätze

**Tabelle 4:** Chemikalien und Zusätze

Reagenzien	Hersteller
0.5 M EDTA, pH 8.0	Sigma Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Glukanase thermostabil	Sigma Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma Steinheim, Deutschland
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Aaper Alcohol abd Chemical Shelbyville, USA
Ficoll-Paque <sup>TM</sup> Plus	Amersham Pharmacia Biotech Freiburg, Deutschland
Humanserum Typ AB	Cambrex Charles City, USA
Lipopolysaccharid E.coli 0111:B4 (5 mg ml <sup>-1</sup> )	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Sigma Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Propidium Iodid	Calbiochem Darmstadt, Deutschland
Staphylokokken Enterotoxin B von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma  Steinheim, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	Sigma Steinheim, Deutschland
YPD Broth	Sigma Steinheim, Deutschland

## 2.2 Puffer und Medien

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden bei kommerziellen Herstellern gekauft.

**Tabelle 5:** Puffer und Medien

<b>Puffer und Medien</b>	<b>Hersteller</b>
FACS Clean Lösung	BD Biosciences San Diego, USA
FACS Flow Lösung	BD Biosciences San Diego, USA
FACS Rinse Lösung	BD Biosciences San Diego, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories Pasching, Austria
RPMI Medium 1640	GIBCO® Grand Island, USA

## 2.3 Angesetzte Puffer

Die folgenden Puffer wurden für die Versuche angesetzt.

**Tabelle 6:** Angesetzte Puffer

<b>Puffer und Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Kulturmedium	RPMI 1640 0,2% L-Glutamin 10% Humanserum Typ AB 1% Penicillin/Streptomycin
MACS Puffer	PBS 0,5 M EDTA 0,5% Humanserum Typ AB
PBA (Waschpuffer)	PBS Bovines Serumalbumin 0,5% 0,1% Natriumazid
YPD	YPD Broth 25 g Aqua dest 500 ml

## 2.4 Reagenzien für die magnetische Zellseparation

**Tabelle 7:** Verwendete Kits für die magnetische Zellseparation

Name	Hersteller
CD1c (BDCA-1) <sup>+</sup> Isolations-Kit	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 MultiSort Kit	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45RA Microbeads	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland

## 2.5 Antikörper

**Tabelle 8:** Antikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Verd.	Klon	Hersteller
humanes CCR7	Alexa 647	Ratte IgG2a, $\kappa$	1:20	B-ly6	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD1c	FITC	Maus IgG2 $\alpha$	1:10	AD5-8E7	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach Deutschland
humanes CD4	PE	Maus IgG1, $\kappa$	1:10	RPA-T4	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD11c	PE	Maus IgG1, $\kappa$	1:10	3D12	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD14	PerCP	Maus IgG2b, $\kappa$	1:10	M $\phi$ P989	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD40	PE	Maus IgG1, $\kappa$	1:10	5C3	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD45RA	FITC	Maus IgG2b, $\kappa$	1:5	HI100	BD Biosciences San Diego, USA
humanes CD80	PE	Maus IgG1, $\kappa$	1:10	L307.4	BD Biosciences San Diego, USA

## 2.6 Isotyp-Antikörper

**Tabelle 9:** Isotyp-Antikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Verd.	Klon	Hersteller
humanes IgG1	PE	Maus IgG1, $\kappa$	1:10	MOPC-21	BD Biosciences

## 2.7 Cytometric Bead Array

**Tabelle 10:** Verwendete Kits für den *Cytometric Bead Array*

Name	Hersteller
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences San Diego, USA
IL-10 Flex Sets	BD Biosciences San Diego, USA
TNF- $\alpha$ Flex Sets	BD Biosciences San Diego, USA

## 2.8 Hefepilzstämme

**Tabelle 11:** Verwendete Hefepilz-Spezies

Spezies	Produktname	Hersteller
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS Hansen 5926	Eubiol <sup>®</sup>	CNP Fürstenzell, Deutschland
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Ultra-Levure <sup>®</sup>	Biocodex Gentilly Frankreich
<i>Candida albicans</i> ATCC <sup>®</sup> 2091	BD Microtrol <sup>™</sup>	BD Biosciences San Diego, USA

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 12:** Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Amicon <sup>®</sup> Filter 3, 10, 30, 50, 100 kDa	Merck Millipore Carrigtwohill, Irland
Combitips Plus 5 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
LD MACS <sup>®</sup> Separationssäule	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
LS MACS <sup>®</sup> Separationssäule	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß SafeSeal 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Minisart 0.2 µm Sterilfilter	Sartorius Stedium Biotech Göttingen, Deutschland
MS MACS <sup>®</sup> Separationssäule Säule	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml BD Falcon <sup>®</sup>	BD Biosciences San Diego, USA
Pipettenspitzen 1000 µl, 500 µl, 200 µl, 10 µl	Sarstedt AG Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml, 5 ml BD Falcon <sup>®</sup>	BD Biosciences San Diego, USA
Strata <sup>®</sup> C18-E 500mg/6ml	Phenomenex LTD Aschaffenburg, Deutschland
Spritzen 20 ml	Braun AG Melsungen, Deutschland
Zellkulturflasche BD Falcon <sup>®</sup>	BD Biosciences San Diego, USA
Zellkulturschale BD Falcon <sup>®</sup>	BD Biosciences San Diego, USA

## 2.10 Geräte

**Tabelle 13:** Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Centrivac Vakuumpkonzentrator	Heraeus Instruments Hanau, Deutschland
Digital Heatblock	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Eurolab Vortex	Merck Darmstadt, Deutschland
FACS Calibur™	BD Biosciences San Diego, USA
FACS Canto II™	BD Biosciences San Diego, USA
Handcontrol	Vaccubrand GmbH Wertheim, Deutschland
Inkubator Heracell 150	Heraeus Instruments Hanau, Deutschland
Ionenfallenmassenspektrometer <i>amaZon ETD speed</i>	Bruker Daltonics Billerica, USA
MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland
Midi-MACS	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland
Mini-MACS Octo	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss Jena, Deutschland
Mikroskop Telaval 31	Zeiss Jena, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH Lauda Königshofen, Deutschland
Pipettierhilfe Accujet	Brand GmbH Wertheim, Deutschland
Spiegelreflexkamera D80, Adapter	Nikon GmbH Düsseldorf, Deutschland

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Sterilwerkbank Cellguard NU-480	Nuaire Plymouth, USA
Ultimate 3000 RSLC nano-LC	Dionex Sunnyvale, USA
Universalschüttler SM 30/ Inkubationshaube TH30	Edmund Bühler Hechingen, Deutschland
Vakuumpumpsystem BVC 21	Vacuubrand GmbH Wertheim, Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Tuttlingen, Deutschland

## 2.11 Software

**Tabelle 14:** Software

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
BD Cell Quest <sup>TM</sup> Pro Version 6	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg, Deutschland
BD FACSDiva <sup>TM</sup>	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg, Deutschland
FCAP <sup>TM</sup> Array Software 1.0.1.	Softflow New Brighton, USA
Inkscape 0.48	<a href="http://inkscape.org">http://inkscape.org</a>
JabRef	<a href="http://jabref.sourceforge.net">http://jabref.sourceforge.net</a>
Miktex	<a href="http://www.miktex.org">http://www.miktex.org</a>
SPSS Version 21	SPSS Inc. Chicago, USA
Texmaker	<a href="http://www.xmlmath.net/texmaker">http://www.xmlmath.net/texmaker</a>

## 3 Methoden

### 3.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung der korpuskulären Bestandteile des Blutes. Durch Dichtezentrifugation über einen Stufengradienten aus Ficoll<sup>TM</sup> werden Schichten erzeugt, die sich aus unterschiedlichen Zellen zusammensetzen. Aufgrund ihrer höheren Dichte als das Ficoll<sup>TM</sup> bilden die Erythrozyten und die Granulozyten die Bodenschicht. Die PBMC haben eine geringere Dichte und bilden eine Schicht in der Interphase über dem Ficoll<sup>TM</sup>. Die Thrombozyten und das Plasma bilden eine Schicht über den PBMC.

Aus Leukozytenfiltern des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité und aus Blut von CED-Patienten wurden PBMC isoliert. Dazu wurde das Blut 1:2 mit MACS<sup>®</sup>-Puffer verdünnt und auf das Ficoll<sup>TM</sup> aufgeschichtet, bei  $958 \times g$  und Raumtemperatur (RT) für 20 Minuten (min) ohne Bremse zentrifugiert. Nachdem das Plasma über der Interphase mit der Pasteurpipette abgesaugt wurde, konnten die PBMC abpipettiert und gewaschen werden, um restliches Ficoll<sup>TM</sup>, Thrombozyten und Plasma zu entfernen. Die gewonnene Interphase wurde zweimal mit MACS<sup>®</sup>-Puffer bei  $528 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  für 6 min gewaschen.

### 3.2 Magnetische Zellseparation

#### 3.2.1 Prinzip der magnetischen Zellseparation

Mit dieser Methode kann ein bestimmter Zelltyp in einem magnetischen Feld isoliert werden. Dazu werden zelltypspezifische Antikörper eingesetzt, die mit superparamagnetischen Mikropartikeln konjugiert sind (engl. *Mircobeads*). Zur Zellsuspension werden die spezifischen Antikörper hinzugefügt, um die gewünschten Zellen mit superparamagnetischen Partikeln zu markieren. Im anschließenden Isolationschritt werden MACS<sup>®</sup>-Separationssäulen verwendet, deren Trägermaterial aus Stahlkügelchen besteht. Die Separationssäulen werden in ein magnetisches Feld gestellt. Im Folgenden können die Zellen positiv oder negativ selektiert werden. Bei der negativen Selektion werden die durchfließenden, nicht-markierten Zellen als gewünschte Zellen aufgefangen. Zellen, die zuvor mit *Mircobeads* markiert wurden, werden zwischen dem Trägermaterial im magnetischen Feld zurückgehalten. Die MACS<sup>®</sup>-Separationssäulen werden aus dem magnetischen Feld entnommen und die positiv selektierten Zellen mittels Puffer aus der Separationssäule gespült und aufgefangen.

### 3.2.2 Isolation myeloider dendritischer Zellen

Im Fokus der Untersuchungen standen die CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC. Gemäß Herstellerprotokoll wurden die mDC mittels CD1c<sup>+</sup>-Isolationskit aus den PBMC isoliert. Zuerst wurden die BC mit CD19-*Microbeads* depletiert, da auch diese das für die mDC charakteristische CD1c exprimieren. Nach einer Inkubation für 15 min bei 4°C wurden die Zellen bei 528 × g und 4°C gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine LD-Säule pipettiert, um die BC zu depletieren. Im nächsten Schritt wurde mit den negativ-selektierten Zellen weitergearbeitet und Anti-Biotin-*Microbeads* zur bereits CD1c-Biotin gelabelten Zellsuspension hinzupipettiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Zellsuspension über zwei MS-Säulen gegeben und mittels Stempeldruck die positiv markierten Zellen aus der Säule eluiert. Die Zellsuspension wurde in Kulturmedium resuspendiert und vor der weiteren Verwendung bei 4°C verwahrt.

### 3.2.3 Isolation naiver T-Zellen

Die naiven TC (nTC) wurden gemäß Herstellerangaben mit dem MACS<sup>®</sup> CD4 MultiSort Kit isoliert. Zuerst wurden CD4 MultiSort *Microbeads* zu den PBMC hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4°C wurde die Zellsuspension bei 300 × g und 4°C gewaschen und anschließend auf eine LS-Säule pipettiert. Die mit den CD4 *Microbeads* gelabelten Zellen wurden als positive Fraktion durch Stempeldruck aus der LS-Säule entfernt und über eine neue LS-Säule gegeben, um die Reinheit der positiven Fraktion zu erhöhen. Im folgenden Arbeitsschritt wurde MultiSortRelease-Reagenz zur Zellsuspension gegeben, wodurch die CD4 MultiSort *Microbeads* von den Zellen entfernt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurde die Zellsuspension über eine MS-Säule gegeben, um noch restliche an CD4 *Microbeads* gebundene Zellen aus der Zellsuspension zu entfernen. Dazu wurde die negative Fraktion aufgefangen und bei 300 × g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das MultiSortStop-Reagenz hinzugefügt, um die Reaktion des MultiSortRelease-Reagenz zu stoppen. Die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit einem zweiten Marker, den CD45RA *Microbeads* gelabelt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4°C wurde die Zellsuspension für 10 min bei 300 × g zentrifugiert. Um die CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Zellen zu isolieren, wurde die Zellsuspension über eine MS-Säule gegeben. Die positive Fraktion wurde mittels Stempeldruck aus der Säule entfernt und auf eine neue MS-Säule gegeben, um die Reinheit der Fraktion zu erhöhen. Anschließend wurden die CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Zellen in Kulturmedium resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### **3.3 Überprüfung der Reinheit myeloider dendritischer Zellen und naiver T-Zellen**

Von den gewonnenen Zellsuspensionen wurden 100  $\mu\text{l}$  zur Bestimmung der Vitalität, Reinheit und Zellzahl abgenommen. Die isolierten mDC wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1c, CD11c und CD14 gefärbt. Die naiven TC wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD45RA und CD4 markiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden die Zellen mit kaltem PBA bei  $528 \times g$  und 4°C für 6 min gewaschen. Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Zellen in PBA und Propidiumiodid (PI,  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) resuspendiert. PI diffundiert durch die Zellmembran avitaler Zellen, wodurch diese Zellen angefärbt und gemessen werden können. Die Überprüfung der Reinheit, Zellzahl und Vitalität der Zellpopulation erfolgte am FACS Calibur<sup>TM</sup>. Proben mit einer Reinheit  $\geq 95\%$  wurden für die weiteren Zellkulturversuche verwendet.

### **3.4 Zellkultur**

#### **3.4.1 Zellkultur myeloider dendritischer Zellen**

Der experimentelle Aufbau der Versuche erfolgte wie in Abbildung 5 gezeigt.  $5 \times 10^4$  mDC wurden für 21 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 150  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung der 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden.

Abhängig vom Zellkulturansatz wurde zu den mDC im Kulturmedium LPS in der Konzentration  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  und hefekonditioniertes Medium in den Verdünnungen 1:2, 1:8 oder 1:32 hinzupipettiert. Dabei diente der Ansatz aus LPS-stimulierten mDC als Kontrollansatz. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 96-Mikrotiterplatte bei  $198 \times g$ , RT für 1 min zentrifugiert. Für die Messung der Sekretionen von TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden aus den jeweiligen Vertiefungen 120  $\mu\text{l}$  Zellkultur-Überstand entnommen, in Mikroreaktionsgefäße überführt und vor der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die mDC wurden für weiterführende Experimente gewonnen.

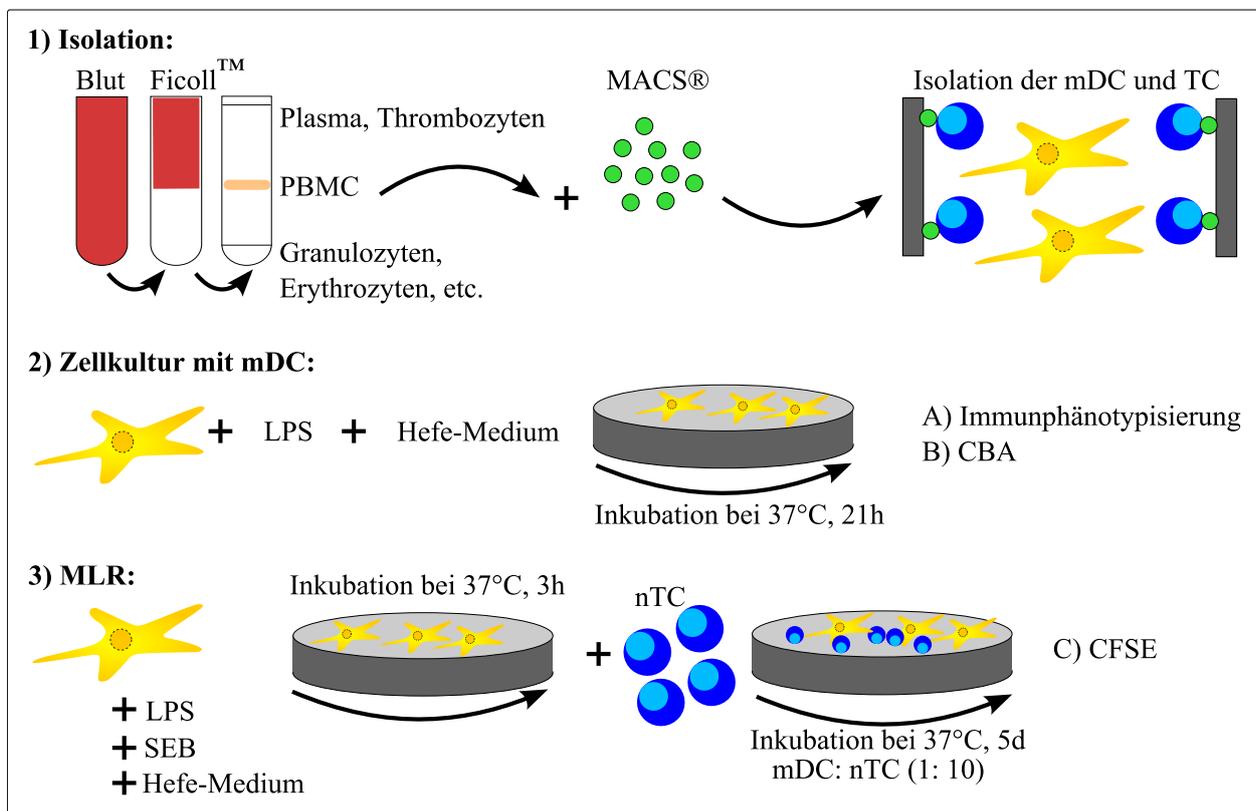
#### **3.4.2 CFSE-Färbung**

Die nTC wurden vor dem Einsatz in der Kokultur mittels Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE) angefärbt. CFSE ist ein Fluorochrom, das von Zellen aufgenommen und während der Proliferation zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die nTC wurden nach der Isolation mit sterilem PBS bei  $528 \times g$  und 4°C gewaschen. Nach dem Dekantieren des Waschpuffers wurde das Zellpellet im Dunkeln mit PBS und der CFSE-Färbelösung im Verhältnis 1:2 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 min bei Dunkelheit wurde die Reaktion durch Hinzufügen von Kulturmedium gestoppt und bei  $528 \times g$  und 4°C gewaschen.

### 3.4.3 Gemischte Lymphozytenreaktion

In der gemischten Lymphozytenreaktion (engl. *mixed lymphocyte reaction*, MLR) wurden mDC und nTC in einem Verhältnis 1:10 in Kokultur gebracht und für fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Abbildung 5). Die Vertiefungen der 96-Mikrotiterplatte mit V-förmigen Boden enthielten ein Gesamtvolumen von jeweils 150 µl.

Nach der Isolation wurden  $1 \times 10^4$  mDC abhängig vom Ansatz ohne Stimulus oder mit LPS 12.5 ng ml<sup>-1</sup> und hefekonditioniertem Medium für 3h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von CFSE gefärbten nTC im Verhältnis 1:10. Zum Ausschluss von Autoproliferation wurden nTC in Kulturmedium ohne Stimulus inkubiert. Als Proliferationskontrolle wurden nTC mit verdünntem Staphylokokken Enterotoxin B von *Staphylococcus aureus* (SEB) im Verhältnis 1:150 stimuliert.

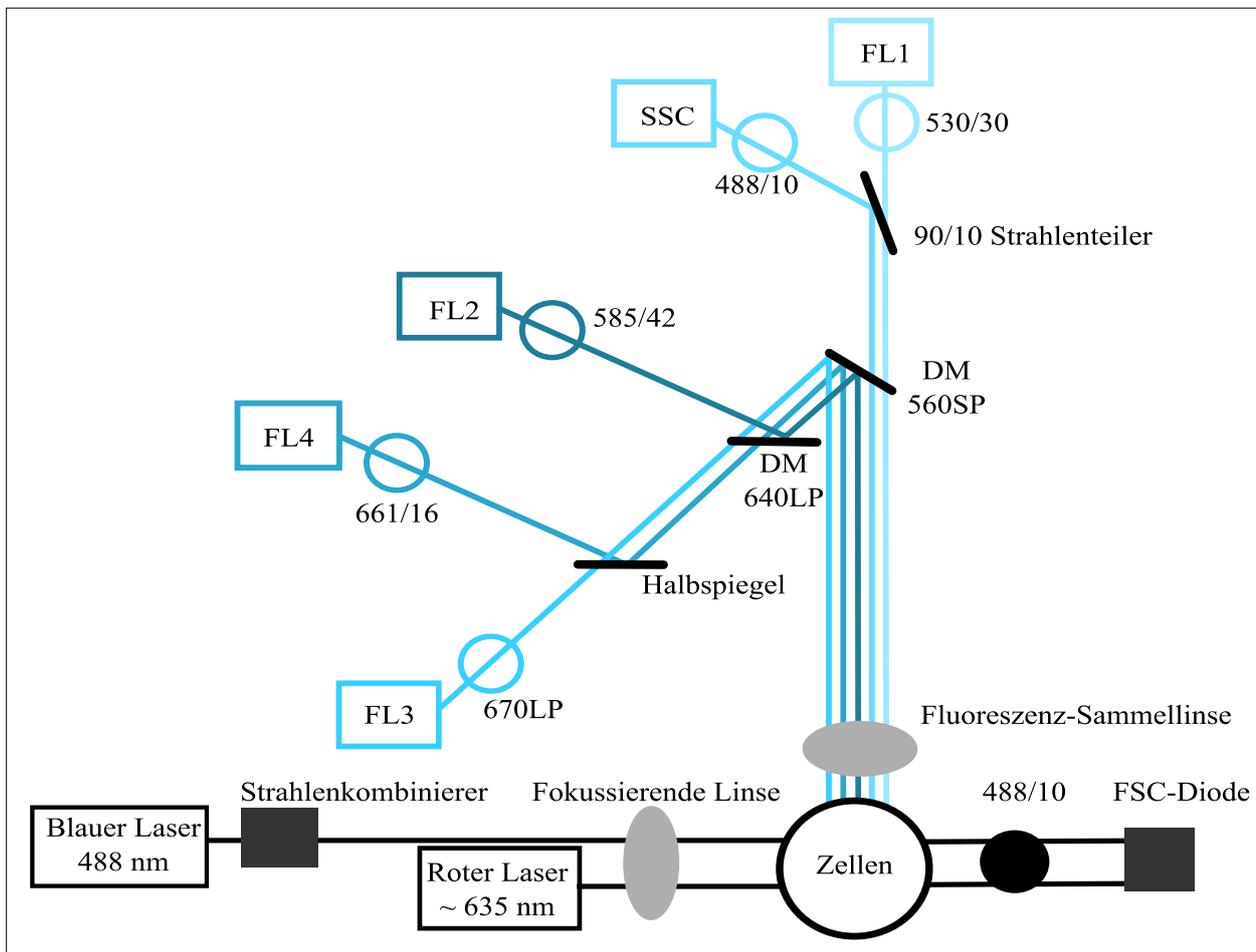


**Abbildung 5: Der experimentelle Aufbau der Zellkulturexperimente.** Nach der Isolation der PBMC mittels Ficoll<sup>TM</sup>-Dichtegradientenzentrifugation wurden mDC oder TC isoliert. Der folgende Zellkulturversuch bestand aus einer 21 h mDC-Kultur oder aus einer fünftägigen gemischten Lymphozytenreaktion, bestehend aus der Kokultur von mDC und TC. Anschließend wurde abhängig vom durchgeführten Versuch der mDC-Phänotyp sowie die mDC-Zytokinsekretion im Zellkultur-Überstand oder die TC-Proliferation gemessen. LPS (Lipopolysaccharid), Staphylokokken Enterotoxin B von *Staphylococcus aureus* (SEB), gemischte Lymphozytenreaktion (engl. *mixed lymphocyte reaction*, MLR).

