

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Prof. Dr. Daniela N. Männel

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BEEINFLUSST FICOLIN-B DIE PHAGOZYZYTOSE IM IN-VITRO
MODELL?**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sina Seyfried

2014

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Prof. Dr. Daniela N. Männel

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BEEINFLUSST FICOLIN-B DIE PHAGOZYZTOSE IM IN-VITRO
MODELL?**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sina Seyfried

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela N. Männel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Das Immunsystem	1
1.1.1.	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2.	Das erworbene Immunsystem	5
1.2.	Apoptose und Nekrose.....	8
1.2.1.	Apoptose	8
1.2.2.	Nekrose	9
1.3.	Die Ficoline	10
1.4.	Die Trojanische-Pferd-Theorie	11
1.5.	Zielsetzung.....	12
2.	Material und Methoden.....	13
2.1.	Materialien	13
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.2.	Zellmedien.....	14
2.1.3.	Puffer und Lösungen	15
2.1.4.	Antikörper	16
2.1.5.	rekombinantes Ficolin-B.....	17
2.1.6.	Tiere.....	17
2.1.7.	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.8.	Geräte.....	18
2.1.9.	Software	19
2.2.	Methoden.....	19
2.2.1.	Zellkultur	19
2.2.2.	Zelllysate von COS-Zellen	21
2.2.3.	Proteinkonzentration	21
2.2.4.	SDS-Page.....	21

2.2.5.	Westernblot	22
2.2.6.	Coomassie-Färbung.....	23
2.2.7.	Blocken	23
2.2.8.	Antikörper Färbung	24
2.2.9.	Antigen-Detektion	24
2.2.10.	Durchflusszytometrie	24
2.2.11.	Cytospin.....	27
2.2.12.	Primäre Zellen	27
2.2.13.	UV-induzierte Apoptose	29
2.2.14.	hitzeinduzierte Nekrose	29
2.2.15.	Mausserum.....	29
2.2.16.	Phagozytose von FITC-markierten Beads.....	29
2.2.17.	Phagozytose von CFSE-markierten apoptotischen/nekrotischen COS-Zellen	30
2.2.18.	Stimulation von HoxB8 Zellen	31
2.2.19.	Phagozytose von HoxB8 durch PEC.....	31
2.2.20.	Statistik.....	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Apoptose und Nekrose in bm-PMN	33
3.2.	Kontrolle für FcnB in COS-Zellen	35
3.3.	PEC-Phagozytose von FITC-Beads	36
3.4.	HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads	37
3.4.1.	HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads in verschiedenen Seren	39
3.4.2.	HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads in hMS in Abhängigkeit von Ficolin-B	41
3.5.	Makrophagen-Phagozytose von toten COS-Zellen	43
3.5.1.	BMDM-Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen COS-Zellen	43
3.5.2.	PEC-Phagozytose von toten COS-Zellen	47
3.6.	PEC-Phagozytose von HoxB8-Zellen.....	50
3.6.1.	PEC-Phagozytose von stimulierten und unstimulierten HoxB8-Zellen	50

3.6.2.	PEC-Phagozytose von HoxB8-Zellen in Abhängigkeit von Ficolin-B	53
4.	Diskussion.....	54
4.1.	Phagozytose Assay für Trojanische-Pferd-Theorie.....	54
4.1.1.	Etablieren der Testbedingungen	54
4.2.	Einfluss von hitzeinaktiviertem Mausserum auf die Phagozytose.....	56
4.3.	Einfluss durch die Stimulation auf die Phagozytose.....	56
4.3.1.	LPS Stimulation.....	56
4.3.2.	PMA Stimulation	57
4.4.	Einfluss von Ficolin-B auf die Phagozytose.....	57
4.4.1.	HoxB8-Phagozytose.....	57
4.4.2.	BMDM und PEC Phagozytose.....	58
5.	Zusammenfassung.....	59
	Literaturverzeichnis	60

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes System, das sich im Laufe der Evolution weiterentwickelt hat um den menschlichen Organismus vor potentiellen Krankheitserregern zu schützen. Dies können sowohl fremde Stoffe und Mikroorganismen als auch körpereigene entartete Zellen sein. Dieses komplexe System ist ein Zusammenspiel von verschiedenen Molekülen, Zellen und Organen.

Um eine optimale Immunabwehr zu gewährleisten, gibt es im menschlichen Organismus zwei phylogenetisch unterschiedlich alte Immunsysteme, die in komplexer Weise zusammenarbeiten: das angeborene und das erworbene Immunsystem (Janeway, 2009).

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Zuerst muss ein potentieller Erreger die natürlichen mechanischen und chemischen Barrieren des Körpers überwinden, wie z.B. die Haut und die Schleimhäute, die mittels mikrozidem Talg, Schleim und einer schützenden Normalflora bereits die erste Abwehr gegen potentielle Erreger bilden.

Hat ein Erreger es geschafft diese erste Abwehr zu umgehen, trifft er auf die humoralen und zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Dieser Teil des Immunsystems bildet zwar den unspezifischen aber sehr schnellen Teil unserer Abwehr, dadurch kann ein potentieller Erreger bereits hier abgefangen werden, unabhängig von einer bereits vorangegangenen Exposition.

Die Bestandteile des angeborenen Immunsystems können diese körperfremden Erreger mittels ihrer „pattern-recognition receptors“ (PRRs) von körpereigenen Zellen unterscheiden. Diese Rezeptoren können verschiedene Muster, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) auf körperfremden Erregern erkennen. Es kann sich hierbei Beispiel um extrazelluläre Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) aus der

Zellwand von Gram-negativen Bakterien handeln, oder auch um ehemals intrazelluläre Bestandteile wie DNA (Janeway, 2009).

1.1.1.1. Die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind zum einen ortständig in den verschiedenen Geweben und Organen des Körpers und zirkulieren zum anderen im Blut. Diese Zellen sind Macrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Die Macrophagen entwickeln sich aus den Monozyten, welche aus dem Knochenmark ins Blut übergehen und im Blut zirkulieren. Von dort wandern sie in die verschiedenen Gewebe, wie zum Beispiel das Bindegewebe und die Submukosa. Dort differenzieren sie zu Macrophagen. Sie bilden die ersten Zellen, die einen Erreger als körperfremd erkennen können. Macrophagen gehören zu der Gruppe der Phagozyten und können somit den Erreger phagozytieren. Die phagozytierten Erreger werden in der Zelle weiter zerstört. Einzelne Komponenten werden dann durch den „major histocompatibility complex“ (MHC) auf der Oberfläche präsentiert. Bei diesem Prozess schütten sie gleichzeitig Cytokine aus, um andere Zellen des Immunsystems wie die Granulozyten anzulocken und das erworbene Immunsystem zu aktivieren.

Die Granulozyten werden anhand ihres Färbeverhaltens in Neutrophile, Basophile und Eosinophile eingeteilt. Die Aufgabe der Neutrophilen ist der Schutz vor Bakterien. Die der Eosinophilen und Basophilen ist der Schutz vor Parasiten. Diese Zellen phagozytieren den potentiellen Erreger und bilden ein Phagosom. Dieses wird mit den Lysosomen der Granulozyten, die mikrozide Enzyme und toxische Sauerstoffderivate enthalten, verschmolzen und der Erreger somit abgetötet.

Eine weitere Zellart der angeborenen Immunabwehr sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Ihre Aufgabe ist die Abwehr von Viren und Tumorzellen im Körper. Sie können die infizierte oder entartete Zelle zur Apoptose zwingen oder vernichten sie mittels zytotoxischer Stoffe aus ihren Granula (Janeway, 2009).

1.1.1.2. Die humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems

Die humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems bestehen aus verschiedenen Plasmaproteinen. Diese zirkulieren nur passiv im Blut und in den Gewebeflüssigkeiten und können nicht aktiv wandern oder herbeigelockt werden.

Eine wichtige Bedeutung im angeborenen Immunsystem hat das Komplementsystem. Die wichtigste Aufgabe des Komplementsystems ist es die Oberfläche von potentiellen Erregern zu bedecken und somit auf diesen Erreger aufmerksam zu machen (Opsonisierung).