## 3.5 Durchflusszytometrie

### 3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie wird die Messung von zellspezifischen Fluoreszenzintensitäten und Streulichteigenschaften ermöglicht. Das Prinzip der Durchflusszytometrie wird anhand des optischen Systems des FACS Calibur™ dargestellt (Abbildung 6). In einer Trägerflüssigkeit gelöste Zellen werden in einer Messküvette einzeln an einem blauen (488 nm) und roten (~ 635 nm) Laser in einem Winkel von 90° vorbeigeführt. Das Vorbeiführen einzelner Zellen in einer laminar fließenden Trägerflüssigkeit wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.



**Abbildung 6:** Das optische System des FACS Calibur™. Zellen in einer Trägerlösung werden mittels hydrodynamischer Fokussierung an einem blauen (488 nm) und roten (~ 635 nm) Laser vorbeigeführt. Die zellulären Eigenschaften, wie die Zellgröße oder die Granularität werden durch das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) charakterisiert. Die relativen Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Fluorochrome können auf vier Kanälen gemessen und die Lichtsignale der Fluoreszenzen mittels Photomultiplier (engl. *photomultiplier tube*, PMT) verstärkt werden. Es werden Filter (engl. *long pass filter*, LP und engl. *short pass filter*, SP) sowie Spiegel (engl. *dichroic mirror*, DM) zur Messung eingesetzt. Adaptiert nach BD Biosciences.

Abhängig von den zelltypspezifischen Charakteristika wird das Licht unterschiedlich stark gebrochen. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) wird auf der Zelloberfläche gebeugt und ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) wird durch Granula im Zytoplasma gebrochen sowie reflektiert und ist proportional zur Zellkomplexität. Zusätzlich zur morphologischen Charakterisierung können mit dem Durchflusszytometer relative Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Die zuvor konjugierten Fluorochrome absorbieren die Energie des einfallenden Lichts und werden dadurch angeregt. Die Energieabgabe erfolgt unter Wärmeabstrahlung sowie Emission eines Photons höherer Wellenlänge. Dabei nimmt die relative Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts mit der Anzahl gebundener Fluorochrome zu.

Die optischen Signale, bestehend aus FSC, SSC und den relativen Fluoreszenzintensitäten werden durch das Detektionssystem des FACS Calibur<sup>TM</sup> erfasst und die Informationen an ein elektronisches Verarbeitungssystem weitergegeben.

Im Gegensatz zum FACS Calibur<sup>TM</sup> ist das FACS Canto II<sup>TM</sup> mit drei Lasern ausgestattet. Die Wellenlängen des Lichts betragen beim blauen Laser 488 nm, beim violetten 405 nm und beim roten Laser 633 nm. Das FACS Canto II<sup>TM</sup> kann neben dem FSC und SSC acht Fluoreszenzen messen.

### 3.5.2 Messung der Reifemarker myeloider dendritischer Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 21 h wurden die mDC mit kaltem PBA aus den Vertiefungen der 96-Mikrotiterplatte gespült, in unterschiedliche FACS-Röhrchen überführt und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD80, CD40 und CCR7 für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der Inkubationsschritt wurde mit 1 ml kaltem PBA gestoppt, anschließend bei  $528 \times g$  und 4°C für 6 min abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Waschpuffer dekantiert und das Zellpellet in PBA und PI ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben am FACS Calibur<sup>TM</sup> gemessen.

### 3.5.3 Messung der T-Zell-Proliferation

Nach fünf Tagen Inkubation der MLR wurden die Zellen aus den jeweiligen Vertiefungen der 96-Mikrotiterplatte gewonnen. Die Zellen wurden mit PBA gewaschen und in  $300 \mu\text{l}$  PBA und PI ( $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) resuspendiert. Anschließend folgte die Messung der TC-Proliferation am FACS Calibur<sup>TM</sup>.

## 3.6 Messung der Zytokinkonzentrationen

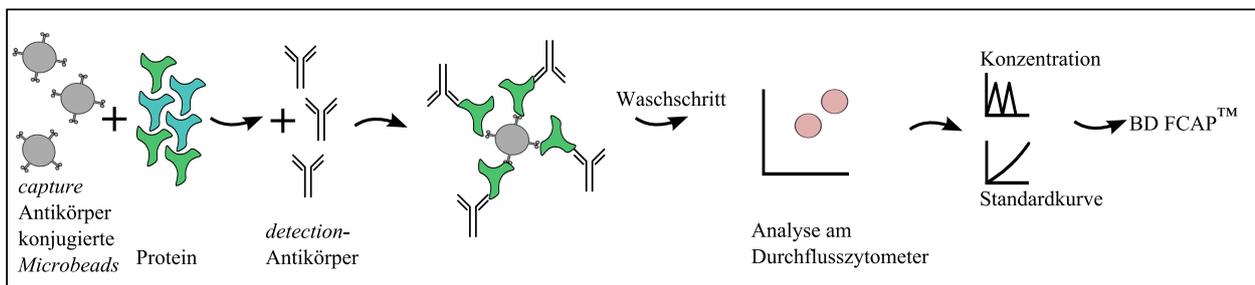
Die in den Zellkultur-Überstand sezernierten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) gemessen. Dazu wurden zwei Populationen von *Beads* mit unterschied-

lichen Fluoreszenzintensitäten eingesetzt. Durch die spezifische Bindung der Erfassungs-(engl. *capture*) Antikörper an TNF- $\alpha$  und IL-10 sowie die Anlagerung eines PE-konjugierten Detektions-(engl. *detection*) Antikörpers konnten die unterschiedlichen Konzentrationen quantitativ bestimmt werden.

### 3.6.1 Prinzip des *Cytometric Bead Array*

Der CBA ist ein Immunassay, mit dem die Konzentration löslicher Analyten indirekt über eine Fluoreszenzmarkierung gemessen werden kann (Abbildung 7). Mit dieser Methode wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 in den Zellkultur-Überständen bestimmt.

Beim CBA sind die *capture*-Antikörper an ein Polymerkügelchen (engl. *Bead*) gekoppelt, das sich in einer flüssigen Phase befindet. Die *capture*-Antikörper lagern sich spezifisch an die gesuchten Analyten an. Jeder *Bead* besitzt eine definierte Fluoreszenzintensität, sodass mehrere Analyten gleichzeitig bestimmt werden können. Der mit PE konjugierte *detection*-Antikörper bindet spezifisch an ein weiteres Epitop des gesuchten Analyten. Die zweifache Antikörperbindung führt zur Ausbildung eines sog. Sandwich-Komplexes. Die Anzahl gebundener PE-konjugierter *detection*-Antikörper nimmt mit der Konzentration der Zytokine zu und bestimmt die Intensität des messbaren PE-Fluoreszenzsignals.



**Abbildung 7:** Prinzip des *Cytometric Bead Array*. Die löslichen Analyten, beispielsweise Zytokine, werden von den *capture*-Antikörpern gebunden. Anschließend werden PE-konjugierte *detection*-Antikörper hinzugefügt, die sich spezifisch an ein weiteres Epitop des Analyten anlagern, sodass sich ein sog. Sandwich-Komplex ausbildet. Durch einen Waschschriff werden restliche ungebundene PE-konjugierte *detection*-Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die Messung der Zytokinkonzentrationen am FACS Canto™ II und die Auswertung mit der BD FCAP™ Software. Adaptiert nach BD Biosciences.

### 3.6.2 Messung der Zytokine mit dem *Cytometric Bead Array*

Gemäß Herstellerprotokoll wurden die Proben gemessen und analysiert. Es wurde eine Standardreihe angelegt, um die Zytokinkonzentrationen in den gemessenen Proben zu bestimmen. Die im Kit enthaltenen lyophilisierten Standards von TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden in 2 ml *Assay Diluent* in einer Konzentration von 5000 pg ml<sup>-1</sup> gelöst. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde mittels serieller Verdünnung eine Reihe aus zehn Standards angelegt (5000 pg ml<sup>-1</sup> bis 0 pg ml<sup>-1</sup>).

Jeweils 50  $\mu\text{l}$  der einzelnen Standards sowie der Zellkultur-Überstände wurden zu den *capture beads* hinzugefügt und in Dunkelheit für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die PE konjugierten *detection*-Antikörper hinzugefügt und die Proben wurden für weitere 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von Waschpuffer gestoppt. Nach dem Waschen bei  $200 \times g$  für 5 min bei RT wurde der Waschpuffer dekantiert und die Proben in 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer resuspendiert und diese am FACS Canto<sup>TM</sup> II gemessen. Anschließend wurden die Proben mit der FCAP Array<sup>TM</sup> Software ausgewertet.

### 3.7 Herstellung hefekonditionierter Überstände

Zum späteren Einsatz in der Zellkultur wurden aus den Hefen *Sc* und *Sb* hefekonditionierte Medien hergestellt. Die Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.7.1 Herstellung konventioneller Hefe-Überstände

Die Methode wurde von der Arbeitsgruppe in vorherigen Arbeiten etabliert [84]. Zur Herstellung eines konventionellen Hefe-Überstands wurden die lyophilisierten, pharmazeutisch erhältlichen Präparate Eubiol<sup>®</sup> sowie Ultra-Levure<sup>®</sup> in einer Konzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  in RPMI 1640 gelöst und bei  $37^\circ\text{C}$  für 24h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bei  $2000 \times g$  und für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen  $0.2 \mu\text{m}$  Filter gegeben, um restliche Hefezellen zu entfernen. Vor der weiteren Verwendung wurden die steril filtrierten Hefe-Überstände bei  $-20^\circ\text{C}$  weggefroren.

#### 3.7.2 Bestimmung der mittleren Zellzahl der konventionellen Hefe-Kulturen

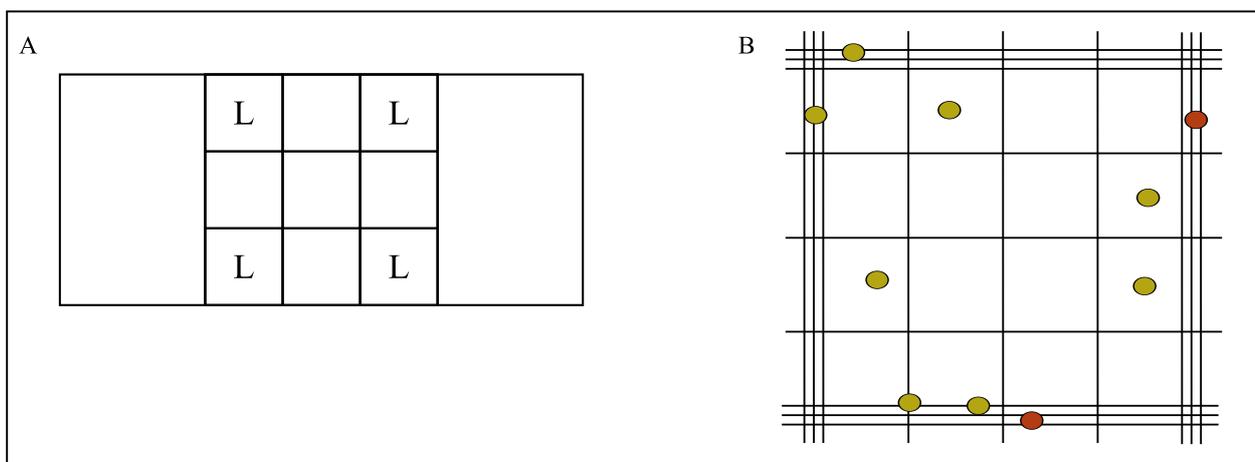
*Sb* (Ultra-Levure<sup>®</sup>) wurde in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in der Konzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  eingesetzt [84]. *Ca* ist in größerer Zellzahl und als pharmakologisches Präparat nicht erhältlich. Um einen Vergleich zwischen probiotischen und humanpathogenen Hefen zu ermöglichen, wurden die probiotischen Hefen in  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  gelöst und die Zellzahl der konventionellen Hefe-Kulturen durch Auszählen in einer Zählkammer ermittelt und ein Mittelwert gebildet.

Dafür wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet, die aus neun Großquadraten mit einer Kantenlänge von je 1 mm aufgebaut ist. Die Kammertiefe beträgt 0.1 mm. Somit ergibt sich ein Volumen von  $0.1 \text{ mm}^3$  für jedes Großquadrat. In die Berechnung der totalen Zellzahl gehen neben dem Volumen des Großquadrates auch der Verdünnungsfaktor, das Gesamtvolumen aus dem die Hefezellen

entnommen wurden und die ausgezählte Zellzahl ein (Formel (1)).

$$\text{Totale Zellzahl} = \frac{10^4}{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times \text{ausgezählte Zellen} \quad (1)$$

Der Aufbau der Neubauer-Zählkammer und die Methode zum Auszählen der Hefen ist in Abbildung 8 gezeigt. Zur Auszählung der Hefen wurden die Großquadrate verwendet, die auch zur Auszählung von Leukozyten benutzt werden. Diese Großquadrate besitzen nach allen Seiten dreifache Begrenzungslinien. Es wurden diejenigen Zellen mitgezählt, die sich in den Großquadraten befanden. Zellen auf den äußeren Begrenzungslinien wurden nur oben und links mitgezählt.



**Abbildung 8:** Aufbau der Neubauer-Zählkammer und das Auszählen der Hefezellen. Die Neubauer-Zählkammer setzt sich aus neun Großquadraten zusammen (A). Die Eckquadrate werden für die Leukozytenzählung verwendet. Aufbau eines Großquadrates für die Leukozytenzählung (B), das nochmals in 16 Kleinquadrate unterteilt ist, die nach außen durch drei Begrenzungslinien abgetrennt sind. Diejenigen Zellen, die rechts und unten die äußere Begrenzungslinie berührten, wurden nicht mitgezählt. L: Großquadrat der Leukozytenzählung.

Zur Berechnung der mittleren Zellzahl wurden drei Hefe-Kulturen mit der Konzentration  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  hergestellt. Nach Lösen der Hefen in PBS wurden diese unmittelbar ausgezählt.

### 3.7.3 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926, *Saccharomyces boulardii* und *Candida albicans* ATCC 2091

Zur Hefe-Anzucht wurde die Methode von Nissen *et al.* modifiziert [86]. Dazu wurden die lyophilisierten Hefen *Sc* und *Sb* zur Anzucht in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurde 200 ml frisch angesetztes autoklaviertes YPD-Flüssigmedium dazugegeben. Nach Verschluss des Erlenmeyerkolbens mit einem sauerstoffdurchlässigen Deckel wurde die Suspension auf einem Schüttelinkubator bei  $120 \times \text{rpm}$  und  $30^\circ\text{C}$  bis zur Eintrübung geschüttelt. Damit alle drei Pilze morphologisch als Hefen wuchsen, wurde eine Wachstumstemperatur von  $30^\circ\text{C}$  gewählt [87].

Zur Anzucht von *Ca* wurden BD Microtrol™ Scheiben mit dem mikrobiologischen Kontrollstamm ATCC® 2091 (engl. *american type culture collection*, ATCC®) verwendet. Gemäß Herstellerprotokoll wurde *Ca* vor seiner Verwendung aus dem -20°C Gefrierschrank genommen und für 2h bei RT aufgewärmt. Mit einer sterilen Pinzette wurden BD Microtrol™ Scheiben aus dem Gefäß entnommen, in den 1000 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit frisch angesetzttem autoklaviertem YPD-Flüssignährmedium durch leichtes Schütteln gelöst und dann ebenfalls in den Schüttelinkubator gebracht.

Sobald das Medium eingetrübt war, wurden die Hefen aus dem Erlenmeyerkolben in mehrere 50 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal bei  $2000 \times g$  und 30°C für 15 min mit YPD gewaschen. Anschließend wurden die Hefen in sterile Erlenmeyerkolben mit frisch angesetzttem YPD überführt und erneut bis zur Eintrübung geschüttelt.

#### **3.7.4 Herstellung von Hefe-Kulturen mit definierter Zellzahl**

Zur Auszählung wurde die Suspension entnommen, in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal bei  $2000 \times g$ , 30°C für 15 min zentrifugiert. Die Hefen wurden in 50 ml YPD-Flüssigmedium resuspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Sobald die Hefe-Kulturen auf die mittlere Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt werden konnten, wurden *Sc*, *Sb* und *Ca* dreimal in RPMI 1640 gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in Zellkulturflaschen mit sauerstoffdurchlässigem Deckel für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Hefe-Überstand wie bei der Herstellung eines konventionellen Hefe-Überstands weiterverarbeitet.

### **3.8 Auftrennung der hefekonditionierten Überstände nach molekularer Größe mittels Membranpartitionschromatografie**

Für die Auftrennung der Hefe-Überstände nach molekularer Größe wurden Amicon® Filter verwendet. In absteigender Reihenfolge wurden die fünf Filtergrößen 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa und 3 kDa benutzt. Die 100 kDa Filter wurden bei  $1500 \times g$  und 4°C für 40 Minuten zentrifugiert. Die Filter mit einer Größe von 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa und 3 kDa wurden bei  $1500 \times g$  und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Von allen Filtraten wurden Proben entnommen. Die Filtrate <100-3 kDa und die Retentate R100-R3 wurden entsprechend gekennzeichnet und vor der jeweiligen Verwendung in der Zellkultur bei -20°C weggefroren.

### **3.9 Herstellung der Elutionsreihe aus Hefe-Medien von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926**

Für die Herstellung der Elutionsreihe wurde das aus der Membranpartitionschromatographie gewonnene Filtrat *Sc* <3 kDa verwendet. Mit dieser Methode wurden die humoralen Komponenten nach ihren hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften aufgetrennt. Dafür wurden die hefekonditionierten Überstände über eine Strata<sup>®</sup> C18-Säule gegeben und mit fünf unterschiedlich konzentrierten Elutionsmitteln aus der Säule eluiert. Der Volumenanteil von Methanol im Elutionsmittel wurde schrittweise von 0%, 20%, 40%, 60%, 80% auf 100% erhöht.

Die Strata<sup>®</sup> C18-Säule wurde zuerst mit reinem Methanol gespült, wobei ein Trockenlaufen der Säule verhindert wurde. Anschließend wurde die C18-Säule für das erste Elutionsmittel vorbereitet und mit Aqua dest. gespült. Nun wurden 5 ml *Sc* <3 kDa auf die Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und die Säule mit 2 ml Aqua dest. gespült (Eluat 1, E1). Für das zweite Eluat wurde die Säule mit 2 ml 20% Methanol gespült und E2 in einem neuen 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die weiteren Eluate (E3-E6) wurden jeweils hergestellt, indem die Strata<sup>®</sup> C18-Säule mit 40%-, 60%-, 80%-, 100%-Methanol gespült und die Eluate in 15 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Lösungsmittel aus den Eluaten entfernt, indem die Proben volumina mit dem Centrivac Vakuumkonzentrator einrotiert wurden. Die jeweiligen Rückstände im Mikroreaktionsgefäß wurden mit Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen rekonstituiert und vor dem Einsatz in der Zellkultur bei -20°C gelagert.

### **3.10 Enzymatischer Verdau des hydrophilen Eluats mittels $\beta$ -Glukanase**

Der  $\beta$ -Glukanase-Verdau sollte zeigen, ob der antiinflammatorische Effekt nach Verdau eventuell vorhandener Glukane nachweisbar ist. Für diesen Versuch wurde *ScE1*, in dem hydrophile Komponenten gelöst waren, aus der Elutionsreihe mit einer  $\beta$ -Glukanase verdaut. Ein weiterer Ansatz ohne Enzym diente der Überprüfung der Komponenten des Eluats auf Hitzestabilität. Um Effekte durch die Anwesenheit des Enzyms bzw. seiner Denaturierungsprodukte beim Einsatz in der späteren Zellkultur auszuschließen, wurde ein zusätzlicher Ansatz angelegt, in dem die  $\beta$ -Glukanase zum Kulturmedium hinzugefügt wurde.

In zwei Mikroreaktionsgefäße wurden jeweils 200  $\mu$ l *ScE1* pipettiert und in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß wurden 200  $\mu$ l RPMI vorgelegt. Die drei Mikroreaktionsgefäße wurden im Heizblock bei 70°C für 15 min vorinkubiert. Anschließend wurde zu *ScE1* 10  $\mu$ l der  $\beta$ -Glukanase dazugegeben. Für den Ansatz zur Überprüfung der Hitzestabilität wurde kein Enzym dazupipettiert. Zu den 200  $\mu$ l RPMI 1640 wurden 10  $\mu$ l  $\beta$ -Glukanase hinzugefügt. Alle Probengefäße wurden wieder in

den 70°C Heizblock für 24h überführt. Die Enzymaktivitäten wurden durch Hitzedenaturierung beendet, indem die Mikroreaktionsgefäße für 15 min bei 95°C inkubierten. Anschließend wurden die Proben auf RT abgekühlt und vor Einsatz in der Zellkultur bei -20°C weggefroren.