Gleichzeitig können die verschiedenen Komplementfaktoren durch Porenbildung die Membran des Erregers zerstören. Außerdem werden durch die Aktivierung des Komplementsystems verschiedene weitere Cytokine freigesetzt, die wiederum die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems anlocken und eine Entzündungsreaktion auslösen (Janeway, 2009).

Das Komplementsystem kann auf verschiedene Wege aktiviert werden: den „klassischen Weg“, den „Lektin-Weg“ und den „alternativen Weg“. Alle drei Wege haben eine gemeinsame Endstrecke die mit der C3- Konvertase beginnt. Der klassische Weg startet mit dem Protein C1q, das einerseits Oberflächenantigene auf Erregern selbst erkennen kann, andererseits aber auch an Antigen-Antikörper-Komplexen aus dem erworbenen Immunsystem bindet. Im Lektin-Weg können einerseits die „Mannose-bindende Lektine“ (MBL) mit einer „carbohydrate recognition domain“ (CRD) die Kohlenhydrate wie zum Beispiel Mannose auf pathogenen Oberflächen erkennen (Janeway, 2009). Zum anderen können die Ficoline, die statt einer CRD eine Fibrinogen-ähnliche Region haben, acetylierte Kohlenhydrate erkennen und binden. Somit aktivieren die MBL und die Ficoline die MBL-assoziierte Serinprotease (MASP), welche wiederum die Kaskade des Komplementsystems aktiviert (Krarup, 2004; 2008) (Endo, 2011). Der alternative Weg beginnt durch eine spontane Aktivierung von C3 selbst, welche nur auf pathogenen Oberflächen aktiv bleibt und so ebenfalls die Endstrecke des Komplementsystems aktiviert (Janeway, 2009).

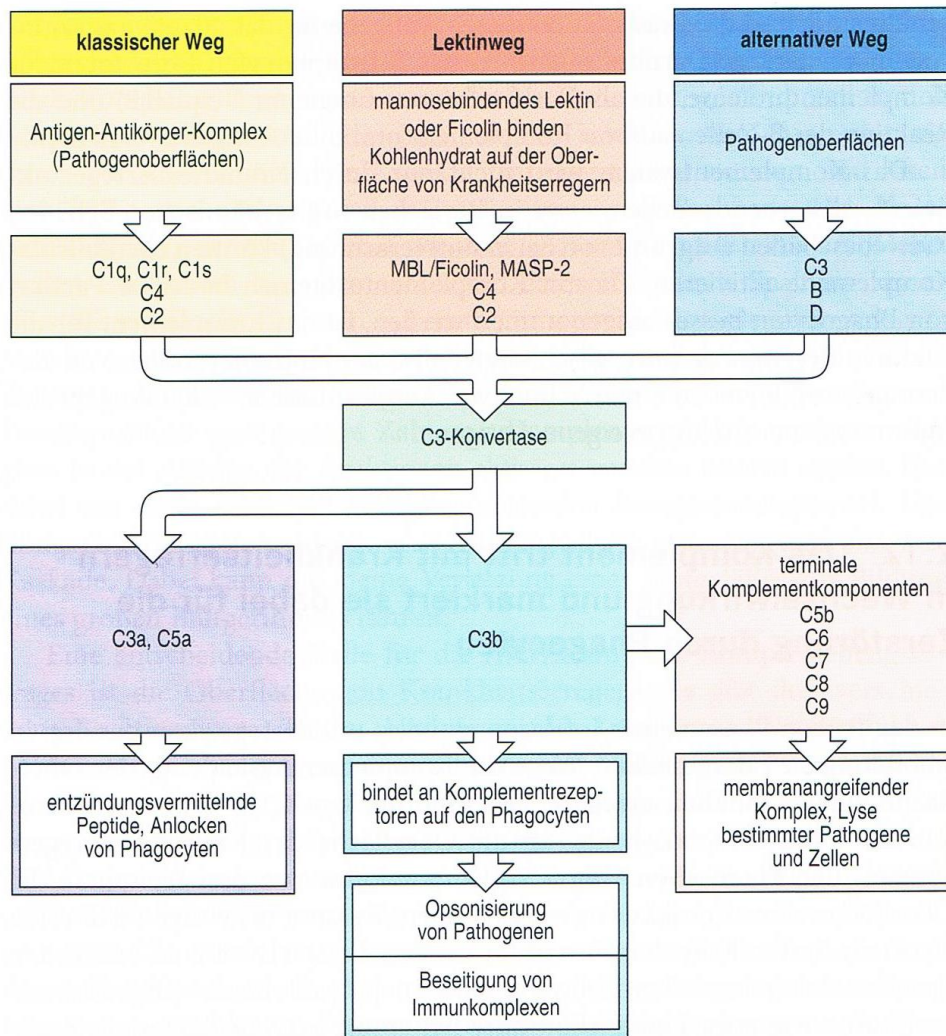


Abbildung 1 Das Komplementsystem übernommen aus Janeway Immunologie, 2009

Die Interleukine sind ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Es sind immunmodulatorische Polypeptide, die der Kommunikation zwischen immunkompetenten Zellen dienen indem sie pro- oder antiinflammatorisch und chemotaktisch wirken. Einige Interleukine können auch von Zellen des erworbenen Immunsystems sezerniert werden (Janeway, 2009).

1.1.2. Das erworbene Immunsystem

Während das angeborene Immunsystem unspezifisch jeden potentiellen Krankheitserreger gleich bekämpft, kann das erworbene Immunsystem nach Kontakt mit einem Erreger ein Gedächtnis bilden und diesen beim Zweitkontakt spezifischer und somit schneller vernichten (Janeway, 2009).

1.1.2.1. Die zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems

Die Zellen des erworbenen Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten können wiederum in zytotoxische T-Zellen (CD8+) und in T-Helferzellen (CD4+) unterschieden werden (Janeway, 2009).

Wenn antigenpräsentierende Zellen (z.B. Macrophagen mit phagozytiertem Erreger) in die Lymphknoten wandern und die Antigene auf den MHC-Molekülen präsentieren, kommen sie in Kontakt mit den T-Zellen der Lymphknoten. Die CD8+ T-Zellen können diese Antigene nun als fremd erkennen und eliminieren. Die CD4+ T- Helferzellen hingegen können mittels Ausschüttung von Interleukinen die Entzündungsreaktion und somit auch die humorale und zelluläre Immunantwort fördern (Janeway, 2009).

Die humorale Antwort des erworbenen Immunsystems funktioniert durch Antikörper, welche spezifisch für einen Erreger von aktivierten B-Zellen produziert werden. Durch zufällige genetische Rekombination tragen verschiedene B-Zellen die unterschiedlichsten gebundenen Antikörper auf ihren Oberflächen. Trifft nun eine B-Zelle auf eine antigenpräsentierende Zelle und die Kombination des Antikörpers bindet das Antigen, kann die B-Zelle mit Hilfe einer T-Helferzelle das Antigen als pathogen erkennen und wird aktiviert. Sie kann sich nun teilen und als Plasmazelle den spezifischen Antikörper als humorale Komponente des erworbenen Immunsystems sezernieren (Janeway, 2009).

1.1.2.2. Die humoralen Komponenten des erworbenen Immunsystems

Die bereits erwähnten von Plasmazellen sezernierten Antikörper gehören zu der Gruppe der Globuline. Diese Immunglobuline (Ig) bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten.

Die leichten Ketten haben eine variable Domäne und eine konstante Domäne, schwere Ketten hingegen haben drei konstante Domänen und ebenfalls eine variable Domäne. Mit den variablen Domänen der leichten und schweren Ketten können Antigene erfasst werden (Janeway, 2009).