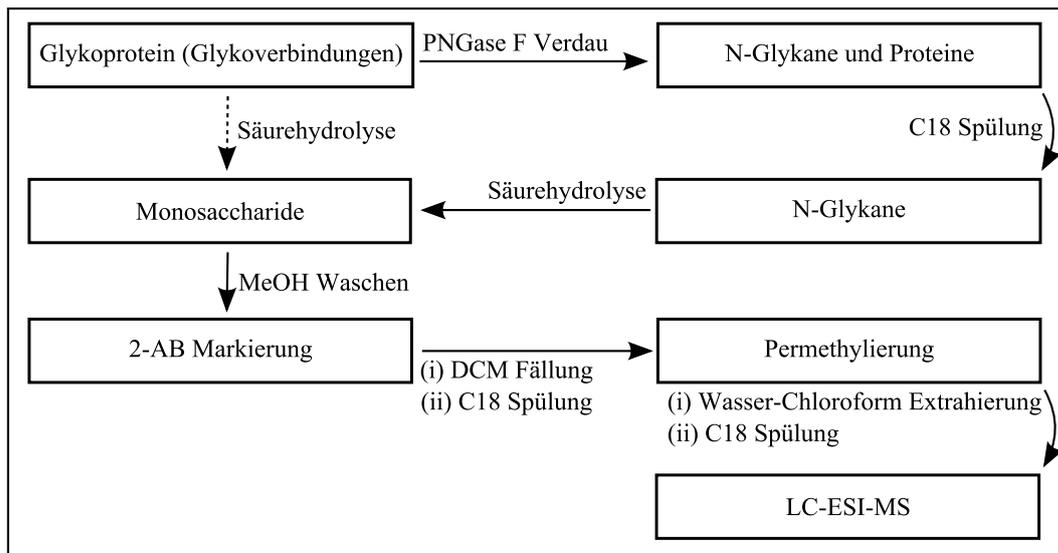
### 3.11 Monosaccharidanalyse

Die Monosaccharidanalyse wurde mithilfe der Arbeitsgruppe *Glycoproteomics* (Leitung PhD Dr. D. Kolarich, Max-Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin) durchgeführt. Die mit definierter Zellzahl hergestellten Hefe-Überstände *SbÜ*, *ScÜ*, *CaÜ* sowie deren Filtrate *Sb* <3 kDa, *Sc* <3 kDa und *Ca* <3 kDa wurden auf ihre Monosaccharid-Zusammensetzung mittels LC-ESI-MS bestimmt.

#### 3.11.1 LC-ESI-MS basierte Analyse der Monosaccharide

Um die Zusammensetzung der Monosaccharide der in den Hefe-Medien vermuteten Glykanverbindungen zu bestimmen, wurden mittels Säurehydrolyse die vermeintlichen Glykokonjugate in Monosaccharide gespalten (Abbildung 9). Die Monosaccharide wurden mittels reduktiver Aminierung mit 2-Aminobenzamid (2-AB) markiert. 2-AB ist ein Fluorochrom, das die spektrale Absorption aber auch die Hydrophobizität der Monosaccharide erhöht, sodass die Detektion mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) und Elektrospray-Ionisation mit Tandem Massenspektrometrie (engl. *electrospray mass spectrometry*, ESI-MS) verbessert wird. Die markierten Zucker können durch Hinzufügen von Dichlormethan von überschüssigen 2-AB und Salzen getrennt werden, welche in die wässrige Phase übergehen. Die 2-AB markierten Monosaccharide werden hingegen durch Dichlormethan präzipitiert und dadurch aufgereinigt. Durch die Elimination der Salze wird der nächste Schritt der Permethylierung erleichtert. Dieser verbessert deutlich das Ionisierungsverhalten und die Quantifizierung der Zucker mittels LC-ESI MS/MS.

Die LC-ESI MS/MS Analysen wurden mit einem *amaZon ETD speed* Ionenfallenmassenspektrometer, an welches eine Ultimate 3000 RSLC nano-LC gekoppelt war, durchgeführt. Die Proben wurden erst über eine Vorsäule geladen und entsalzt (Laufmittel: 0,1 % Ameisensäure, 8 µl/min Flussrate). Anschließend wurden die Proben mittels einer analytischen Chromatographiesäule (ProteCol™ Capillary Column) aufgetrennt. Mit Hilfe eines linearen Lösungsmittelgradienten (Lösungsmittel B, Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, 1-13 % Laufmittel B innerhalb von 3 Minuten, danach 13 % auf 30% Laufmittel B innerhalb der nächsten 63 min) wurden die unterschiedlichen Monosaccharide aufgetrennt und identifiziert. Die Elutionszeitpunkte und spezifischen Signaturspektren wurden zuvor mit unabhängigen Standards (Glukose, Galaktose, Xylose, Mannose) erstellt.



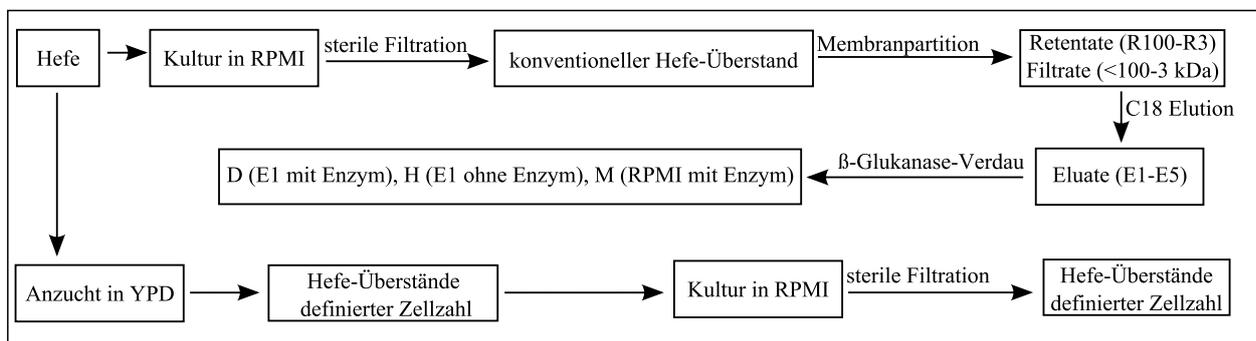
**Abbildung 9:** Arbeitsschema der Monosaccharidanalyse. 2-AB: 2-Aminobenzamid, DCM: Dichlormethan, MeOH: Methanol, LC-ESI-MS: Flüssigkeitschromatographie mit Elektrosprayionisation und Tandem Massenspektrometrie. Adaptiert nach [88].

### 3.12 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mit SPSS 21 dokumentiert und berechnet. Es sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) dargestellt ( $MW \pm SD$ ). Die gemessenen Zytokine wurden aufgrund stark schwankender pg/ml Werte im LPS-stimulierten Kontrollansatz gleich 100 % gesetzt und die Verdünnungsansätze auf den zugehörigen Kontrollansatz normalisiert. Für die Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Wurden mehr als zwei unabhängige Gruppen miteinander verglichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < .05$  wurde als statistisch signifikant gewertet und konsekutiv die Nullhypothese abgelehnt. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus sind entsprechend gekennzeichnet:  $p < .05 = *$ ,  $p < .01 = **$ ,  $p < .001 = ***$ .

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der bereits durch die Arbeitsgruppe nachgewiesene antiinflammatorische Effekt von *Sb* auf *in vitro* Entzündungsreaktionen auch mit anderen Hefen reproduziert werden kann. Die Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Hefe-Medien. Von besonderem Interesse war, ob es dabei Unterschiede zwischen probiotischen und humanpathogenen Hefen gibt. Dazu wurden Überstände von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 (Eubiol<sup>®</sup>), *Saccharomyces boulardii* (Ultra-Levure<sup>®</sup>) und *Candida albicans* ATCC 2091 (BD Microtrol<sup>™</sup>) hergestellt und vergleichende Untersuchungen angestrebt.



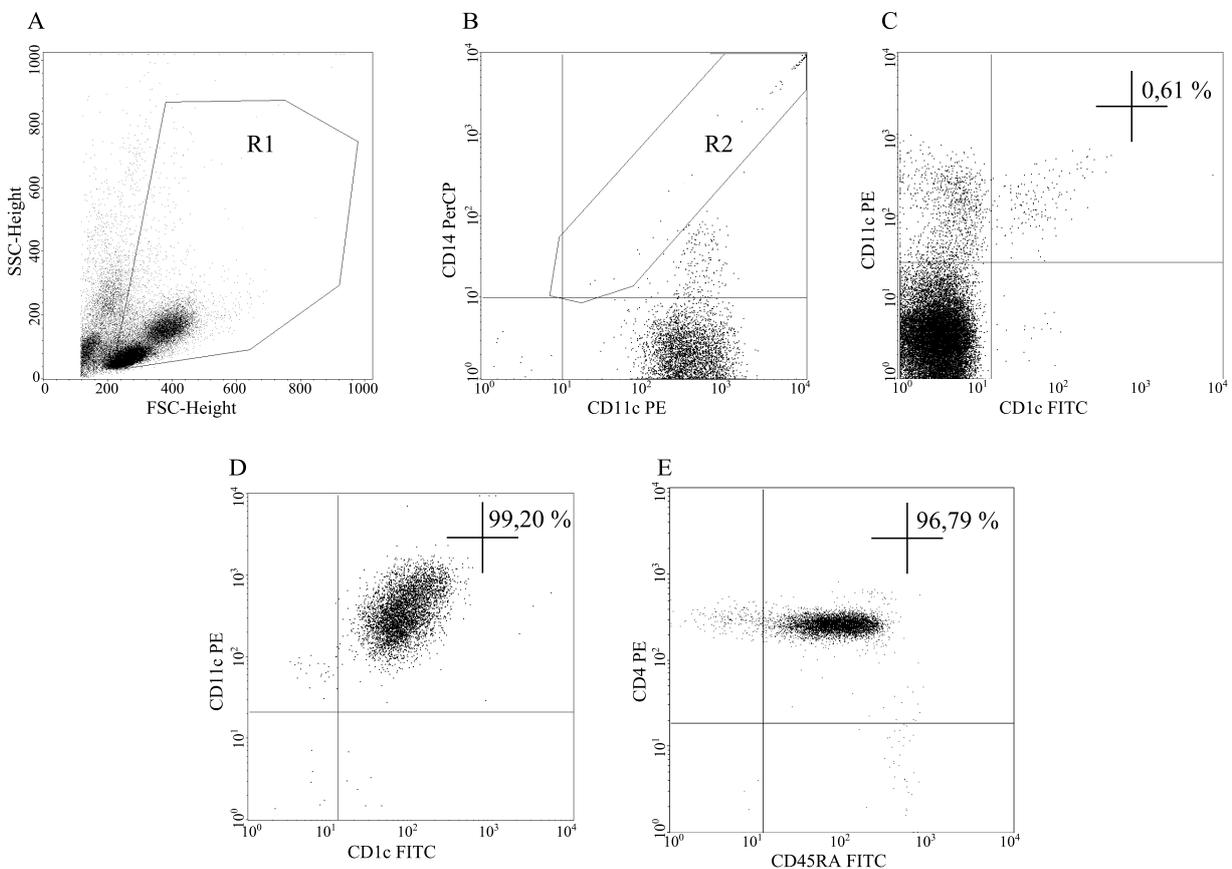
**Abbildung 10: Übersicht über die Herstellung der Hefe-Medien.** Zur Herstellung konventioneller Hefe-Medien wurde die probiotische Hefe *Sc* in RPMI kultiviert, steril filtriert und der Hefe-Überstand mittels Membranpartitionschromatographie in Retentate sowie Filtrate aufgetrennt. Das Filtrat *Sc* <3 kDa wurde auf eine Strata<sup>®</sup> C18 Säule gegeben, die Bestandteile mit Methanol in aufsteigender Konzentration eluiert und dadurch die Eluate E1-E6 erzeugt. Es schloss sich ein enzymatischer Verdau von E1 mit einer  $\beta$ -Glukanase an. Enzymatisch hydrolysiertes E1 wurde als D (Verdau) bezeichnet. Hitzebehandeltes E1 wurde mit H (Hitzebehandlung) beschriftet. In RPMI gelöstes Enzym wurde mit M (Medium) gekennzeichnet. Zur Gewinnung von Hefe-Medien mit definierter Zellzahl wurden *Sc*, *Sb* sowie *Ca* bis zu einer Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  in YPD angezogen, in RPMI gewaschen und anschließend in RPMI kultiviert. Durch sterile Filtration wurden Hefe-Überstände definierter Zellzahl erzeugt.

Zur quantitativen Bestimmung des entzündungshemmenden Effektes wurden die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD40 sowie der Migrationsmarker CCR7 und der Anteil in Zellkultur gestorbener Zellen bestimmt. Die in den Zellkulturüberstand sezernierten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden gemessen. In der gemischten Lymphozytenreaktion wurde die Wirkung des hefe-konditionierten Mediums auf die TC-Proliferation bestimmt.

Zur Aufklärung der molekularen Struktur der aktiven Komponenten wurden die hefekonditionierten Medien über eine Strata<sup>®</sup> C18-Säule gegeben, um die hydrophilen und hydrophoben Bestandteile zu trennen. Der im hydrophilen Anteil beobachtete positive Effekt führte zur Annahme, dass diverse Zuckerverbindungen, die zahlreich im Hefe-Stoffwechsel u.a. durch Umstrukturierung der Hefe-Zellwand entstehen, die antientzündlichen Komponenten sein könnten. Aufgrund der molekularen Größe von <3 kDa und der hydrophilen Eigenschaften wurde von Oligosacchariden ausgegangen und es schloss sich eine quantitative Monosaccharidanalyse und LC-ESI-MS/MS an.

## 4.1 Hohe Reinheit myeloider dendritischer Zellen und naïver T-Zellen nach magnetischer Zellseparation

Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMC aus Leukozytenfiltern oder peripherem Blut von Probanden gewonnen. Anschließend wurden mDC oder nTC durch magnetische Zellseparation isoliert. Repräsentative FACS-Plots zeigen, dass die Reinheit der mDC nach Isolation 99,20 % und die der nTC 96,79 % betrug (Abbildung 11). Eine Reinheit  $\geq 95\%$  wurde den durchgeführten Zellkulturexperimenten zugrunde gelegt.

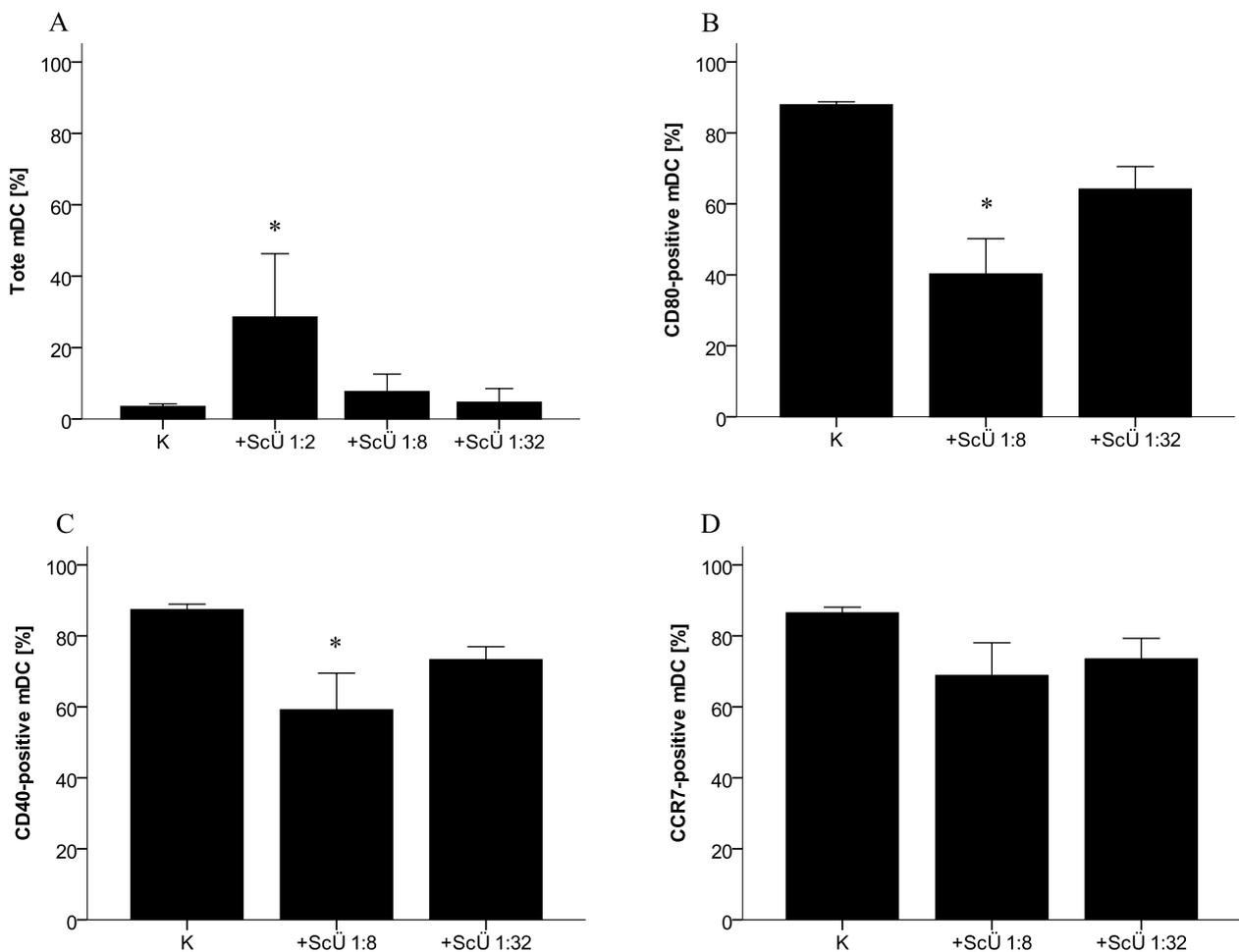


**Abbildung 11: Darstellung der Reinheit vor und nach magnetischer Zellseparation.** Charakterisierung der PBMC anhand der Granularität und Größe durch Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) und Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC). PBMC wurden durch Ziehen der Region 1 (R1) von Zelltrümmern isoliert (A). PI-Markierung und Ausgrenzen der toten Zellen aus R1 durch Legen der Region 2 (R2) (B). PBMC wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD1c FITC und CD11c PE gefärbt, die gegen spezifische Antigene der DC gerichtet sind (C). Reinheit der CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> mDC nach magnetischer Zellseparation (D). Reinheit der CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> nTC nach magnetischer Zellseparation (E).

## 4.2 Zellkultur mit konventionellem Hefe-Überstand

### 4.2.1 Die phänotypische Reifung der mDC wird durch ScÜ 1:8 gehemmt

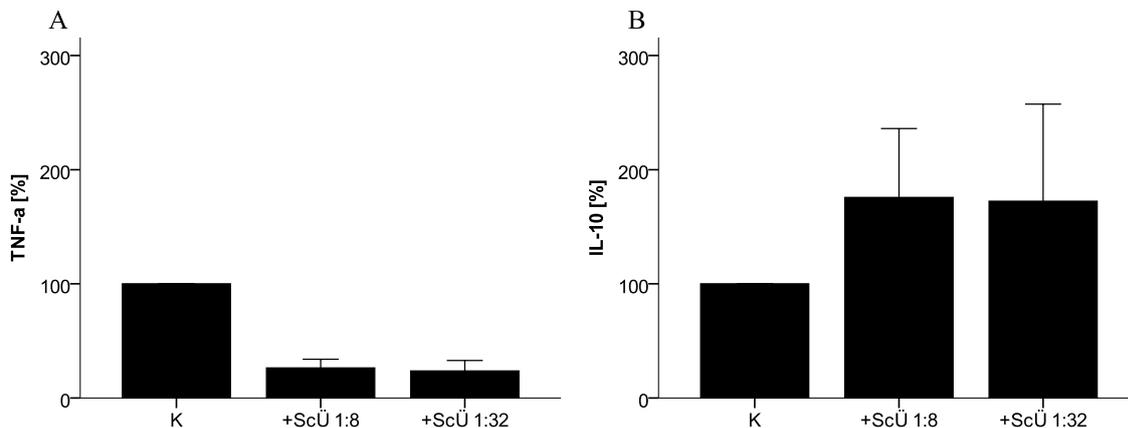
Die Herstellung von ScÜ erfolgte unter bereits für SbÜ etablierten Kulturbedingungen. Damit können die bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe beschriebenen positiven Effekte von SbÜ mit anderen probiotischen Hefen verglichen werden. Zusammen mit LPS wurden die Verdünnungen ScÜ 1:2, 1:8 und 1:32 in der mDC-Zellkultur eingesetzt. Ein Kontrollansatz, der nur aus LPS-stimulierten mDC ohne Zusatz von Hefe-Überstand bestand, wurde zum Vergleich angelegt.



**Abbildung 12: Darstellung der Expression der Reife- und Migrationsmarker in Abhängigkeit von ScÜ.** ScÜ wurde in den Verdünnungen 1:2, 1:8 und 1:32 zusammen mit mDC und LPS in der Zellkultur eingesetzt. Die toten Zellen wurden mit PI angefärbt (A). Die Marker der mDC wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD80 (B), CD40 (C) und CCR7 (D) gefärbt. Gemessen wurde der LPS-stimulierte Kontrollansatz (K) und LPS-stimulierte mDC, denen ScÜ in den Verdünnungen 1:2, 1:8 und 1:32 hinzugefügt wurde (n=4).  $p < .05 = *$ ,  $p < .01 = **$ ,  $p < .001 = ***$ .