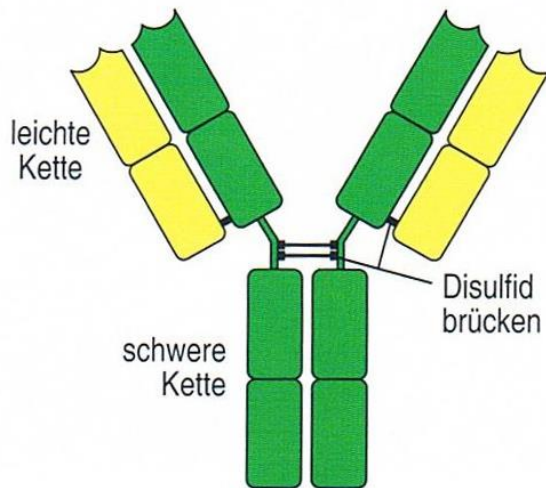


Abbildung 2 schematischer Aufbau eines Antikörpers (übernommen aus Janeway, 2009)

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen, die durch ihre schweren Ketten unterschieden werden: IgA, IgG, IgM, IgE und IgD.

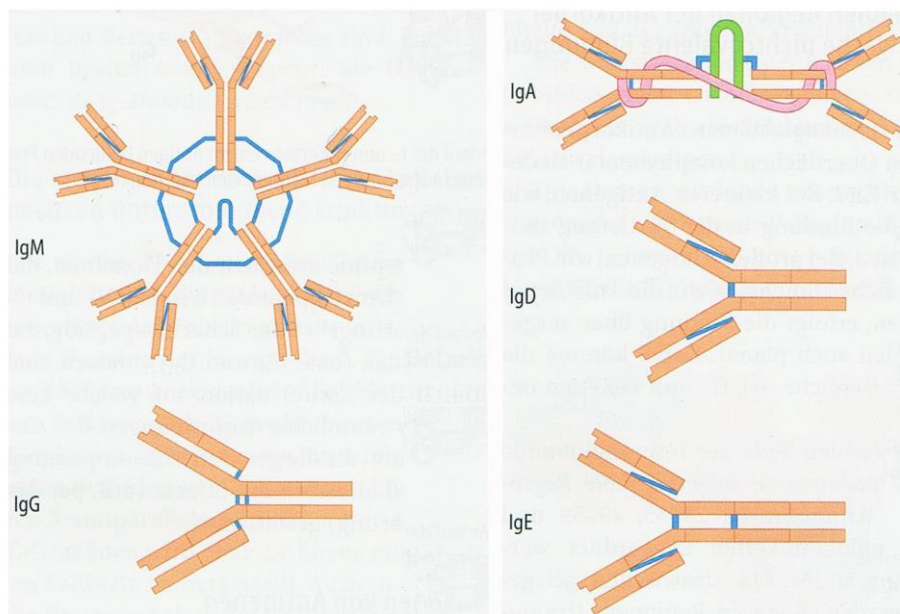


Abbildung 3 Schema der verschiedenen Immunglobuline (übernommen aus Löffler, 2003)

Die Antikörper können nicht direkt mikrozid wirken. Ihre Aufgabe besteht vor allem darin, die Oberfläche eines Erregers zu benetzen und damit mögliche Wechselwirkungen durch Zell-Zell-Kontakte zu verhindern. Handelt es sich nicht um einen Erreger, sondern um eine toxische Substanz kann diese durch das Andocken der Antikörper direkt ausgeschaltet werden. Dadurch, dass ein Antikörper mehrere Bindungsstellen hat, kann es auch zur Agglutination kommen (Janeway, 2009).

Ein weiterer Effekt dieser Oberflächenbenetzung ist die Opsonisierung. Die Erreger werden nicht nur neutralisiert sondern auch für Phagozyten markiert. Denn diese können die konstante Domäne (das Fc-Fragment) eines Antikörpers erkennen, phagozytieren und den markierten Erreger ausschalten. Durch die Opsonisierung werden nicht nur die Zellen des Immunsystems angeregt, sondern es aktiviert auch das Komplementsystem, das seinerseits ebenfalls den Erreger zerstören kann. Zusätzlich lockt es die NK-Zellen an (Janeway, 2009). Die verschiedenen Antikörperklassen haben auch verschiedene Aufgaben und Vorkommen. IgA befindet sich hauptsächlich auf den Schleimhäuten der Augen, Atemwege, des Magen-Darm-Traktes und des Urogenitaltraktes. Somit kann es bereits die möglichen Eintrittspforten von Erregern schützen. Der Antikörper IgM wird in der Frühphase einer Infektion gebildet. Er liegt als Pentamer vor und kann durch seine 10 Bindungsstellen zu einer schnellen Agglutination führen und somit viele Erreger abfangen. Im Laufe der Infektion oder bei einem Zweitkontakt wird vermehrt der Antikörper IgG gebildet. Dieser hat nicht nur eine höhere Affinität zum Erreger, er hat auch eine wesentlich längere Halbwertszeit. Der Antikörper IgE kommt fast nur membranständig auf Mastzellen vor, da diese das Fc-Fragment erkennen und binden. Bindet IgE ein Antigen kommt es vor allem zur Ausschüttung von Histaminen, die die Gefäßpermeabilität erhöhen und die Gefäße erweitern. Der Antikörper IgD ist ebenfalls hauptsächlich membrangebunden, jedoch an den unaktivierten B-Zellen. Sie können hiermit Antigene erkennen und werden so aktiviert (Janeway, 2009).

1.2. Apoptose und Nekrose

1.2.1. Apoptose

Die Apoptose ist ein natürlicher Prozess des programmierten Zelltodes und somit wichtig für die Abläufe im Immunsystem. Einerseits werden Lymphozyten aussortiert, die autoimmune Reaktionen zeigen oder generell nicht funktionsfähig sind. Andererseits werden Zellen zur Apoptose gebracht, welche nun zum Beispiel nach Abklingen einer Infektion nicht mehr benötigt werden (Janeway, 2009).

Es gibt zwei Wege mit denen die Apoptose begonnen werden kann: den extrinsischen und den intrinsischen. Beide Wege haben die gleiche Endstrecke, die sogenannte Caspase-Kaskade, welche schlussendlich zum Zelltod führt.

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Liganden, wie zum Beispiel Cytokine von T-Lymphozyten, an sogenannte „Todesrezeptoren“ aktiviert. Diese Todesrezeptoren sind transmembrane Proteine, die im cytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne („death domain“ DD) besitzen. Wird diese aktiviert bildet sie mit anderen Todesdomänen Cluster, welche dann die proCaspase 8 in die aktivierte Caspase 8 umwandeln und die Caspase-Kaskade aktiviert (van Cruchten, 2001).

Der intrinsische Weg wird auch als mitochondrialer Weg bezeichnet, da dieser Weg hauptsächlich durch Faktoren aus den Mitochondrien beeinflusst ist. Wird nun eine Zelle zum Beispiel durch Chemotherapie, Nährstoffmangel oder UV-Licht geschädigt, kommt es zum Austritt von pro-apoptotischen Molekülen, wie zum Beispiel Cytochrom C. Durch Bindung von Cytochrom C an andere Proteine kommt es zu einer Konformationsänderung, welche eine Domäne freilegt, die die proCaspase 9 bindet und zur aktivierten Caspase 9 umwandelt. Diese wiederum kann die Caspase-Kaskade ebenfalls aktivieren (van Cruchten, 2001).

Die Caspasen führen durch Proteolyse und Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts zur Zerstörung. Die Zelle schnürt nach und nach Apoptosekörperchen ab, die dann von umliegenden Phagozyten aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei dieser Form des Zelltodes die Zellmembran intakt.