In Abbildung 12 ist der Anteil in Zellkultur gestorbener mDC und der Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver mDC in Abhängigkeit von der Verdünnung des ScÜ dargestellt. Der Anteil toter mDC betrug im Kontrollansatz  $3,52 \pm 0,72$  % (A). Durch Hinzufügen von ScÜ 1:2 nahm der An-

teil toter mDC signifikant zu ( $28,54 \pm 17,77 \%$ ,  $p < .05$ ). Dagegen unterschied sich der Anteil toter mDC in den Ansätzen mit *ScÜ* 1:8 ( $7,67 \pm 4,90 \%$ ) und *ScÜ* 1:32 ( $4,69 \pm 3,83 \%$ ) nicht signifikant vom Kontrollansatz. Da *ScÜ* 1:2 in der Zellkultur einen erhöhten Anteil toter Zellen induzierte, werden die weiteren Ergebnisse mit *ScÜ* 1:2 nicht dargestellt. Der Anteil CD80-positiver mDC betrug in der LPS-stimulierten Kontrolle  $87,91 \pm 0,82 \%$  (B). Hinzugefügtes *ScÜ* 1:8 reduzierte signifikant den Anteil CD80-positiver mDC im Vergleich zum Kontrollansatz ( $40,21 \pm 9,98 \%$ ,  $p < .05$ ). Unter dem Einfluss von *ScÜ* 1:32 exprimierten  $64,14 \pm 6,38 \%$  der mDC den Reifemarker CD80. Der Anteil CD40-positiver mDC in der Zellkultur betrug im Kontrollansatz  $87,40 \pm 1,54 \%$  (C). Das in der Zellkultur eingesetzte *ScÜ* 1:8 reduzierte den Anteil CD40-positiver Zellen auf  $59,14 \pm 10,35 \%$  ( $p < .05$ ) und durch *ScÜ* 1:32 kam es zur CD40-Expression von  $73,28 \pm 3,65 \%$ . Die Effekte der *ScÜ*-Verdünnungsreihe auf den Migrationsmarker CCR7 sind in (D) abgebildet. Im Kontrollansatz waren  $86,46 \pm 1,63 \%$  positiv für CCR7. *ScÜ* 1:8 ( $68,84 \pm 9,20 \%$ ) und *ScÜ* 1:32 ( $73,49 \pm 5,80 \%$ ) reduzierten die Expression von CCR7 zwar, dies war aber im Vergleich zum LPS-stimulierten Kontrollansatz nicht signifikant. In der Abbildung 13 sind die im Zellkulturüberstand gemessenen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 in Abhängigkeit von den verwendeten Hefe-Medien dargestellt. Im Vergleich zum Kontrollansatz nahm TNF- $\alpha$  unter Hinzufügen von *ScÜ* 1:8 und *ScÜ* 1:32 ab ( $26,41 \pm 7,53 \%$  und  $23,76 \pm 9,16 \%$ ). Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle nahm IL-10 dahingegen unter Verwendung von *ScÜ* 1:8 ( $175,71 \pm 60,35 \%$ ) und *ScÜ* 1:32 ( $172,38 \pm 85,01 \%$ ) zu (B).

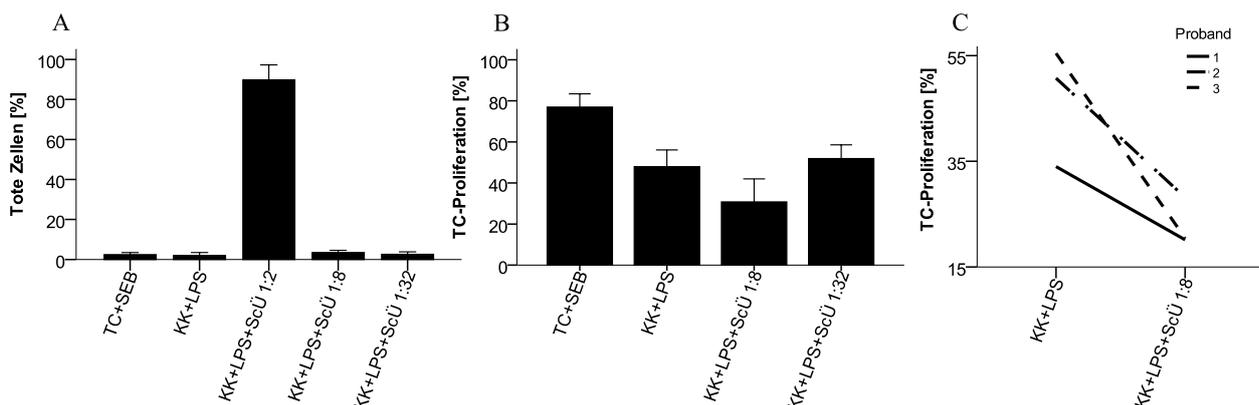


**Abbildung 13: Darstellung der Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 in Abhängigkeit von *ScÜ*.** *ScÜ* wurde in den Verdünnungen 1:8 und 1:32 zusammen mit mDC und LPS in der Zellkultur inkubiert. Die Zytokine im Zellkulturüberstand wurden mittels *CBA* gemessen. Es ist die Sekretion von TNF- $\alpha$  (A) und IL-10 (B) gezeigt. Die Messwerte der LPS-stimulierten Kontrolle wurden gleich 100 % gesetzt und die zugehörigen Ansätze auf diesen Wert normalisiert. Der Kontrollansatz bestand aus LPS-stimulierten mDC. In den Ansätzen *ScÜ* 1:8 und 1:32 wurden LPS-stimulierte mDC mit den verdünnten Hefe-Überständen inkubiert. (n=4).

#### 4.2.2 ScÜ 1:8 inhibiert in der gemischten Lymphozytenreaktion die Proliferation von T-Zellen

Mit der Verdünnungsreihe wurde der modulatorische Effekt von ScÜ auf die phänotypische Reifung der mDC veranschaulicht. Daran anknüpfend wurde die Hypothese aufgestellt, dass Sc somit die Proliferation von TC beeinflussen kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden mDC und CFSE gefärbte nTC in einer Kokultur zusammengegeben. Dafür wurden die mDC mit LPS und ScÜ (1:2, 1:8, 1:32) für 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer Vorinkubation stimuliert. Anschließend wurden nTC hinzugefügt. Als Proliferationskontrolle wurden TC mit Staphylokokken Enterotoxin B von *Staphylococcus aureus* (SEB) stimuliert. Die Ansätze wurden für fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und die TC-Proliferation gemessen.

In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Kokulturexperimente gezeigt. In der LPS-stimulierten Kokultur mit ScÜ 1:2 wurden 89,79 ± 7,47 % tote Zellen beobachtet (A). Im LPS-stimulierten Kokulturansatz sowie unter Hinzufügen von ScÜ 1:8 und ScÜ 1:32 war der Anteil toter Zellen <4%. Damit induzierte ScÜ 1:2, wie bereits für die mDC-Kultur beschrieben, einen hohen Anteil toter Zellen. Deshalb werden im Folgenden nur die Ergebnisse von Ansätzen mit ScÜ 1:8 und ScÜ 1:32 betrachtet. Im LPS-stimulierten Kontrollansatz betrug die Proliferation 47,92 ± 8,13 % (B). Im Vergleich dazu kam es zu einer reduzierten TC-Proliferation, wenn ScÜ 1:8 verwendet wurde (30,76 ± 11,19 %). Dieser Effekt ist nicht signifikant, aber die Betrachtung der Einzelfälle zeigt immer eine Abnahme der Proliferation (C). Unter Hinzufügen von ScÜ 1:32 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (51,87 ± 6,70 %).

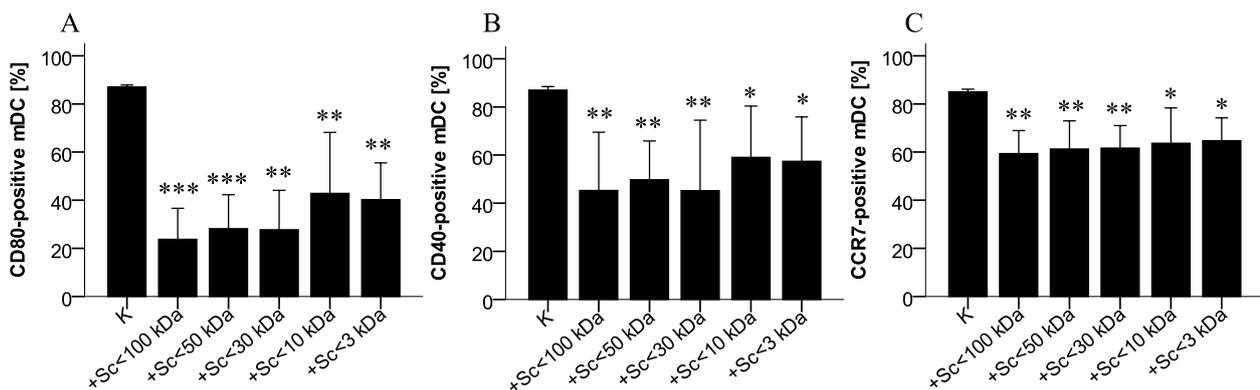


**Abbildung 14: Einfluss von ScÜ auf die TC-Proliferation in der Kokultur.** mDC inkubierten 3 h mit LPS und ScÜ bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vor. Anschließend wurden nTC zugegeben und für fünf Tage kokultiviert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil toter Zellen (A) und die TC-Proliferation (B). Als Proliferationskontrolle inkubierten TC mit SEB. Verglichen wurde die TC-Proliferation in Abhängigkeit von ScÜ. Repräsentative Darstellung des Einflusses von ScÜ 1:8 auf die TC-Proliferation (C). KK: Kokultur aus TC und mDC. (n=5).

### 4.2.3 Die aktiven Komponenten von *Sc* sind <3 kDa

Anknüpfend an den Nachweis eines immunmodulatorischen Effekts von *Sc* wurde angestrebt, das Molekulargewicht der aktiven Komponenten näher zu charakterisieren. Dazu wurden die Bestandteile von *Sc* mittels Membranpartitionschromatographie aufgetrennt. Zusammengefasst wurde *Sc* über Filter der Größe 100-3 kDa gegeben. Diejenigen Bestandteile, die kleiner als die jeweils eingesetzte Filtermembran waren, wurden als Filtrate bezeichnet (*Sc* <100-3 kDa) und in der Verdünnung 1:8 in der Zellkultur eingesetzt. Die entsprechenden Retentate wurden in der Zellkultur getestet und zeigten erwartungsgemäß keinen positiven Effekt (Daten nicht gezeigt).

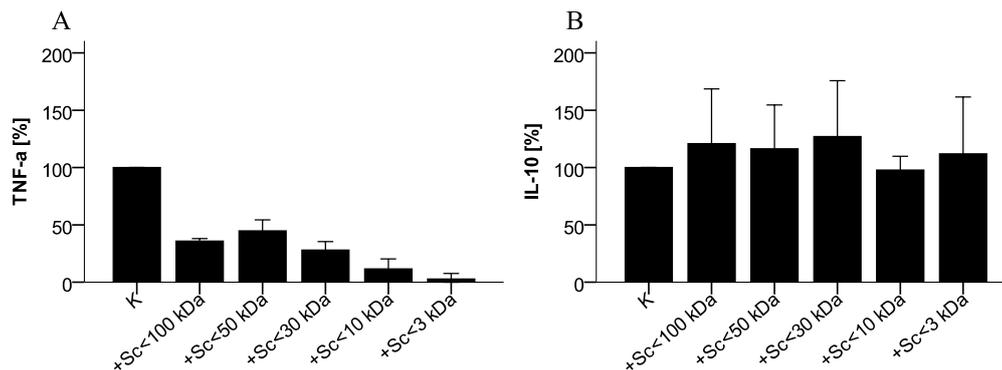
Die Abbildung 15 stellt die Effekte der Filtrate auf die Expression der Reifemarker dar. Der Anteil in Zellkultur gestorbener mDC betrug durchschnittlich 9,22 % (Ergebnisse nicht gezeigt). Auffallend ist, dass der Anteil CD80-positiver mDC (A) in allen Filtraten im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ( $87,06 \pm 0,80$  %) signifikant abnimmt (*Sc* <100 kDa:  $23,77 \pm 12,90$  %,  $p < .001$ ; *Sc* <50 kDa:  $28,19 \pm 14,10$  %,  $p < .001$ ; *Sc* <30 kDa:  $27,76 \pm 16,32$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <10 kDa:  $42,83 \pm 25,35$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <3 kDa:  $40,24 \pm 15,29$  %,  $p < .01$ ).



**Abbildung 15: Einfluss von *Sc* <100-3 kDa auf die Markerexpression.** *Sc* wurde mittels Membranpartitionschromatographie nach Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden Filtrate der Größe <100-3 kDa (*Sc* <100-3 kDa) hergestellt und zusammen mit LPS-stimulierten mDC für 21 h bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist der Anteil positiver mDC für CD80 (A), CD40 (B) und CCR7 (C). Folgende Ansätze wurden gemessen: K (mDC+LPS), *Sc* <100-3 kDa (mDC+LPS+*Sc* <100-3 kDa). Die Ansätze wurden mit der LPS-stimulierten Kontrolle verglichen. (n=4).  $p < .05 = *$ ,  $p < .01 = **$ ,  $p < .001 = ***$ .

In der LPS-stimulierten Kontrolle exprimierten  $86,99 \pm 1,45$  % der mDC den Reifemarker CD40 (B). Unter Verwendung der Filtrate nahm die Expression von CD40 signifikant ab (*Sc* <100 kDa:  $45,30 \pm 24,19$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <50 kDa:  $49,74 \pm 16,11$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <30 kDa:  $45,20 \pm 29,54$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <10 kDa:  $59,05 \pm 21,32$  % sowie *Sc* <3 kDa:  $57,41 \pm 18,47$  %, beide  $p < .05$ ). Der Migrationsmarker CCR7 wurde im Kontrollansatz von  $85,06 \pm 1,06$  % mDC exprimiert (C). In Analogie zu CD80 und CD40 führten die Filtrate von *Sc* zu einer signifikanten Reduktion der CCR7-Expression (*Sc* <100 kDa:  $59,34 \pm 9,55$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <50 kDa:  $61,26 \pm 11,72$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <30 kDa:  $61,64 \pm 9,39$  %,  $p < .01$ ; *Sc* <10 kDa:  $63,68 \pm 14,68$  %,  $p < .05$ ; *Sc* <3 kDa:  $64,72 \pm 9,47$  %,  $p < .05$ ). Zur Charakterisierung des Einflusses von *Sc* <100-3 kDa auf die Sekretion

pro- und antiinflammatorischer Zytokine wurden die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-10 in den Zellkulturüberständen gemessen und auf den Kontrollansatz normalisiert. In Abbildung 16 ist dargestellt, dass die Sekretion von TNF- $\alpha$  unter Verwendung der Filtrate abnahm ( $Sc < 100$  kDa:  $35,82 \pm 2,56$  %,  $Sc < 50$  kDa:  $44,79 \pm 9,56$  %,  $Sc < 30$  kDa:  $28,06 \pm 7,38$  %,  $Sc < 10$  kDa:  $11,60 \pm 8,66$  % und  $Sc < 3$  kDa:  $2,77 \pm 4,80$  %). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse, dass  $Sc < 100-3$  kDa die Sekretion von IL-10 tendenziell erhöhte (Abbildung 16 B,  $Sc < 100$  kDa:  $120,86 \pm 47,71$  %,  $Sc < 50$  kDa:  $116,37 \pm 38,18$  %,  $Sc < 30$  kDa:  $127,06 \pm 48,66$  %,  $Sc < 10$  kDa:  $97,81 \pm 12,02$  % und  $Sc < 3$  kDa:  $111,93 \pm 49,57$  %).

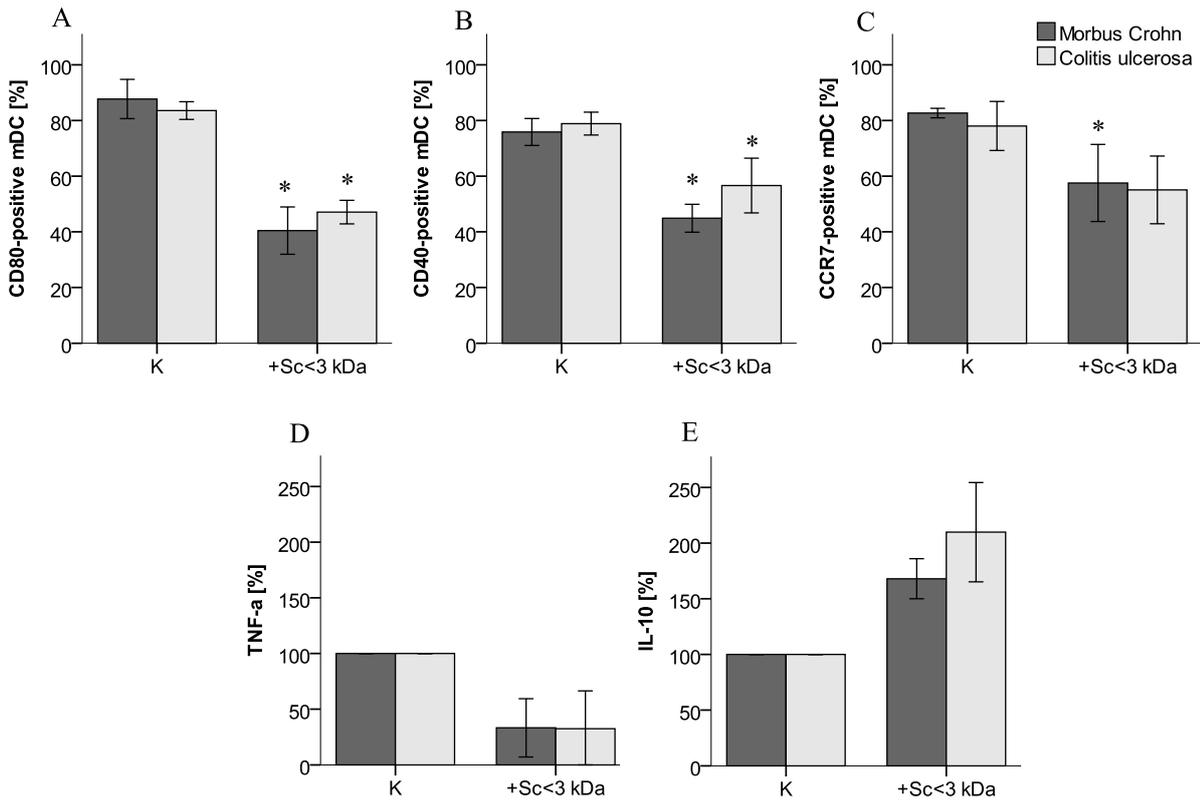


**Abbildung 16: Darstellung der Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 in Abhängigkeit von  $Sc < 100-3$  kDa.**  $Sc\ddot{U}$  wurde mittels Membranpartitionschromatographie nach molekularer Größe aufgetrennt. Die Filtrate ( $Sc < 100-3$  kDa) inkubierten zusammen mit LPS-stimulierten mDC für 21 h bei 37°C. Dargestellt ist die Sekretion von TNF- $\alpha$  (A) und IL-10 (B). Folgende Ansätze wurden gemessen: K (mDC+LPS),  $Sc < 100-3$  kDa (mDC+LPS+ $Sc < 100-3$  kDa). Es sind normalisierte Werte gezeigt. (n=4).

#### 4.2.4 Die phänotypische Reifung der mDC von CED-Patienten wird durch $Sc < 3$ kDa gehemmt

Die Verwendung probiotischer Hefe-Präparate beschränkt sich nicht nur auf die Therapie infektiöser Darmerkrankungen. Sowohl in der Monotherapie als auch in Kombination mit immunsuppressiven Medikamenten werden Probiotika zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt. Die vorangegangenen Versuche konnten zeigen, dass mDC gesunder Probanden durch  $Sc$  in ihrer Reifung gehemmt werden können. Parallel sollte mit weiterführenden Experimenten die Wirkung von  $Sc$  auf mDC von CED-Patienten untersucht werden.

In Abbildung 17 ist in Abhängigkeit von  $Sc < 3$  kDa der Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver mDC sowie die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 dargestellt. Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle nahm die Expression von CD80 und CD40 signifikant bei MC und CU ab (A,B). Bei beiden Erkrankungen nahm die CCR7-Expression unter Verwendung von  $Sc < 3$  kDa ab, die nur bei MC-Patienten signifikant war. Der Anteil der toten Zellen in der Zellkultur betrug  $5,29 \pm 2,78$  % und unterschied sich zwischen den Ansätzen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum normalisierten Kontrollansatz fiel die Sekretion von TNF- $\alpha$  unter Hinzufügen von  $Sc < 3$  kDa auf ein Drittel des Ausgangswertes bei beiden Erkrankungen. Interessanterweise stieg



**Abbildung 17: Darstellung des Effektes von Sc <3 kDa auf die Reifung der mDC von CED-Patienten.** Es sind die Expression von CD80, CD40 und CCR7 (A-C) und die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 (D+E) der mDC von CED-Patienten gezeigt. Der Kontrollansatz (K) bestand aus LPS-stimulierten mDC. In weiteren Ansätzen wurde Sc <3 kDa hinzupipettiert und 21 h bei 37 °C inkubiert. (MC: n=4). (CU: n=4). p <.05=\*, p <.01=\*\*, p <.001=\*\*\*.

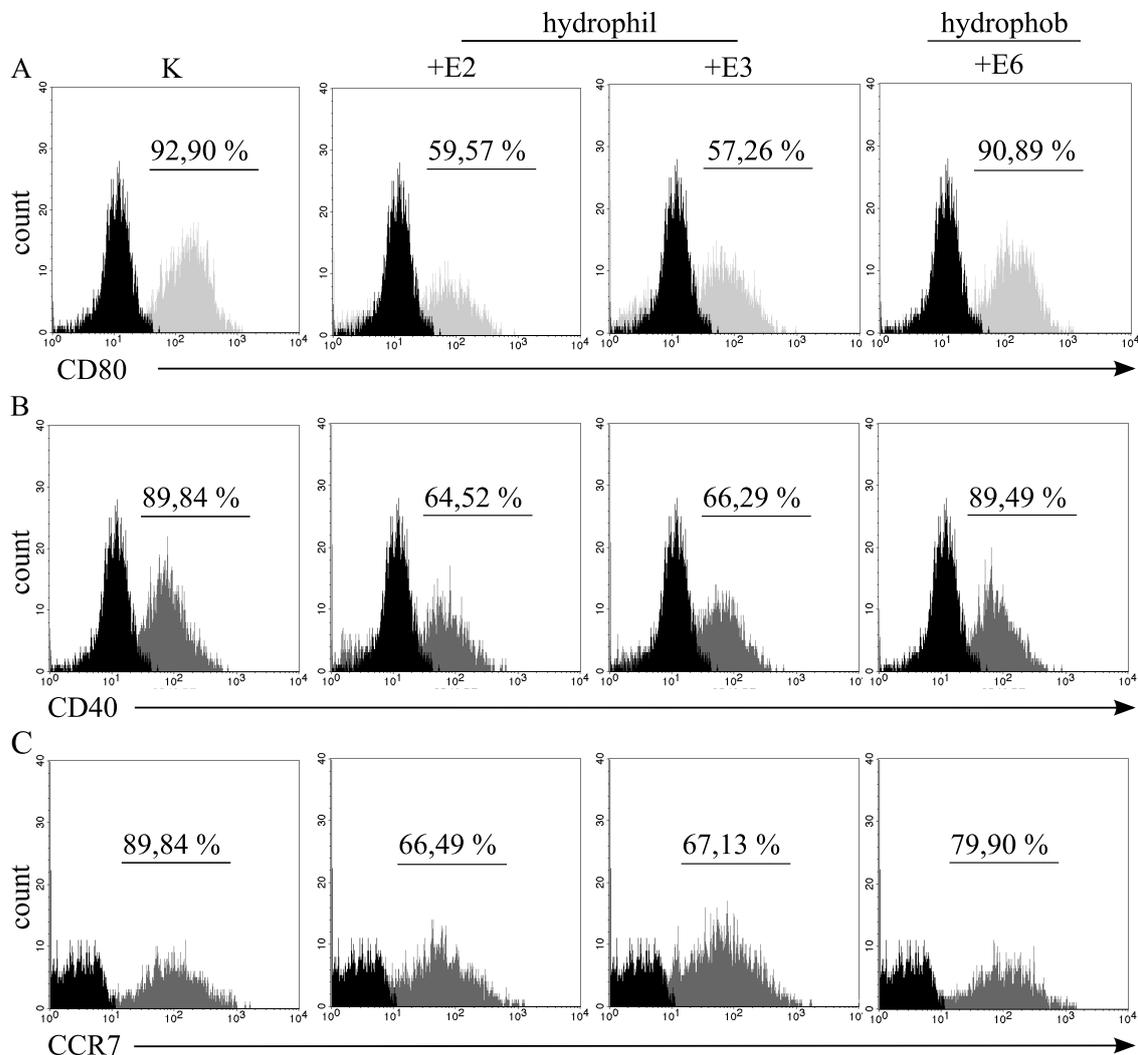
die Sekretion von IL-10 im Zellkulturüberstand beider Entitäten deutlich nach Zugabe von Sc <3 kDa und nahm annähernd den doppelten Wert an.

#### 4.2.5 Hydrophile Komponenten entfalten die hemmende Wirkung auf die mDC-Reifung

Nachdem die molekulare Größe der aktiven Komponenten von Sc eingegrenzt wurde, sollten im Anschluss die biochemischen Eigenschaften von Sc <3 kDa charakterisiert werden. Deshalb wurde mittels einer Elutionsreihe untersucht, ob es sich hierbei um hydrophile oder hydrophobe Komponenten handelt. Dazu wurde eine Strata<sup>®</sup> C18-Säule als Elutionssäule und Methanol mit stufenweise zunehmender Konzentration als Elutionsmittel verwendet, sodass die ersten Eluate hydrophile und die letzten hydrophobe Komponenten enthielten. Zuvor wurde die Säule mit Sc <3 kDa beladen. Durch die Verwendung von sechs Elutionsmitteln mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen konnten sechs Eluate (E1-E6) gewonnen werden.

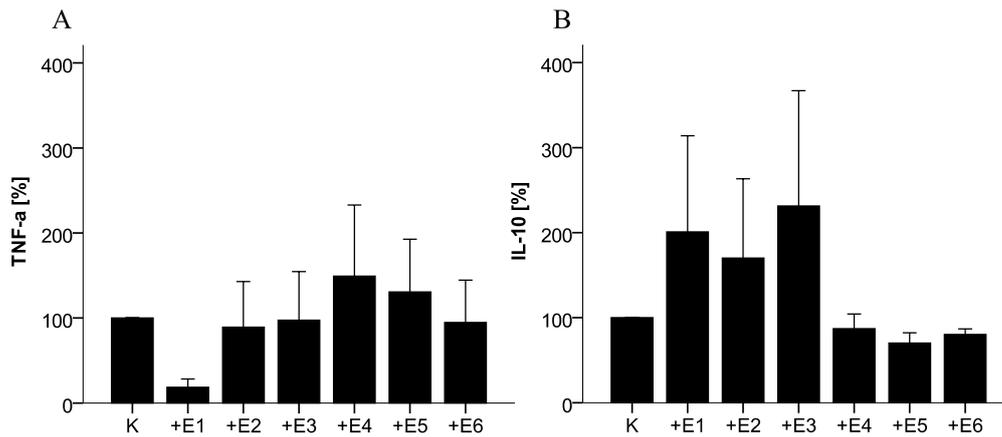
Repräsentative Histogramme zeigen den Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver mDC (Abbildung 18). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass der Anteil positiver mDC im Vergleich zum Kontrollansatz abnahm, wenn die Zellen mit den ersten drei Eluaten inkubiert wurden. Exemplarisch sind die Eluate E2 und E3 dargestellt, in denen hydrophile Komponenten gelöst

waren. Dies führte zu einer deutlich reduzierten Expression der Reife- und Migrationsmarker. Repräsentativ zeigt E6, das sich aus hydrophoben Komponenten zusammensetzte, im Vergleich zum Kontrollansatz keinen Unterschied. Der Anteil in Zellkultur beobachteter toter mDC unterschied sich zwischen den betrachteten Ansätzen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 18: Reife- und Migrationsmarkerexpression von mDC nach Kultur mit den Eluaten der Elutionsreihe von Sc.** ScÜ wurde mittels Membranpartitionschromatographie nach Molekulargewicht aufgetrennt, Sc <3 kDa auf eine Strata® C18-Säule gegeben und die Bestandteile unter zunehmender Methanolkonzentration eluiert. mDC wurden mit den Eluaten für 21 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Expression von CD80 (A), CD40 (B) und CCR7 (C) gemessen. Es sind repräsentative Histogramme dargestellt. Es wurden die folgenden Ansätze gemessen: K (mDC+LPS), +E2 (mDC+LPS+E2), +E3 (mDC+LPS+E3), +E6 (mDC+LPS+E6).

In Abbildung 19 sind die normalisierten Werte von TNF- $\alpha$  und IL-10 dargestellt (A,B). Im Vergleich zum Kontrollansatz betrug TNF- $\alpha$  im Ansatz mit E1  $18,59 \pm 9,63$  % und stieg im Ansatz, dem E2 hinzugefügt wurde auf  $89,18 \pm 53,74$  % an. Für die weiteren Eluate nahm TNF- $\alpha$  zu (E4:  $149,32 \pm 83,54$  %, E5:  $130,73 \pm 61,99$  %, E6:  $94,74 \pm 50,80$  %). Die Sekretion von IL-10 nahm unter Verwendung von E1, E2 sowie E3 im Vergleich zum Kontrollansatz zu (E1:  $200,92 \pm 113,13$  %, E2:  $170,15 \pm 93,29$  %, E3:  $231,44 \pm 135,50$  %). Die Sekretion von IL-10 nahm durch Hinzufügen der weiteren Eluate ab.



**Abbildung 19: Darstellung der Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 in Abhängigkeit von der Elutionsreihe von *Sc*.** Der Überstand von *Sc* wurde nach Molekulargewicht aufgetrennt, *Sc* <3 kDa auf eine Strata<sup>®</sup> C18-Säule geladen und die Bestandteile unter zunehmender Methanolkonzentration eluiert. Die Eluate inkubierten mit mDC für 21 h bei 37 °C. Dargestellt sind die normalisierten Werte der Zytokine TNF- $\alpha$  (A) und IL-10 (B). (n=4).

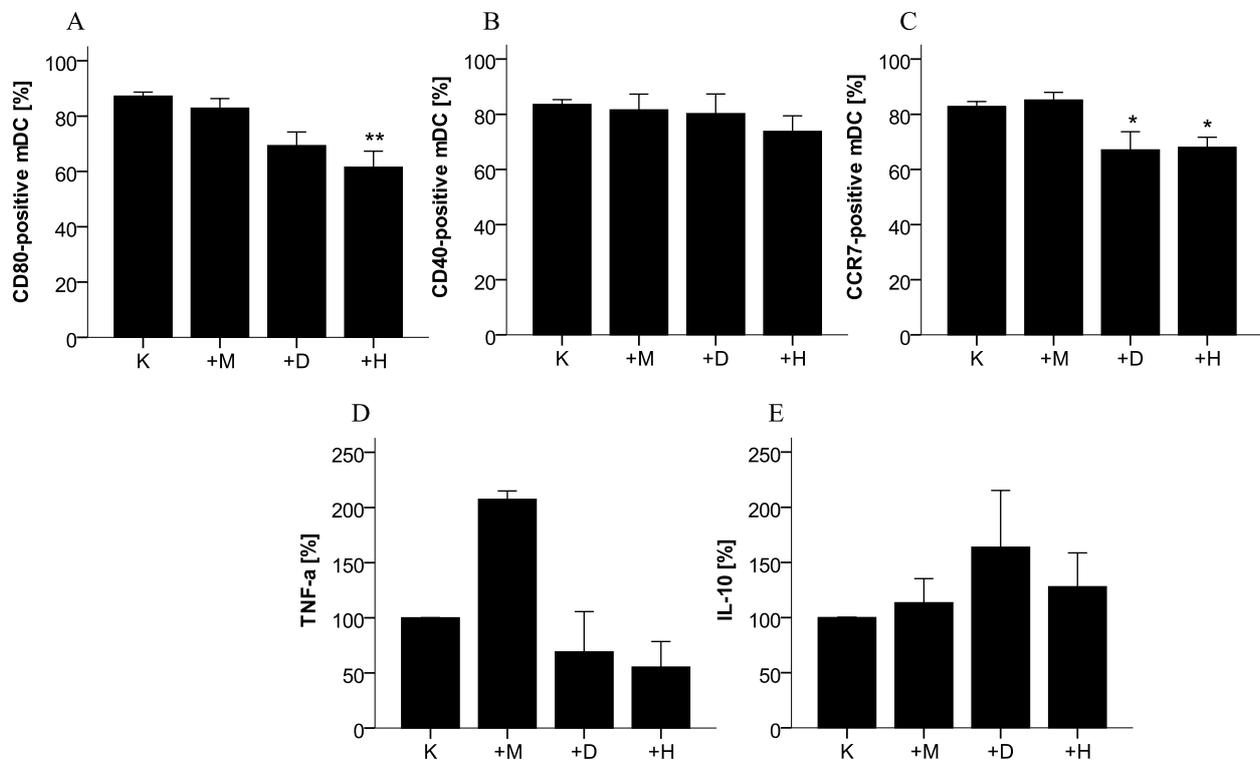
#### 4.2.6 Ein $\beta$ -Glukanase-Verdau hebt die hemmende Wirkung des hydrophilen Eluates nicht auf

Mittels Elution von *Sc* <3 kDa konnten die hydrophilen Eigenschaften der aktiven Komponenten nachgewiesen werden. Im Stoffwechsel der Hefen entstehen im Rahmen der kontinuierlichen Umstrukturierung der Zellwand zahlreiche Glykokonjugate. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Glukanverbindungen, welche den größten Anteil der Zellwandbestandteile einnehmen, die gesuchten Komponenten sein könnten. Deshalb wurde ein  $\beta$ -Glukanase-Verdau durchgeführt, durch den die Glykokonjugate enzymatisch verdaut werden sollten.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zum  $\beta$ -Glukanase-Verdau dargestellt. Das hydrophile Eluat wurde für 24 h enzymatisch hydrolysiert und anschließend mit mDC für 21 h inkubiert (+D). Es wurden zwei Kontrollansätze mitgeführt. Der erste Kontrollansatz bestand aus dem ersten Eluat ohne Enzymzusatz und sollte die Hitzestabilität (+H) der hydrophilen Komponenten prüfen. Der zweite Kontrollansatz setzte sich aus  $\beta$ -Glukanase und Kulturmedium (+M) zusammen und sollte direkte Effekte des Enzyms oder dessen Denaturierungsprodukte ausschließen. Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ( $87,23 \pm 1,43$  %) nahm der Anteil CD80-positiver mDC (A) unter Zugabe von D sowie H ab (+D:  $69,32 \pm 4,92$  %, +H:  $61,51 \pm 5,80$  %,  $p < .01$ ). Der Ansatz, in dem LPS-stimulierte mDC mit M inkubierten, zeigte keinen Unterschied in der CD80-Expression im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle. Die Untersuchung des Anteils CD40-positiver mDC (B) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ansätzen. Dahingegen konnte für den Anteil CCR7-positiver mDC (C) ein signifikanter Unterschied zwischen der LPS-stimulierten Kontrolle ( $82,79 \pm 1,84$  %) und dem Ansatz mit D (+D:  $67,08 \pm 6,6$  %,  $p < .05$ ) sowie dem Ansatz H (+H:  $67 \pm 3,68$  %,  $p < .05$ ) nachgewiesen werden.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zur Sekretion von TNF- $\alpha$  (D) und IL-10 (E) der jeweiligen Zellkultur-Überstände gezeigt. Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle führte die Verwen-

derung von M annähernd zu einer Verdopplung von TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand (+M: 207,34  $\pm$  7,66 %). Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle nahm TNF- $\alpha$  nach Kultur mit D und H tendenziell ab (+D: 69,02  $\pm$  36,60 %, +H: 55,30  $\pm$  23,21 %). Demgegenüber nahm IL-10 nach Inkubation mit D und H zu (+D: 163,73  $\pm$  51,46 %, +H: 127,99  $\pm$  30,60 %).



**Abbildung 20: Markerexpression und Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-10 in der Versuchsreihe zum  $\beta$ -Glukanaseverdau.** Das erste Eluat wurde 24 h mit einer  $\beta$ -Glukanase verdaut. Die untersuchten Ansätze bestanden aus einer LPS-stimulierten Kontrolle (K) und Ansätzen, denen das mit einer  $\beta$ -Glukanase verdaute erste Eluat (+D), das hitzebehandelte erste Eluat (+H) sowie die  $\beta$ -Glukanase mit Kulturmedium (+M) hinzugefügt wurde. Die Ansätze inkubierten 21 h mit mDC bei 37°C. Dargestellt sind die Expression von CD80 (A), CD40 (B), CCR7 (C) sowie die Sekretion von TNF- $\alpha$  (D) und IL-10 (E). (n=5). p <.05=\*, p <.01=\*\*, p <.001=\*\*\*.

### 4.3 Hefe-Überstand definierter Zellzahl

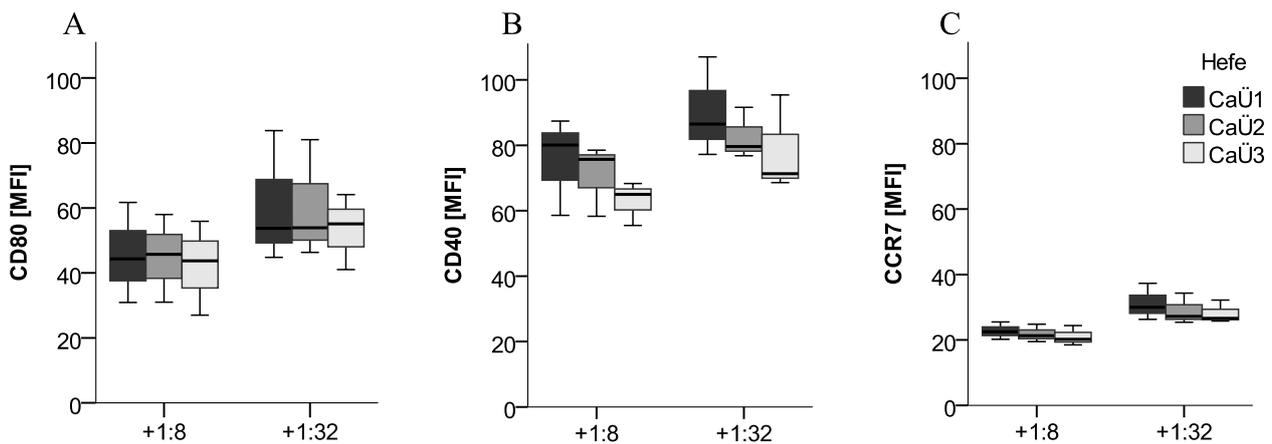
Die drei Hefen *Sc*, *Sb* sowie *Ca* wurden in YPD bis zu einer definierten Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  in YPD-Flüssignährmedium angezogen. Die daraus hergestellten Hefe-Überstände wurden in Zellkultorexperimenten eingesetzt.

#### 4.3.1 Biologische Replikate zeigen reproduzierbare Effekte

Der mikrobiologische Kontrollstamm *Candida albicans* ATCC 2091 wurde wie *Sc* und *Sb* als biologisches Replikat in drei unterschiedlichen Kulturen in YPD angezogen. Danach wurden die Hefen mit RPMI gewaschen und 24 h in RPMI bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden steril filtriert, um die Hefezellen aus den Überständen zu entfernen. Die Abbildung 21 zeigt die gemess-

senen Marker der mDC nach 21 h Kultur mit *Ca*Ü.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche mit den biologischen Replikaten zeigten zwischen den untersuchten probiotischen und humanpathogenen Hefen keine Unterschiede in Bezug auf die Reproduzierbarkeit. Aus diesem Grund werden nur die Ergebnisse zu *Ca* gezeigt (Abbildung 21). Da der Anteil in Zellkultur gestorbener mDC unter Hinzufügen Hefe-Überstand in der Verdünnung 1:2 deutlich anstieg (s.h. Abb. 22), sind nur die Ergebnisse zu *Ca*Ü 1:8 sowie *Ca*Ü 1:32 dargestellt. Die der Hefen-Anzucht zu Grunde gelegte Methode erzeugte somit reproduzierbare Effekte der Hefe-Überstände auf die phänotypische Reifung von mDC.

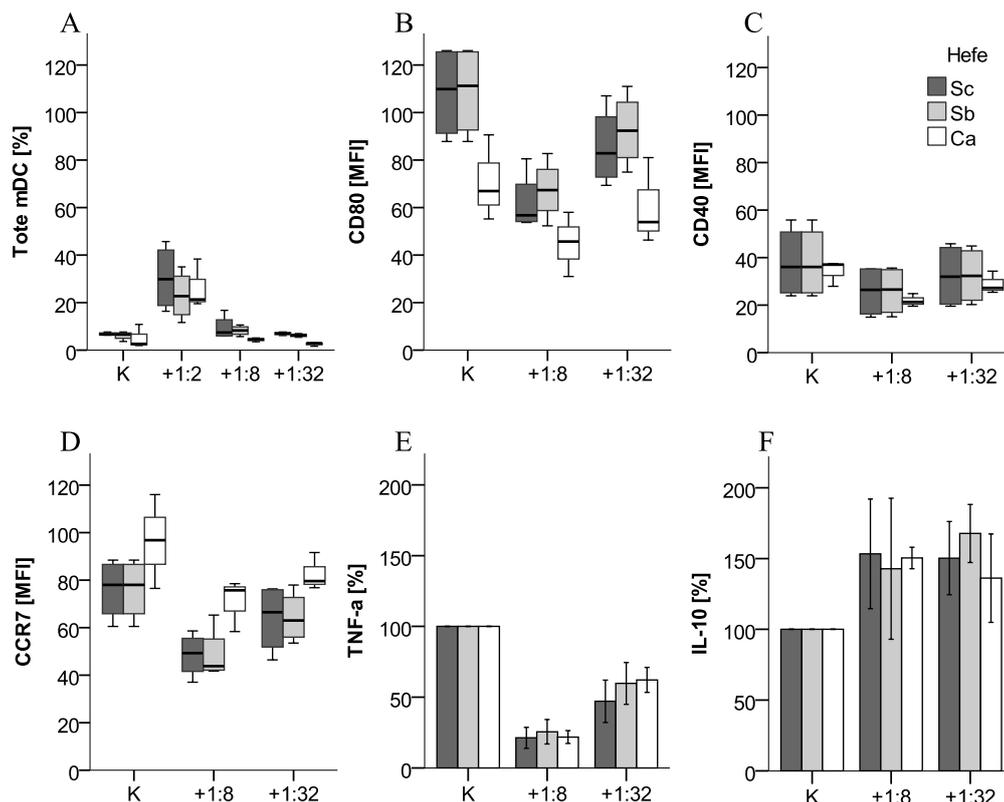


**Abbildung 21: Darstellung reproduzierbarer Effekte von *Ca*Ü1, *Ca*Ü2 und *Ca*Ü3 auf die Markerexpression von mDC.** *Ca*Ü1-3 wurde jeweils bis zu einer definierten Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  in YPD angezogen, steril filtriert und in den entsprechenden Verdünnungen mit LPS-stimulierten mDC in Kultur gegeben. Die Marker der mDC wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD80 (A), CD40 (B) und CCR7 (C) gefärbt. (*Ca*Ü1: n=3, *Ca*Ü2: n=3, *Ca*Ü3: n=3).

#### 4.3.2 Die Überstände probiotischer und humanpathogener Hefen entfalten vergleichbare immunmodulatorische Effekte

Um die Effekte probiotischer und humanpathogener Hefen auf die Reife- und Migrationsmarkerexpression sowie Zytokinsekretion von mDC zu vergleichen, wurden *Sc*, *Sb* und *Ca* in YPD bis zu einer zuvor definierten Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  angezogen. Die steril filtrierten Hefe-Überstände wurden in den Verdünnungen 1:2, 1:8 und 1:32 in der Zellkultur eingesetzt.

Die Effekte von *Sc*Ü, *Sb*Ü sowie *Ca*Ü auf die Expression von CD80, CD40 sowie CCR7 und auf die Sekretion von  $\text{TNF-}\alpha$  sowie IL-10 sind in Abbildung 22 dargestellt. Der Anteil toter mDC unterschied sich innerhalb der Kontrollansätze nicht und betrug  $6,03 \pm 2,53 \%$  (A). Es ist zu erkennen, dass der Anteil toter mDC mit steigender Konzentration der verwendeten Hefe-Überstände zunahm (*Sc*Ü 1:2:  $30,43 \pm 13,94 \%$ , *Sb*Ü 1:8:  $23,00 \pm 10,24 \%$  sowie *Ca*Ü 1:32:  $26,37 \pm 10,37 \%$ ). In Übereinstimmung mit dem konventionellen Hefe-Überstand weist dies auf einen toxischen Effekt durch die Verdünnung 1:2 hin. Deshalb werden die weiteren Ergebnisse zur Verdünnung 1:2 nicht beschrieben. Dahingegen unterschied sich der Anteil toter mDC zwischen der



**Abbildung 22: Darstellung des Effektes von ScÜ, SbÜ sowie CaÜ auf die Markerexpression und Zytokinsekretion von mDC.** mDC inkubierten 21 h mit steril filtrierten Überständen von Sc, Sb sowie Ca bei 37°C. Dargestellt ist der Anteil toter mDC (A). Die Marker CD80 (B), CD40 (C) und CCR7 (D) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Zellkultur-Überstände wurden abgenommen und die Zytokinsekretion von TNF- $\alpha$  (E) und IL-10 (F) mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die folgenden Ansätze: K (mDC+LPS), +1:2 (mDC+LPS+Hefe 1:2), +1:8 (mDC+LPS+Hefe 1:8) sowie +1:32 (mDC+LPS+Hefe 1:32). (Ca: n=3, Sc: n=4, Sb: n=4).

LPS-stimulierten Kontrolle und den Hefe-Überständen in der Verdünnung 1:8 sowie 1:32 nicht.

Die Daten zur Expression der Reife- und Migrationsmarker in Abhängigkeit von den Hefe-Überständen wurden anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) ermittelt. In der Versuchsreihe zu Sc nahm die Expression von CD80 (B) durch Verwendung von ScÜ 1:8 ( $61,93 \pm 12,60$ ) sowie ScÜ 1:32 ( $85,48 \pm 16,57$ ) im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ab ( $108,38 \pm 19,98$ ). Eine Abnahme der Expression von CD80 war durch Hinzufügen von SbÜ 1:8 ( $67,40 \pm 12,53$ ) sowie SbÜ 1:32 ( $92,65 \pm 15,35$ ) im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle zu beobachten ( $109,05 \pm 19,40$ ). Im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ( $70,90 \pm 18,04$ ) führte unerwarteterweise der Überstand von Ca zu einer reduzierten CD80-Expression (CaÜ 1:8:  $44,90 \pm 13,52$ , CaÜ 1:32:  $60,40 \pm 18,24$ ). Die CD40-Expression unterschied sich unter Verwendung von ScÜ 1:8, ScÜ 1:32, SbÜ 1:8 sowie SbÜ 1:32 nicht von der LPS-stimulierten Kontrolle. Dahingegen nahm die Expression von CD40 durch Hinzufügen von CaÜ 1:8 ( $21,87 \pm 2,70$ ) im Vergleich zu den LPS-stimulierten mDC ab ( $34,10 \pm 5,37$ ). Dieser Effekt wurde durch Verwendung von CaÜ 1:32 nicht entfaltet ( $28,97 \pm 4,71$ ). Im Vergleich zum Kontrollansatz ( $76,23 \pm 12,84$ ) reduzierte ScÜ die CCR7-Expression (ScÜ 1:8:  $48,53 \pm 9,22$ , ScÜ 1:32:  $63,90 \pm 14,61$ ). Die CCR7-Expression betrug in der LPS-stimulierten Kontrolle ( $75,23 \pm 12,84$ ) und nahm un-

ter Verwendung von *Sb*Ü ab (*Sb*Ü 1:8:  $48,65 \pm 11,19$ , *Sb*Ü 1:32:  $64,35 \pm 10,73$ ). Die CCR7-Expression wurde unter Verwendung von *Ca*Ü 1:8 ( $70,83 \pm 10,94$ ) sowie *Ca*Ü 1:32 ( $82,67 \pm 7,86$ ) im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle abgeschwächt ( $96,43 \pm 19,75$ ). Darüber hinaus sank im Vergleich zum normalisierten Kontrollansatz die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Hinzufügen der Hefe-Überstände in der Verdünnung 1:8 deutlich ab (*Sc*Ü:  $21,28 \pm 7,40$  %, *Sb*Ü:  $25,55 \pm 8,69$  %, *Ca*Ü:  $21,81 \pm 4,56$  %). Dieser Effekt war durch Verwendung der Verdünnung 1:32 geringer ausgeprägt (*Sc*Ü:  $47,10 \pm 14,96$  %, *Sb*Ü:  $59,72 \pm 14,77$  %, *Ca*Ü:  $62,16 \pm 8,85$  %). Ein gegensätzliches Verhalten zeigten die Ergebnisse zur Sekretion von IL-10. Entsprechend führten die Hefe-Überstände der Verdünnung 1:8 sowie 1:32 zu einer Zunahme von IL-10 (*Sc*Ü 1:8:  $153,32 \pm 38,76$  %, *Sc*Ü 1:32:  $150,29 \pm 25,88$  %, *Sb*Ü 1:8:  $142,77 \pm 49,82$  %, *Sb*Ü 1:32:  $167,72 \pm 20,50$  %, *Ca*Ü 1:8:  $150,43 \pm 7,61$  %, *Ca*Ü 1:32:  $136,15 \pm 31,25$  %).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der immunmodulatorische Effekt von *Sc* und *Sb* durch die Anzucht in YPD erhalten bleibt. Darüber hinaus war die antiinflammatorische Wirkung der Hefe-Überstände reproduzierbar. Außerdem konnte ein Vergleich zwischen den probiotischen Hefen *Sc* sowie *Sb* und der humanpathogenen Hefe *Ca* hergestellt werden, der einen unerwarteten anti-entzündlichen Effekt von steril filtriertem *Ca*Ü nachweisen konnte. Zusammenfassend wirkten die Hefen antiinflammatorisch durch eine attenuierte phänotypische Reifung sowie verminderte Sekretion von proinflammatorischem TNF- $\alpha$  und eine verstärkte Sekretion von antiinflammatorischem IL-10.

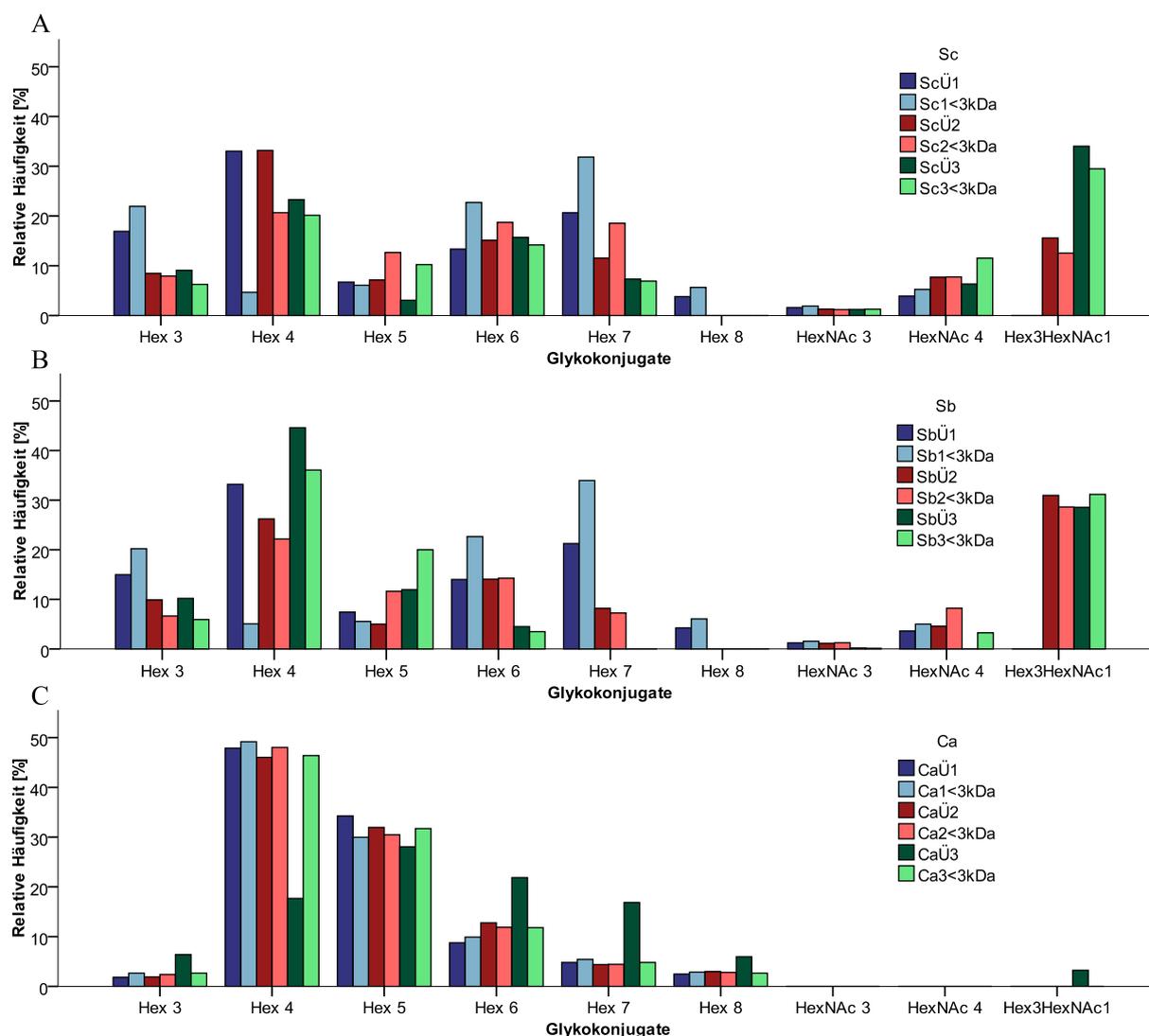
### 4.3.3 Die hefekonditionierten Medien sind reich an Glykokonjugaten

Im Anschluss an den Nachweis immunmodulatorisch aktiver hydrophiler Komponenten im konventionell hergestellten *Sc*Ü erfolgte eine Monosaccharidanalyse der hefekonditionierten Medien mit definierter Zellzahl. Dafür wurden *Ca*Ü, *Ca* <3 kDa, *Sc*Ü, *Sc* <3 kDa, *Sb*Ü sowie *Sb* <3 kDa in Kooperation mit der AG *Glycoproteomics* analysiert (AG Leitung: PhD Dr. D. Kolarich, Max-Planck-Institut Berlin).

**Tabelle 15:** Verteilung der Monosaccharide der unterschiedlichen hefekonditionierten Medien.

Medium	Glukose	Mannose	Xylose	Galaktose	HexNAc
<i>Ca</i> Ü	+	+	+	+	+
<i>Ca</i> <3 kDa	+	+	-	+	-
<i>Sc</i> Ü	+	+	-	-	+
<i>Sc</i> <3 kDa	+	+	-	-	+
<i>Sb</i> Ü	+	+	-	-	-
<i>Sb</i> <3 kDa	+	+	-	-	-

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Monosaccharidanalyse. Interessanterweise waren die Hexosen Glukose und Mannose sowohl in *Ca*Ü, *Sc*Ü und *Sb*Ü als auch in *Ca* <3 kDa, *Sc* <3 kDa und *Sb* <3 kDa detektierbar. Die Analyse von *Ca*Ü ergab zusätzlich den Nachweis von Xylose, Galaktose und N-Acetylhexosamin (HexNAc). Im Vergleich zu *Ca*Ü war die Zusammensetzung der Monosaccharide in *Sc*Ü und *Sb*Ü weniger vielfältig. So bestand *Sc*Ü zusätzlich nur HexNAc nachweisbar. In *Sb*Ü konnten HexNAc nicht nachgewiesen werden. In *Ca* <3 kDa konnte außerdem Galaktose gemessen werden. Interessanterweise konnten Xylose und Galaktose nur in den Medien von *Ca* beobachtet werden. In *Sc* <3 kDa waren außerdem HexNAc nachweisbar. Zur weiteren Charakterisierung des molekularen Aufbaus der Glykokonjugate wurden die biologischen Replikate der Hefemedien mittels Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) auf die relative Zusammensetzung der Oligosaccharide untersucht.



**Abbildung 23: Darstellung der relativen Häufigkeit von Glykokonjugaten in den verschiedenen Hefemedien.** Die relative Häufigkeit der Glykokonjugate der Hefemedien von *Sc* (A), *Sb* (B) und *Ca* (C) wurde mittels LC-ESI-MS/MS-Analyse untersucht. Dargestellt sind die Glykokonjugate: Hex 3-8, HexNAc3, HexNAc4 und Hex3HexNAc1 (Hexoseverbindungen bzw. N-Acetylhexosamin unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades).

In Abbildung 23 ist die relative Häufigkeit der Glykokonjugate abgebildet. Auffallend ist, dass sich die Verteilung der Glykokonjugate bei *Sc* und *Sb* ähnelt und *Ca* davon abweicht. So waren in den Hefemedien von *Ca* Hexoseverbindungen mit niedrigem Oligomerisierungsgrad stärker repräsentiert. Im Vergleich dazu war die Verteilung bei *Sc* und *Sb* heterogen. Dabei waren Glykokonjugate bestehend aus vier Hexosen in *Sc*Ü1-3 und *Sb*Ü1-3 häufiger als in den dazugehörigen Filtraten. In *Sc*1 <3 kDa und *Sb*1 <3 kDa waren relativ gesehen die Glykokonjugate aus sieben Hexoseeinheiten am häufigsten. Während in allen biologischen Replikaten von *Ca* Oktasaccharide detektierbar waren, konnten diese nur in den Überständen und Medien <3 kDa von *Sc*1 und *Sb*1 gefunden werden. Außerdem konnte mittels massenspektrometrischer Untersuchungen festgestellt werden, dass HexNAc3 und HexNAc4 in den Überständen und Filtraten von *Ca* nicht nachweisbar waren. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass im Gegensatz zu *Ca* HexNAc3 und HexNAc4 in den Medien von *Sc* und *Sb* messbar waren. Insbesondere häufig repräsentiert waren nur in den Medien von *Sc*2 und *Sc*3 sowie *Sb*2 und *Sb*3 Glykokonjugate aus drei Hexosen mit einem kovalent gebundenem N-Acetylhexosamin, dem sog. Hex3HexNAc1. Das Hex3HexNAc1 war bei *Ca* nur in *Ca*Ü3 messbar.

## 5 Diskussion

Tierexperimentelle Studien deuten auf eine zentrale Funktion der CD11c<sup>+</sup> DC in der Pathogenese von CED hin [89–94]. Im Vergleich zu mDC gesunder Probanden sind CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC bei Patienten mit CED durch eine gesteigerte proinflammatorische Immunantwort gegenüber LPS charakterisiert [34]. Dendritische Zellen können eine ungerichtete Abwehrreaktion gegenüber intestinalen Antigenen inhibieren und dadurch Toleranz erzeugen [95]. Bei CED ist diese Toleranz gestört [96] und die Aktivierung der erworbenen Immunantwort wesentlich an der Aufrechterhaltung der mukosalen Entzündung beteiligt [97]. Aus diesem Grund stellt die Modulation der Immunantwort von mDC gegenüber luminalen Antigenen einen interessanten Therapieansatz bei CED dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften der probiotischen Hefe *Sc* auf humane CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC näher charakterisiert. Dafür wurden  $\geq 95\%$  reine mDC mittels magnetischer Zellseparation aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. Nach Stimulation mit LPS inkubierten die mDC mit steril filtrierten Überständen von *Sc*. Es konnte eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der verwendeten Verdünnung und der Expression der Reifemarker CD80 und CD40 sowie des Migrationsmarkers CCR7 nachgewiesen werden. Der inhibitorische Effekt auf die Expression dieser Marker war unter Hinzufügen von *Sc* 1:8 optimal (Abb. 12). Im Vergleich zu den anderen Verdünnungen induzierte *Sc* 1:2 einen signifikant höheren Anteil in Zellkultur gestorbener mDC, sodass diese Verdünnung als zytotoxisch bewertet wurde. Um die entzündungshemmende Aktivität von *Sc* auf der Ebene der Zytokine zu untersuchen, wurde mittels *CBA* die Menge der in Zellkultur freigesetzten Zytokine TNF- $\alpha$  sowie IL-10 gemessen. Dabei reduzierte *Sc* 1:8 freigesetztes TNF- $\alpha$  und führte gleichzeitig zu einer vermehrten Freisetzung von IL-10 (Abb. 13). Diese Beobachtungen werden durch Arbeiten zur taxonomisch verwandten Hefe *Sb* unterstützt. So führte steril filtriertes *Sb* 1:8 zu einem signifikant niedrigeren Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC, reduzierte die Menge von freigesetzten TNF- $\alpha$  und führte zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-10 [84]. Dies gestattet die Schlussfolgerung, dass die steril filtrierten Überstände der taxonomisch verwandten Probiotika *Sc* und *Sb* vergleichbare antiinflammatorische Eigenschaften entfalten. Einen anderen Blickwinkel auf die entzündungshemmende Wirkung probiotischer Hefen geben die Ergebnisse weiterer Studien, die allerdings nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden können, da die untersuchten Zellen entweder direkt mit den Probiotika inkubierten oder ein ultrazentrifugierter Überstand eingesetzt wurde. So reduzierte *Sb* in tierexperimentellen Kolitis-Modellen signifikant die mukosale Entzündung, die Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe und unterdrückte die TNF- $\alpha$  vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [98, 99]. Auch bakterielle Probiotika zeigten einen entzündungshemmenden Effekt. Durch die Inkubation von DC mit probiotischen Bakterien und Hefen konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Produktion von IL-10 festgestellt werden [65]. Eine weitere Studie wies den

modulierenden Effekt eines ultrafiltrierten Überstandes bakterieller Probiotika auf die Reifung und Zytokinproduktion von DC nach [100]. Das Dogma, dass die Gegenwart eines lebenden probiotischen Organismus zur Entfaltung gesundheitsfördernder Effekte notwendig sei [50], kann somit darum ergänzt werden, dass auch der steril filtrierte Überstand eines Probiotikums positive Effekte entfalten kann. Tatsächlich unterschied sich die Zytokinsekretion und Reifemarkereexpression von DC nach Inkubation mit entweder lebenden, hitzedenaturierten oder UV-behandelten *Sb* nicht [101].

*Sc*Ü 1:8 inhibierte die Proliferation CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiver TC in der allogenen gemischten Lymphozytenreaktion mit mDC (Abb. 14). In Übereinstimmung zu den vorangegangenen Experimenten entfaltete *Sc*Ü 1:2 im Vergleich zu den anderen Verdünnungen einen toxischen Effekt. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass *Sc*Ü 1:8 auch die erworbene Immunantwort attenuieren kann. Letztere ist wesentlich bei CED für den Gewebeschaden im Rahmen von Entzündungsprozessen verantwortlich [97]. Die antilymphoproliferativen Eigenschaften von *Sc*Ü werden durch Experimente zu steril filtriertem *Sb*Ü unterstützt. So führte *Sb*Ü 1:8 in der gemischten Lymphozytenreaktion aus mDC und TC zu einer verminderten TC-Proliferation [84]. Diese proliferationshemmende Wirkung probiotischer Hefen konnte auch für bakterielle Probiotika nachgewiesen werden. Die Inkubation von DC mit VSL #3<sup>®</sup> führte zu einer signifikant geringeren TC-Proliferation im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle [102].

Von besonderem Interesse war die Bestimmung des Molekulargewichts der entzündungshemmenden Komponenten. Zur Charakterisierung desselben wurde eine stufenweise Membranpartitionschromatographie durchgeführt, mithilfe derer auch eine Separation in Retentate und Filtrate möglich war [103]. Im Vergleich zum LPS-stimulierten Kontrollansatz nahm der Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver mDC unter Hinzufügen aller Filtrate signifikant ab (Abb. 15). Auffallend war die reduzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion durch die verwendeten *Sc* Filtrate (Abb. 16). Die Daten zur IL-10-Sekretion zeigten im Vergleich zum LPS-stimulierten Kontrollansatz durch Verwendung der Filtrate in der Tendenz eine leicht zunehmende IL-10-Sekretion. Die in allen Filtraten nachgewiesene antiinflammatorische Eigenschaft erlaubt die Schlussfolgerung, dass das Molekulargewicht der entzündungshemmenden Komponenten <3 kDa ist. Entgegen der Vermutung ist anhand der Reife- und Migrationsmarkerexpression zu erkennen, dass durch die stufenweise Filtration scheinbar keine Aufkonzentration der aktiven Komponenten erzielt werden konnte. Dies könnte darin begründet sein, dass es im Rahmen der Filtration zu einer zunehmenden Kontamination an chaotropen Salzen kam, welche die Solvatisierung der im Hefemedium gelösten Komponenten gestört und zur Ausfällung geführt haben kann. Zur Entfernung dieser chaotropen Verbindungen wären zusätzliche Trennverfahren notwendig, die allerdings ebenfalls zu Problemen bei der Rekonstitution oder zu einem Verlust der Komponenten führen können [104]. Die Präzipitation der aktiven Komponenten im Hefemedium könnte damit eine Erklärung für die fehlende Aufkonzentration der immunmodulatorisch aktiven Komponenten sein. Der Nachweis löslicher Komponenten mit einem Molekulargewicht <3 kDa in der vorliegenden Arbeit wird durch vergleichbare Studien zu

*Sb* bestätigt. So führte die Stimulation von Monozyten sowie Epithelzellen aus dem Dickdarm mit LPS unter Hinzufügen von *Sb* <1 kDa zu einer abgeschwächten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und konsekutiv zu einer verminderten Sekretion von IL-8 [105]. Darüber hinaus führte die Inkubation LPS-stimulierter mDC mit *Sb* <3 kDa zu einem reduzierten Anteil CD80-, CD40- sowie CCR7-positiver mDC und es konnte eine Abnahme der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  sowie IL-6 und eine vermehrte Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden [84]. In einer vergleichbaren Arbeit wurde *Sb* <10 kDa *in vitro* sowie *in vivo* eingesetzt und führte zu einem modulierenden Effekt auf intrazelluläre Kinasen, die u.a. abhängig von LPS an der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine beteiligt waren [106].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *Sc* <3 kDa auf die Reife-, Migrationsmarker- sowie Zytokinproduktion von CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> mDC von CED-Patienten untersucht. Dabei war für beide Krankheitsentitäten unter Hinzufügen von *Sc* <3 kDa im Vergleich zum LPS-stimulierten Kontrollansatz ein signifikant verminderter Anteil CD80- und CD40-positiver mDC zu beobachten (Abb. 17). Eine signifikant reduzierte CCR7-Expression konnte nur von mDC, die aus peripherem Blut von MC-Patienten isoliert wurden, festgestellt werden. Außerdem nahm die Sekretion von proinflammatorischem TNF- $\alpha$  ab und von antiinflammatorischem IL-10 zu. Auffallend war in der vorliegenden Arbeit die im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöhte Sekretion von IL-10 in beiden Entitäten. Eine mögliche Erklärung wäre eine stärkere Reaktivität dieser mDC, die sich in einer im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Expression von Reifemarkern durch DC von CED-Patienten widerspiegelt [107–109]. In Übereinstimmung zu *Sc* <3 kDa führte *Sb* zu einem signifikant reduzierten Anteil CD80-, CD40- sowie CCR7-positiver mDC, reduzierte freigesetztes TNF- $\alpha$  und stimulierte antiinflammatorisches IL-10 [85]. Damit konnte nachgewiesen werden, dass *Sc* und *Sb* die Reifung der mDC von CED-Patienten hemmen können. Es gibt keine Evidenz für den Gebrauch probiotischer Hefe-Präparate in der Therapie von CED, da die Datenlage nicht einheitlich ist. In einer Studie zur Remissions-Erhaltungstherapie zeigten Patienten mit MC eine signifikant geringere Rückfallrate, die zusätzlich zu Mesalazin zweimal täglich 500 mg *Sb* verabreicht bekamen [61]. In einer weiteren nicht-kontrollierten Studie erhielten 25 Patienten mit CU mit mild bis moderaten Schüben zusätzlich zur Mesalazin Erhaltungstherapie dreimal täglich 250 mg *Sb* für einen Zeitraum von vier Wochen, wovon 17 Patienten eine endoskopische und klinische Remission zeigten [60]. Durch die Verabreichung von 3  $\times$  250 mg *Sb* täglich über 10 Wochen konnten in einer doppelt-blinden Pilot-Studie eine Verbesserung des Morbus Crohn Aktivitäts Index (engl. *Crohn's Disease Activity Index*, CDAI) und eine Abnahme der Peristaltik im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt werden [110]. In einer prospektiven doppelblinden, placebokontrollierten, randomisierten Multi-Center-Studie unterschied sich der prozentuale Anteil von Patienten in Remission nicht, die zusätzlich entweder *Sb* oder einen Placebo bekamen [111]. Dennoch haben probiotische Präparate in der Behandlung von CED eine besondere Bedeutung erlangt [112]. Im Gegensatz zur immunsuppressiven Therapie zeichnen sich Probiotika durch seltener schwerwiegende Nebenwirkungen, eine sicherere Therapie und eine größere Therapieadhärenz der Patienten

aus. Die genaue Aufklärung des immunregulatorischen Wirkmechanismus könnte für die Therapie von CED in Zukunft von Bedeutung sein [113].

Anknüpfend an die Bestimmung des Molekulargewichts wurden die chemischen Eigenschaften der antiinflammatorischen Moleküle näher charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde *Sc* <3 kDa auf eine Strata<sup>®</sup> C18-Säule geladen. Durch steigende Methanolkonzentration in den verwendeten Elutionsmitteln wurden die in *Sc* <3 kDa enthaltenen Komponenten in hydrophile und hydrophobe Fraktionen aufgetrennt. Die Stimulation aktivierter mDC mit den ersten drei Eluat zeigt eine reduzierte Expression von CD80, CD40 sowie CCR7 (Abb. 18). Die ersten drei Eluate führten ebenfalls tendenziell zu einer vermehrten Sekretion von IL-10, allerdings wurde die Sekretion von TNF- $\alpha$  nur durch das erste Eluat inhibiert (Abb. 19). Dies deutet auf eine entzündungshemmende Aktivität der hydrophilen Komponenten von *Sc* hin. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch den Nachweis antiinflammatorischer hydrophiler Glykokonjugate in *Sb* <10 kDa, welche in humanen Monozyten die NF $\kappa$ B-vermittelte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 inhibierten [105]. Einen anderen Blickwinkel geben die Ergebnisse von Studien zur tierexperimentellen Kolitis, welche antiinflammatorische Effekte von Oligosacchariden nachwies. Die Verwendung prebiotischer Lactulose sowie hydrophiler Lactulose-Oligosaccharide, die mittels  $\beta$ -Galactosidase-Verdau aus Lactulose hergestellt wurden, schwächte die Entzündungsreaktion einer chemischen Kolitis in Ratten ab, was anhand einer abnehmenden Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, -6, -12 und 23 sowie einer wiederhergestellten epithelialen Zellintegrität festzustellen war [114]. In einem murinen Modell zur chemischen Kolitis attenuierte das prebiotische Präparat *GFO* (engl. *glutamine, dietary fibers and oligosaccharides*, Glutamin, Ballaststoffe und Lactosucrose) im Vergleich zur Gruppe, welche mit 20 % Glukoselösung behandelt wurde, signifikant den Gewichtsverlust sowie den Krankheitsaktivitätsindex und reduzierte die mRNA-Produktion von proinflammatorischem IL-1 $\beta$  [115]. Obwohl darauf verwiesen werden muss, dass sich jeder Bestandteile von *GFO* positiv auf das Dickdarmepithel bzw. auf das intestinale Mikrobiom auswirkt [116], sind die positiven Eigenschaften prebiotischer Lactosucrose hervorzuheben. So führte die zweiwöchige Einnahme von Lactosucrose zu einer Zunahme probiotischer Bifidobakterien und zu einer Reduktion von *Bacteroidaceae* im Darm von CED-Patienten [117].

Der Nachweis einer entzündungshemmenden Aktivität hydrophiler Moleküle in den Hefe-Medien von *Sc* führte zur Annahme, dass sich die Moleküle von Stoffwechselmetaboliten, die auch Zellwandbestandteile sein könnten, der Hefen herleiten. Im Zuge des Hefe-Wachstums findet ein kontinuierlicher Umstrukturierungsprozess durch enzymatischen Auf- und Abbau der Zellwand statt (Abb. 4). Die Hauptbestandteile der Zellwand bestehen aus Glukan- und Mannankonjugaten [75]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die entzündungshemmende Aktivität des ersten Eluats durch Glukankomponenten entfaltet wird und durch enzymatischen Verdau zerstört werden kann. Zu diesem Zweck wurde das erste Eluat mittels thermostabiler  $\beta$ -Glukanase verdaut. Im Gegensatz zu unserer Annahme wirkte das enzymatisch verdaute erste Eluat weiterhin entzündungshemmend, da der Anteil CD80-, CD40- und CCR7-positiver mDC gleich blieb und die Sekretion von

TNF- $\alpha$  weiter niedrig und von IL-10 erhöht war (Abb. 20). Es wurde eine  $\beta$ -Glukanase mit  $\beta$ -Glukosidase Aktivität verwendet sowie ein 24-stündiger Verdau durchgeführt, sodass dies nicht als Erklärung für eine fortbestehende Aktivität des verdauten ersten Eluats herangezogen werden kann. Die Stimulation aktivierter mDC mit hitzebehandeltem ersten Eluat zeigte, dass auch höhere Temperaturen die entzündungshemmende Wirkung der hydrophilen Komponenten nicht zerstören. Dies weist daraufhin, dass die Komponenten charakterisiert sind durch eine Stabilität gegenüber Temperaturen um den Siedepunkt. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch den Nachweis der Stabilität antiinflammatorischer Komponenten in *Sb* <10 kDa, die 5 min bei 100°C inkubierten und anschließend in Epithelzellen des Dickdarms weiterhin NF- $\kappa$ B inhibierten, das an der Genregulation proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist [105]. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der Stabilität des Prebiotikums Xylooligosaccharid [118], welches bei Temperaturen um 100°C nicht denaturierte [119]. In der Zusammenschau konnte der enzymatische Verdau mit einer  $\beta$ -Glukanase die aktiven Komponenten nicht zerstören, dies steht aber nicht im Widerspruch zur Annahme, dass die Effekte möglicherweise durch lösliche Glukankomponenten vermittelt werden. So konnten die Komponenten von *Sb* mit einem Molekulargewicht von <1 kDa einen antiinflammatorischen Effekt entfalten [105], was die immunmodulatorische Kapazität von Komponenten mit einem niedrigen Molekulargewicht unterstreicht. Zusätzlich konnte als Voraussetzung für die hydrolytische Aktivität einer  $\beta$ -Glukanase eine minimale Kettenlänge von vier Glukoseeinheiten nachgewiesen werden [120]. Dies weist daraufhin, dass ein enzymatischer Verdau der aktiven Komponenten aufgrund ihrer niedrigen Kettenlänge möglicherweise nicht stattfand.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die humanpathogene Hefe *Ca* keine vergleichbaren entzündungshemmenden Eigenschaften wie *Sc* und *Sb* entfaltet. Um mögliche Effekte auf die phänotypische Reifung der mDC vergleichbar zu machen, wurden diese drei Hefen bis zu einer zuvor definierten Zellzahl, die derjenigen des konventionellen *Sc* entspricht (s.h. Formel 1), in YPD kultiviert. Nach Anzucht bis zur Zellzahl von  $4.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  wurden die Hefen abzentrifugiert, gewaschen und steril filtrierte hefekonditionierte Medien erstellt. Entgegen der zuvor aufgestellten Hypothese, zeigten die hefekonditionierten Medien von *Ca* zu *Sc* sowie *Sb* vergleichbare antiinflammatorische Eigenschaften, welche zudem reproduzierbar waren (Abb. 21). *Ca* attenuierte die Expression von CD80, CD40, CCR7 sowie die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und bewirkte eine vermehrte Sekretion von IL-10 (Abb. 22). *Ca* entfaltete damit in Einklang zu *Sc* sowie *Sb* *in vitro* durch eine Hemmung der phänotypischen Reifung von mDC eine entzündungshemmende Aktivität. Im Gegensatz hierzu führte die direkte Stimulation von DC mit *Ca* zu einer erhöhten Expression der Reifemarker CD80 sowie CD86 [121]. Dies steht nicht im Widerspruch zu den hier vorgelegten Ergebnissen, da diese Studie eine direkte Stimulation der DC mit *Ca* durchführte [121]. In Übereinstimmung dazu muss hervorgehoben werden, dass auch eine direkte Stimulation von DC mit *Sb* zu einer gesteigerten Expression von Reifemarkern und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führte [101]. Zusammenfassend ist für alle drei Hefen in Übereinstimmung zum konventionellen Hefe-Überstand die Verdünnung 1:8 als optimal in Be-

zug auf die Immunmodulation zu interpretieren, da die Verdünnung 1:2 von *Sc*Ü, *Sb*Ü sowie *Ca*Ü einen toxischen Effekt auf die mDC entfaltete. Interessanterweise sind für *Ca* lokal immunmodulatorische Aktivitäten beschrieben, so wurden DC mit *Ca*-Hyphen inkubiert und es resultierte eine abgeschwächte Sekretion von TNF- $\alpha$  und eine vermehrte Freisetzung von IL-10 [122]. Dies deutet daraufhin, dass *Ca* als kommensale humanpathogene Hefe die lokale Immunantwort durch humorale Faktoren inhibieren kann.

Mittels einer im Anschluss durchgeführten Monosaccharid- und Glykokonjugatanalyse wurden die gelösten Komponenten in den Überständen und Filtraten <3 kDa näher charakterisiert. Diese Ergebnisse zeigten eine unterschiedliche Zusammensetzung der Monosaccharide in den untersuchten Hefemedien (Tab. 15). Dabei steht der Nachweis von Monosacchariden aus N-Acetylhexosamin (HexNAc) in *Ca*Ü nicht im Widerspruch zum überwiegenden Fehlen von HexNAc-Oligosacchariden (Abb. 23). Als Begründung kann die Erklärung herangezogen werden, dass HexNAc in *Ca*Ü überwiegend als Monosaccharid vorlag. Eine Diskrepanz liegt in dem Nachweis von HexNAc-Oligosacchariden in den Überständen und Filtraten von *Sc* sowie *Sb* und dem alleinigen Nachweis von HexNAc-Monosacchariden in den Medien von *Sc*. Für Monosaccharide sind unterschiedliche Stabilitäten während der Säurehydrolyse abhängig von der verwendeten Säure beschrieben. Dennoch sind die untersuchten Monosaccharide unter Anwendung einer Hydrolyse mit 4 M TFA relativ stabil [123], sodass eine mögliche Zerstörung der HexNAc durch die in dieser Arbeit verwendete 4 M TFA nicht als Grund für das Fehlen von HexNAc in *Sb* herangezogen werden kann. Eine mögliche Erklärung bleibt die unterschiedliche Suszeptibilität der nicht näher definierten Hexosen im HexNAc gegenüber einer Säurehydrolyse [123]. Als methodische Schwäche wäre auch eine Unterschätzung des Vorhandenseins dieser Komponenten während der Monosaccharidanalyse, wie sie für N-Acetylgalaktosamin-Komponenten diskutiert wurde [124], eine weitere Erklärung für das Fehlen von HexNAc in den Medien von *Sb*. Ein weiterer Unterschied war, dass die Hexose Galaktose und die Pentose Xylose nur in den Medien von *Ca* nachweisbar waren. In Heteropolymeren sind Galaktose und Xylose Bestandteile von Seitenketten [125, 126]. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von Xylose in den Medien von *Sc* und *Sb* ist, dass diese Hefen Xylose nicht verwerten können [127]. Nichtsdestotrotz ergab die Monosaccharidanalyse, dass insbesondere die Hexosen Glukose und Mannose sowohl in den Überständen als auch in den Filtraten <3 kDa von *Sc*, *Sb* sowie *Ca* vertreten war (Tab. 15), was daraufhin weist, dass diese Hexosen einen zentralen Baustein des Grundgerüsts der immunmodulatorisch aktiven Glykokonjugate sein könnten. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung dadurch, dass Hefen durch Zellwandabbau Glykokonjugate bereitstellen, die sie beispielsweise unter bestimmten Umweltbedingungen zur Energiegewinnung oder zum strukturellen Umbau der Zellwand nutzen können [128]. Die Hauptbestandteile der Hefe-Zellwand sind Polysaccharide wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukan, Mannan, Chitin oder Glykoproteine (Abb. 4). Allerdings konnte nur eine Komponente mit identischem oder ähnlichem Grundgerüst für die vergleichbare entzündungshemmende Aktivität der Hefen ursächlich sein. Dies weist daraufhin, dass das Grundgerüst der entzündungshemmenden Komponente

aus den ubiquitär vorhandenen Hexosen Glukose oder Mannose bestehen könnte. Innerhalb der Glukane können  $\alpha$ -Glukane vernachlässigt werden, da *Ca* im Gegensatz zu *Sc* keine  $\alpha$ -Glukane besitzt [81], sodass diese als mögliche immunmodulatorische Komponenten entfallen. Tatsächlich konnte in einem tierexperimentellen Kolitis-Modell die antiinflammatorische Aktivität von Hefe-Zellwandextrakten auf die intestinale Entzündung demonstriert werden, dabei wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt, dass in der *Sc*-Fraktion Mannoproteine und  $\beta$ -Glukane vorhanden waren, wohingegen die *Ca*-Fraktion nur  $\beta$ -Glukane enthielt und das  $\beta$ -Glukan von *Ca* entfaltet die stärkste entzündungshemmende Aktivität [129]. Damit untermauern diese Ergebnisse einerseits die in der vorliegenden Arbeit gezeigte antiinflammatorische Aktivität von *Ca* und andererseits die Hypothese, dass  $\beta$ -Glukane, bestehend aus einem Grundgerüst aus Glukose, für die antiinflammatorische Aktivität in Frage kommen würden. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse einer Studie, welche die Wirkung eines  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-Glukans von *Ca* untersuchten und eine reduzierte Expression des Reifemarkers CD80 und eine erhöhte Sekretion von IL-10 feststellten [130]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete unerwartete entzündungshemmende Aktivität von Molekülen des *Ca*Ü auf LPS-stimulierte mDC wird durch diese Daten gestützt und gestattet die Schlussfolgerung, dass *Ca* mittels dieser Mechanismen die angeborene und erworbene Immunantwort abschwächt und auf diese Weise seinen Status als saprophytische Hefe ermöglicht [131].

Die medizinische Relevanz der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass eine Modulation des intestinalen Mikrobioms ein interessanter Ansatz in der Therapie von CED ist [114] und durch pro- oder prebiotische Präparate erreicht werden kann. Durch die nähere Charakterisierung dieser prebiotischen Komponenten könnte in Zukunft gezielt ein Präparat für Patienten mit CED synthetisiert werden. Durch den Einsatz prebiotischer Präparate könnten auch die unerwünschten Nebenwirkungen der probiotischen Präparate, wie Flatulenz, lokalisierte oder generalisierte Überempfindlichkeitsreaktionen, Luftnot oder Schock beseitigt werden, sodass daraus eine stärkere Adhärenz der Patienten resultiert. Darüber hinaus könnte das Präparat auch Patienten mit einem geschwächten Immunsystem verschrieben werden.

## 6 Literatur

- [1] A. Iwasaki und R. Medzhitov. „Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.“ In: *Nat Immunol* 5.10 (2004), S. 987–995.
- [2] F. Bäckhed, C. M. Fraser, Y. Ringel, M. E. Sanders, R. B. Sartor, P. M. Sherman, J. Versalovic, V. Young und B. B. Finlay. „Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications.“ In: *Cell Host Microbe* 12.5 (2012), S. 611–622.
- [3] P. Langerhans. „Über die Nerven der menschlichen Haut“. In: *Virchows Archiv* 44.2 (1868), S. 325–337.
- [4] R. M. Steinman und Z. A. Cohn. „Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution“. In: *The Journal of experimental medicine* 137.5 (1973), S. 1142–1162.
- [5] W. C. Van Voorhis, L. S. Hair, R. M. Steinman und G. Kaplan. „Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood“. In: *The Journal of experimental medicine* 155.4 (1982), S. 1172–1187.
- [6] A. Schlitzer und F. Ginhoux. „Organization of the mouse and human DC network.“ In: *Curr Opin Immunol* 26 (2014), S. 90–99.
- [7] B. Beutler, K. Hoebe, X. Du und R. Ulevitch. „How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers“. In: *Journal of leukocyte biology* 74.4 (2003), S. 479–485.
- [8] S. Saijo und Y. Iwakura. „Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi.“ In: *Int Immunol* 23.8 (2011), S. 467–472.
- [9] M. Haniffa u. a. „Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells.“ In: *Immunity* 37.1 (2012), S. 60–73.
- [10] S. L. Jongbloed, A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C.-J. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, A. J. E. Vulink, D. N. J. Hart und K. J. Radford. „Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.“ In: *J Exp Med* 207.6 (2010), S. 1247–1260.
- [11] D. Piccioli, S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sarmiceli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli und A. Wack. „Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets.“ In: *Blood* 109.12 (2007), S. 5371–5379.
- [12] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck und J. Schmitz. „BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.“ In: *J Immunol* 165.11 (2000), S. 6037–6046.

- 
- [13] A. P. Liao, M. Salajegheh, C. Morehouse, R. Nazareno, R. G. Jubin, B. Jallal, Y. Yao und S. A. Greenberg. „Human plasmacytoid dendritic cell accumulation amplifies their type 1 interferon production“. In: *Clinical Immunology* 136.1 (2010), S. 130–138.
- [14] K. Liu und M. C. Nussenzweig. „Development and homeostasis of dendritic cells.“ In: *Eur J Immunol* 40.8 (2010), S. 2099–2102.
- [15] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran und K. Palucka. „Immunobiology of dendritic cells.“ In: *Annu Rev Immunol* 18 (2000), S. 767–811.
- [16] K. Shortman und Y.-J. Liu. „Mouse and human dendritic cell subtypes.“ In: *Nat Rev Immunol* 2.3 (2002), S. 151–161.
- [17] A. T. Satpathy, X. Wu, J. C. Albring und K. M. Murphy. „Re(de)fining the dendritic cell lineage.“ In: *Nat Immunol* 13.12 (2012), S. 1145–1154.
- [18] N. V. Serbina, T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel und E. G. Pamer. „TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection.“ In: *Immunity* 19.1 (2003), S. 59–70.
- [19] K. P. MacDonald, D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz und D. N. Hart. „Characterization of human blood dendritic cell subsets“. In: *Blood* 100.13 (2002), S. 4512–4520.
- [20] C. Janeway Jr. „Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.“ In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1 (1989), S. 1–13.
- [21] R. M. Steinman. „Decisions about dendritic cells: past, present, and future.“ In: *Annu Rev Immunol* 30 (2012), S. 1–22.
- [22] L. Ramachandra, D. Simmons und C. V. Harding. „MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes.“ In: *Curr Opin Immunol* 21.1 (2009), S. 98–104.
- [23] R. Förster, A. C. Davalos-Misslitz und A. Rot. „CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance.“ In: *Nat Rev Immunol* 8.5 (2008), S. 362–371.
- [24] M. C. Dieu, B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Aït-Yahia, F. Brière, A. Zlotnik, S. Lebecque und C. Caux. „Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.“ In: *J Exp Med* 188.2 (1998), S. 373–386.
- [25] S. Sozzani, P. Allavena, G. D’Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi und A. Mantovani. „Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties.“ In: *J Immunol* 161.3 (1998), S. 1083–1086.

- [26] S. Yanagihara, E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai und Y. Yamaguchi. „EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation.“ In: *J Immunol* 161.6 (1998), S. 3096–3102.
- [27] J. Banchereau, F. Bazan, D. Blanchard, F. Brière, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset und S. Saeland. „The CD40 antigen and its ligand.“ In: *Annu Rev Immunol* 12 (1994), S. 881–922.
- [28] D. Y. Ma und E. A. Clark. „The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.“ In: *Semin Immunol* 21.5 (2009), S. 265–272.
- [29] P. Middel, D. Raddatz, B. Gunawan, F. Haller und H.-J. Radzun. „Increased number of mature dendritic cells in Crohn’s disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism.“ In: *Gut* 55.2 (2006), S. 220–227.
- [30] M. F. Bachmann, M. Kopf und B. J. Marsland. „Chemokines: more than just road signs.“ In: *Nat Rev Immunol* 6.2 (2006), S. 159–164.
- [31] E. S. Trombetta und I. Mellman. „Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo.“ In: *Annu Rev Immunol* 23 (2005), S. 975–1028.
- [32] M. Frentsch, O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold und A. Thiel. „Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.“ In: *Nat Med* 11.10 (2005), S. 1118–1124.
- [33] P. M. Gayed. „Toward a Modern Synthesis of Immunity: Charles A. Janeway Jr. and the Immunologists Dirty Little Secret“. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 84.2 (2011), S. 131.
- [34] D. C. Baumgart, S. Thomas, I. Przesdzing, D. Metzke, C. Bielecki, S. M. Lehmann, S. Lehnardt, Y. Dörffel, A. Sturm, A. Scheffold, J. Schmitz und A. Radbruch. „Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease.“ In: *Clin Exp Immunol* 157.3 (2009), S. 423–436.
- [35] A. Iwasaki und B. L. Kelsall. „Freshly isolated Peyer’s patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells.“ In: *J Exp Med* 190.2 (1999), S. 229–239.
- [36] S. C. Ng, J. L. Benjamin, N. E. McCarthy, C. R. H. Hedin, A. Koutsoumpas, S. Plamondon, C. L. Price, A. L. Hart, M. A. Kamm, A. Forbes, S. C. Knight, J. O. Lindsay, K. Whelan und A. J. Stagg. „Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn’s disease.“ In: *Inflamm Bowel Dis* 17.10 (2011), S. 2027–2037.

- [37] H. Murakami, S. M. F. Akbar, H. Matsui, N. Horiike und M. Onji. „Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis.“ In: *Clin Exp Immunol* 128.3 (2002), S. 504–510.
- [38] J. Parkin und B. Cohen. „An overview of the immune system.“ In: *Lancet* 357.9270 (2001), S. 1777–1789.
- [39] T. T. Macdonald und G. Monteleone. „Immunity, inflammation, and allergy in the gut.“ In: *Science* 307.5717 (2005), S. 1920–1925.
- [40] F. Guarner und J.-R. Malagelada. „Gut flora in health and disease.“ In: *Lancet* 361.9356 (2003), S. 512–519.
- [41] T. D. Leser und L. Mølbaek. „Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host.“ In: *Environ Microbiol* 11.9 (2009), S. 2194–2206.
- [42] J. H. Niess, S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman und H.-C. Reinecker. „CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance.“ In: *Science* 307.5707 (2005), S. 254–258.
- [43] A. M. C. Faria und H. L. Weiner. „Oral tolerance.“ In: *Immunol Rev* 206 (2005), S. 232–259.
- [44] M. Rimoldi, M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena und M. Rescigno. „Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells.“ In: *Nat Immunol* 6.5 (2005), S. 507–514.
- [45] V. Robles Alonso und F. Guarner. „Linking the gut microbiota to human health“. In: *British Journal of Nutrition* 109.S2 (2013), S21–S26.
- [46] L. V. McFarland. „Emerging therapies for *Clostridium difficile* infections.“ In: *Expert Opin Emerg Drugs* 16.3 (2011), S. 425–439.
- [47] J. Landy, H. Al-Hassi, S. McLaughlin, A. Walker, P. Ciclitira, R. Nicholls, S. Clark und A. Hart. „Review article: faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease“. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 34.4 (2011), S. 409–415.
- [48] D. C. Baumgart, Hrsg. *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach*. Springer US, 2012.
- [49] F. Guarner. „What is the role of the enteric commensal flora in IBD?“ In: *Inflammatory bowel diseases* 14.S2 (2008), S83–S84.
- [50] R. Fuller. „Probiotics in human medicine.“ In: *Gut* 32.4 (1991), S. 439–442.

- [51] M. Roberfroid, G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl u. a. „Prebiotic effects: metabolic and health benefits“. In: *British Journal of Nutrition* 104.S2 (2010), S1–S63.
- [52] R. K. Mortimer. „Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome.“ In: *Genome Res* 10.4 (2000), S. 403–409.
- [53] C. P. Kurtzman und C. J. Robnett. „Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses.“ In: *FEMS Yeast Res* 3.4 (2003), S. 417–432.
- [54] D. A. MacKenzie, M. Defernez, W. B. Dunn, M. Brown, L. J. Fuller, S. R. M. S. de Herrera, A. Günther, S. A. James, J. Eagles, M. Philo, R. Goodacre und I. N. Roberts. „Relatedness of medically important strains of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by phylogenetics and metabolomics.“ In: *Yeast* 25.7 (2008), S. 501–512.
- [55] L. C. Edwards-Ingram, M. E. Gent, D. C. Hoyle, A. Hayes, L. I. Stateva und S. G. Oliver. „Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex.“ In: *Genome Res* 14.6 (2004), S. 1043–1051.
- [56] J. L. R. Fietto, R. S. Araújo, F. N. Valadão, L. G. Fietto, R. L. Brandão, M. J. Neves, F. C. O. Gomes, J. R. Nicoli und I. M. Castro. „Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*.“ In: *Can J Microbiol* 50.8 (2004), S. 615–621.
- [57] G. Mitterdorfer, H. K. Mayer, W. Kneifel und H. Viernstein. „Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques.“ In: *J Appl Microbiol* 93.4 (2002), S. 521–530.
- [58] M. Elie und P. Chalmers Mitchell. „The prolongation of life: optimistic studies“. In: *GP Putnam’s sons, New York and London* (1908).
- [59] A. C. Ouwehand, S. Salminen und E. Isolauri. „Probiotics: an overview of beneficial effects.“ In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 82.1-4 (2002), S. 279–289.
- [60] M. Guslandi, P. Giollo und P. A. Testoni. „A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis.“ In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15.6 (2003), S. 697–698.
- [61] M. Guslandi, G. Mezzi, M. Sorghi und P. A. Testoni. „*Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn’s disease.“ In: *Dig Dis Sci* 45.7 (2000), S. 1462–1464.
- [62] A. D. Butterworth, A. G. Thomas und A. K. Akobeng. „Probiotics for induction of remission in Crohn’s disease.“ In: *Cochrane Database Syst Rev* 3 (2008), S. CD006634.
- [63] K. Naidoo, M. Gordon, A. O. Fagbemi, A. G. Thomas und A. K. Akobeng. „Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis.“ In: *Cochrane Database Syst Rev* 12 (2011), S. CD007443.

- [64] I. Castagliuolo, J. T. LaMont, S. T. Nikulasson und C. Pothoulakis. „Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum.“ In: *Infect Immun* 64.12 (1996), S. 5225–5232.
- [65] M. Gad, P. Ravn, D. A. Søbørg, K. Lund-Jensen, A. C. Ouwehand und S. S. Jensen. „Regulation of the IL-10/IL-12 axis in human dendritic cells with probiotic bacteria.“ In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 63.1 (2011), S. 93–107.
- [66] S. Fujimori, K. Gudis, K. Mitsui, T. Seo, M. Yonezawa, S. Tanaka, A. Tatsuguchi und C. Sakamoto. „A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis.“ In: *Nutrition* 25.5 (2009), S. 520–525.
- [67] J. Y. Malgoire, S. Bertout, F. Renaud, J. M. Bastide und M. Mallié. „Typing of Saccharomyces cerevisiae clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism.“ In: *J Clin Microbiol* 43.3 (2005), S. 1133–1137.
- [68] A. J. Riquelme, M. A. Calvo, A. M. Guzmán, M. S. Depix, P. García, C. Pérez, M. Arrese und J. A. Labarca. „Saccharomyces cerevisiae fungemia after Saccharomyces boulardii treatment in immunocompromised patients.“ In: *J Clin Gastroenterol* 36.1 (2003), S. 41–43.
- [69] P. Muñoz, E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J. M. Eiros, M. J. Pérez, M. Sánchez-Somolinos, C. Rincón, J. Hortal und T. Peláez. „Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease.“ In: *Clin Infect Dis* 40.11 (2005), S. 1625–1634.
- [70] C. Hennequin, C. Kauffmann-Lacroix, A. Jobert, J. P. Viard, C. Ricour, J. L. Jacquemin und P. Berche. „Possible role of catheters in Saccharomyces boulardii fungemia.“ In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19.1 (2000), S. 16–20.
- [71] D. Botstein und G. R. Fink. „Yeast: an experimental organism for modern biology.“ In: *Science* 240.4858 (1988), S. 1439–1443.
- [72] L. Lehle, S. Strahl und W. Tanner. „Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases.“ In: *Angew Chem Int Ed Engl* 45.41 (2006), S. 6802–6818.
- [73] B. T. Stokke, A. Elgsaeter, C. Hara, S. Kitamura und K. Takeo. „Physicochemical properties of (1→6)-branched (1→3)-beta-D-glucans. 1. Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data.“ In: *Biopolymers* 33.4 (1993), S. 561–573.
- [74] D. L. Williams, R. B. McNamee, E. L. Jones, H. A. Pretus, H. E. Ensley, I. W. Browder und N. R. Di Luzio. „A method for the solubilization of a (1→3)-beta-D-glucan isolated from Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Carbohydr Res* 219 (1991), S. 203–213.
- [75] F. M. Klis, A. Boorsma und P. W. J. De Groot. „Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae.“ In: *Yeast* 23.3 (2006), S. 185–202.

- [76] R. Puccia, M. C. Vallejo, A. L. Matsuo und L. V. G. Longo. „The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host.“ In: *Front Microbiol* 2 (2011), S. 257.
- [77] P. Albuquerque und A. Casadevall. „Quorum sensing in fungi—a review.“ In: *Med Mycol* 50.4 (2012), S. 337–345.
- [78] F. L. Mayer, D. Wilson und B. Hube. „Candida albicans pathogenicity mechanisms“. In: *Virulence* 4.2 (2013), S. 119–128.
- [79] M. Nucci und E. Anaissie. „Revisiting the source of candidemia: skin or gut?“ In: *Clin Infect Dis* 33.12 (2001), S. 1959–1967.
- [80] M. Tokunaga, M. Kusamichi und H. Koike. „Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique.“ In: *J Electron Microsc (Tokyo)* 35.3 (1986), S. 237–246.
- [81] C. H. Grün, F. Hochstenbach, B. M. Humbel, A. J. Verkleij, J. H. Sietsma, F. M. Klis, J. P. Kamerling und J. F. G. Vliegthart. „The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast.“ In: *Glycobiology* 15.3 (2005), S. 245–257.
- [82] F. M. Klis, P. de Groot und K. Hellingwerf. „Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*.“ In: *Med Mycol* 39 Suppl 1 (2001), S. 1–8.
- [83] J. Ruiz-Herrera, M. V. Elorza, E. Valentín und R. Sentandreu. „Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity.“ In: *FEMS Yeast Res* 6.1 (2006), S. 14–29.
- [84] S. Thomas, I. Przesdzing, D. Metzke, J. Schmitz, A. Radbruch und D. C. Baumgart. „*Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation.“ In: *Clin Exp Immunol* 156.1 (2009), S. 78–87.
- [85] S. Thomas, D. Metzke, J. Schmitz, Y. Dörffel und D. C. Baumgart. „Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis.“ In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301.6 (2011), G1083–G1092.
- [86] P. Nissen, D. Nielsen und N. Arneborg. „Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism.“ In: *Yeast* 20.4 (2003), S. 331–341.
- [87] P. Sudbery, N. Gow und J. Berman. „The distinct morphogenic states of *Candida albicans*.“ In: *Trends Microbiol* 12.7 (2004), S. 317–324.
- [88] K. Alagesan, D. V. Silva, P. Seeberger und D. Kolarich. „A Novel, Ultrasensitive Approach for Quantitative Carbohydrate Composition and Linkage Analysis using LC-ESI Ion Trap Tandem Mass Spectrometry“. In: *Journal of Mass Spectrometry* (2015).

- [89] F. Leithäuser, Z. Trobonjaca, P. Möller und J. Reimann. „Clustering of colonic lamina propria CD4+ T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model“. In: *Laboratory investigation* 81.10 (2001), S. 1339–1349.
- [90] T. Krajina, F. Leithäuser, P. Möller, Z. Trobonjaca und J. Reimann. „Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis.“ In: *Eur J Immunol* 33.4 (2003), S. 1073–1083.
- [91] S. M. Cruickshank, N. R. English, P. J. Felsburg und S. R. Carding. „Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice.“ In: *World J Gastroenterol* 11.40 (2005), S. 6338–6347.
- [92] B. E. Berndt, M. Zhang, G.-H. Chen, G. B. Huffnagle und J. Y. Kao. „The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis“. In: *The Journal of Immunology* 179.9 (2007), S. 6255–6262.
- [93] A. E. Pedersen, M. Gad, N. Kristensen, C. Haase, C. Nielsen und M. Claesson. „Tolerogenic dendritic cells pulsed with enterobacterial extract suppress development of colitis in the severe combined immunodeficiency transfer model“. In: *Immunology* 121.4 (2007), S. 526–532.
- [94] J. E. Qualls, H. Tuna, A. M. Kaplan und D. A. Cohen. „Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells“. In: *Inflammatory bowel diseases* 15.2 (2009), S. 236–247.
- [95] T. Worbs, U. Bode, S. Yan, M. W. Hoffmann, G. Hintzen, G. Bernhardt, R. Förster und O. Pabst. „Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells“. In: *The Journal of experimental medicine* 203.3 (2006), S. 519–527.
- [96] W. Strober, I. Fuss und P. Mannon. „The fundamental basis of inflammatory bowel disease“. In: *The Journal of clinical investigation* 117.3 (2007), S. 514–521.
- [97] R. J. Xavier und D. K. Podolsky. „Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.“ In: *Nature* 448.7152 (2007), S. 427–434.
- [98] S. K. Lee, Y. W. Kim, S.-G. Chi, Y.-S. Joo und H. J. Kim. „The effect of *Saccharomyces boulardii* on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.“ In: *Dig Dis Sci* 54.2 (2009), S. 255–263.
- [99] S. K. Lee, H. J. Kim und S. G. Chi. „*Saccharomyces boulardii* reduced intestinal inflammation in mice model of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis: based on microarray.“ In: *Korean J Gastroenterol* 55.1 (2010), S. 33–45.

- [100] C. Hoarau, C. Lagaraine, L. Martin, F. Velge-Roussel und Y. Lebranchu. „Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway.“ In: *J Allergy Clin Immunol* 117.3 (2006), S. 696–702.
- [101] I. M. Smith, J. E. Christensen, N. Arneborg und L. Jespersen. „Yeast modulation of human dendritic cell cytokine secretion: an in vitro study.“ In: *PLoS One* 9.5 (2014), e96595.
- [102] A. L. Hart, K. Lammers, P. Brigidi, B. Vitali, F. Rizzello, P. Gionchetti, M. Campieri, M. A. Kamm, S. C. Knight und A. J. Stagg. „Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria.“ In: *Gut* 53.11 (2004), S. 1602–1609.
- [103] W. Blatt, B. Hudson, S. Robinson und E. Zipilivan. „Fractionation of protein solutions by membrane partition chromatography“. In: (1967).
- [104] J. Erde, R. R. O. Loo und J. A. Loo. „Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments“. In: *Journal of proteome research* 13.4 (2014), S. 1885–1895.
- [105] S. Sougioultzis, S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis und C. P. Kelly. „*Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 343.1 (2006), S. 69–76.
- [106] X. Chen, E. G. Kokkotou, N. Mustafa, K. R. Bhaskar, S. Sougioultzis, M. O’Brien, C. Pothoulakis und C. P. Kelly. „*Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis.“ In: *J Biol Chem* 281.34 (2006), S. 24449–24454.
- [107] S. Vuckovic, T. H. Florin, D. Khalil, M. F. Zhang, K. Patel, I. Hamilton und D. N. Hart. „CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases.“ In: *Am J Gastroenterol* 96.10 (2001), S. 2946–2956.
- [108] Y. Ikeda, F. Akbar, H. Matsui und M. Onji. „Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis.“ In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13.7 (2001), S. 841–850.
- [109] A. A. te Velde, Y. van Kooyk, H. Braat, D. W. Hommes, T. A. M. DelleMijn, J. F. M. Slors, S. J. H. van Deventer und F. A. Vyth-Dreese. „Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn’s disease.“ In: *Eur J Immunol* 33.1 (2003), S. 143–151.
- [110] K. Plein und J. Hotz. „Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn’s disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study.“ In: *Z Gastroenterol* 31.2 (1993), S. 129–134.

- [111] A. Bourreille, G. Cadiot, G. Le Dreau, D. Laharie, L. Beaugerie, J.-L. Dupas, P. Marteau, P. Rampal, D. Moyse, A. Saleh, M.-E. Le Guern, J.-P. Galmiche und F. Study Group. „Saccharomyces boulardii does not prevent relapse of Crohn’s disease.“ In: *Clin Gastroenterol Hepatol* 11.8 (2013), S. 982–987.
- [112] R. J. Farrell und J. T. LaMont. „Microbial factors in inflammatory bowel disease.“ In: *Gastroenterol Clin North Am* 31.1 (2002), S. 41–62.
- [113] C. Pothoulakis. „Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*“. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 30.8 (2009), S. 826–833.
- [114] F. Algieri, A. Rodríguez-Nogales, N. Garrido-Mesa, T. Vezza, J. Garrido-Mesa, M. P. Utrilla, A. Montilla, A. Cardelle-Cobas, A. Olano, N. Corzo, E. Guerra-Hernández, A. Zarzuelo, M. E. Rodriguez-Cabezas und J. Galvez. „Intestinal anti-inflammatory effects of oligosaccharides derived from lactulose in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis.“ In: *J Agric Food Chem* 62.19 (2014), S. 4285–4297.
- [115] E. Joo, S. Yamane, A. Hamasaki, N. Harada, T. Matsunaga, A. Muraoka, K. Suzuki, D. Nasteska, T. Fukushima, T. Hayashi, H. Tsuji, K. Shide, K. Tsuda und N. Inagaki. „Enteral supplement enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide attenuates experimental colitis in mice.“ In: *Nutrition* 29.3 (2013), S. 549–555.
- [116] A. Andoh und Y. Fujiyama. „Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease.“ In: *World J Gastroenterol* 12.28 (2006), S. 4452–4460.
- [117] F. Teramoto, K. Rokutan, Y. Kawakami, Y. Fujimura, J. Uchida, K. Oku, M. Oka und M. Yoneyama. „Effect of 4G-beta-D-galactosylsucrose (lactosucrose) on fecal microflora in patients with chronic inflammatory bowel disease.“ In: *J Gastroenterol* 31.1 (1996), S. 33–39.
- [118] D. Chapla, P. Pandit und A. Shah. „Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics.“ In: *Bioresour Technol* 115 (2012), S. 215–221.
- [119] M. Vazquez, J. Alonso, H. Dominguez und J. Parajo. „Xylooligosaccharides: manufacture and applications.“ In: *Trends in Food Science & Technology* 11.11 (2000), S. 387–393.
- [120] T. Fontaine, R. P. Hartland, M. Diaquin, C. Simenel und J. P. Latgé. „Differential patterns of activity displayed by two exo-beta-1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall.“ In: *J Bacteriol* 179.10 (1997), S. 3154–3163.
- [121] I. Fidan, A. Kalkanci, E. Yesilyurt und B. Erdal. „In vitro effects of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* on dendritic cells and the role of beta glucan in this effect.“ In: *Adv Clin Exp Med* 23.1 (2014), S. 17–24.

- [122] P. Bonifazi, T. Zelante, C. D'Angelo, A. De Luca, S. Moretti, S. Bozza, K. Perruccio, R. G. Iannitti, G. Giovannini, C. Volpi, F. Fallarino, P. Puccetti und L. Romani. „Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*.“ In: *Mucosal Immunol* 2.4 (2009), S. 362–374.
- [123] A. Manzi. „Acid hydrolysis for release of monosaccharides“. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN: 9780471142720.
- [124] C. Robbe, C. Capon, E. Maes, M. Rousset, A. Zweibaum, J.-P. Zanetta und J.-C. Michalski. „Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract.“ In: *J Biol Chem* 278.47 (2003), S. 46337–46348.
- [125] T. Sato, K. Iwabuchi, I. Nagaoka, Y. Adachi, N. Ohno, H. Tamura, K. Seyama, Y. Fukuchi, H. Nakayama, F. Yoshizaki, K. Takamori und H. Ogawa. „Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan.“ In: *J Leukoc Biol* 80.1 (2006), S. 204–211.
- [126] J.-P. Latgé. „Tasting the fungal cell wall.“ In: *Cell Microbiol* 12.7 (2010), S. 863–872.
- [127] T. Hasunuma, T. Sanda, R. Yamada, K. Yoshimura, J. Ishii und A. Kondo. „Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*.“ In: *Microb Cell Fact* 10.1 (2011), S. 2.
- [128] V. Farkas, K. Takeo, D. Maceková, M. Ohkusu, S. Yoshida und M. Sipiczki. „Secondary cell wall formation in *Cryptococcus neoformans* as a rescue mechanism against acid-induced autolysis.“ In: *FEMS Yeast Res* 9.2 (2009), S. 311–320.
- [129] S. Jawhara, K. Habib, F. Maggioro, G. Pignede, P. Vandekerckove, E. Maes, L. Dubuquoy, T. Fontaine, Y. Guerardel und D. Poulain. „Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions.“ In: *PLoS One* 7.7 (2012), e40648.
- [130] R. Nisini, A. Torosantucci, G. Romagnoli, P. Chiani, S. Donati, M. C. Gagliardi, R. Teloni, V. Sargentini, S. Mariotti, E. Iorio und A. Cassone. „beta-Glucan of *Candida albicans* cell wall causes the subversion of human monocyte differentiation into dendritic cells.“ In: *J Leukoc Biol* 82.5 (2007), S. 1136–1142.
- [131] L. Romani. „Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism.“ In: *J Leukoc Biol* 68.2 (2000), S. 175–179.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

### Eidesstattliche Versicherung

Ich, Peter Richard Steinhagen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung des immunmodulatorischen Einflusses probiotischer und humanpathogener Hefen auf dendritische Zellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe Uniform Requirements for Manuscripts (URM) des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

---

Datum

---

Peter Richard Steinhagen

## 8 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Baumgart für die Überlassung des Promotionsthemas, das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und Denken und die inspirierenden Gespräche während der Erstellung dieser Arbeit widmen.

Ebenso bedanke ich mich für die studienbegleitende Förderung durch das Deutschlandstipendium. Diana Metzke danke ich ausdrücklich für ihre stete Hilfsbereitschaft, ihre geduldige Art und die vielen unterhaltsamen und spannenden Geschichten aus ihrem Leben.

Saskia Thomas danke ich für das exzellente Heranführen an die Methodik und die Hilfestellung bei der Etablierung von Versuchen.

Besonders möchte ich Herrn PD Dr. Kolarich und seiner Arbeitsgruppe für die Erstellung der Monosaccharidanalyse danken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.