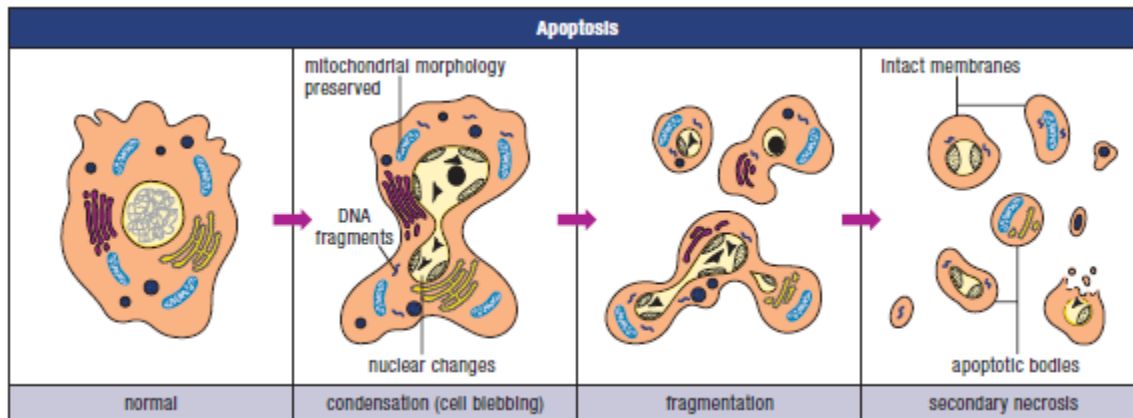


Abbildung 4 übernommen aus Apoptosis and Cell Proliferation 2nd Edition, Böhringer Mannheim, 1998

1.2.2. Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose, die ein gewollter und kontrollierter Untergang der Zelle ist, ist die Nekrose eine ungewollte und somit pathologische Zellzerstörung. Es gibt verschiedene Mechanismen, die zum Zelltod führen können, zum Beispiel Toxine, Ischämie und Hitze. Durch diese Einflüsse wird die Zelle irreparabel geschädigt und es kommt zum Anschwellen der Zelle, Membranstabilität und zum Austritt von Zellinhalten. Dieses Austreten führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche die Zellen des Immunsystems anlockt um die untergegangenen Zellen zu entfernen.

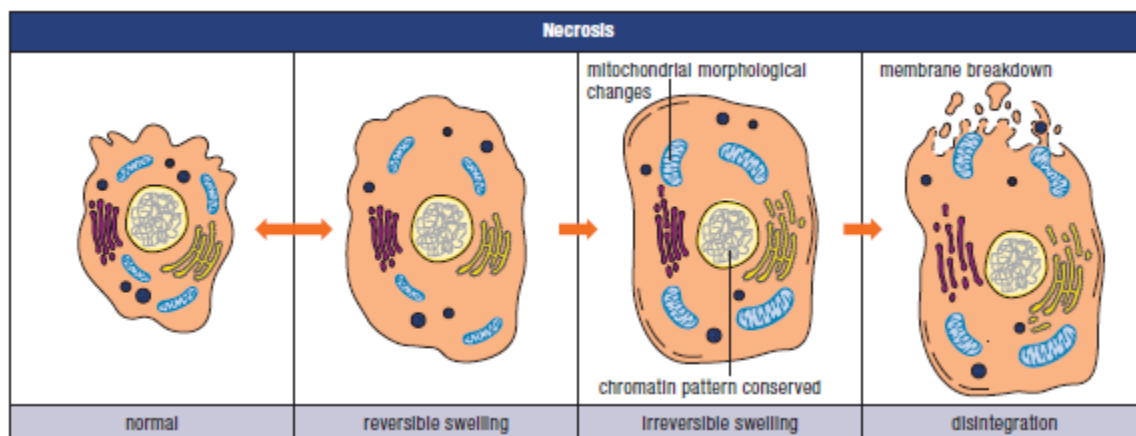


Abbildung 5 übernommen aus Apoptosis and Cell Proliferation 2nd Edition, Böhringer Mannheim, 1998

1.3. Die Ficoline

Die Ficoline gehören zu den Lektinen und haben wie oben bereits erwähnt ähnliche Aufgaben. Erstmals wurde Ficolin 1991 im Uterus des Schweins entdeckt. Da das Protein strukturelle Ähnlichkeiten mit Kollagen und Fibrinogen hatte, wurde es Ficolin genannt (Ichijo et al. 1991). Seit dem wurde dieses neue Protein weiter erforscht und in weiteren Spezies wie dem Menschen und der Maus entdeckt.

Die Ficoline bestehen wie in Abbildung 6 zu sehen meist aus 4 Untereinheiten. Die Untereinheiten selbst gliedern sich in eine kurze Cysteinreiche Domäne, eine lange und gerade collagen-ähnliche Domäne und eine globuläre Fibrinogen-ähnliche Domäne (Fujita, 2002).

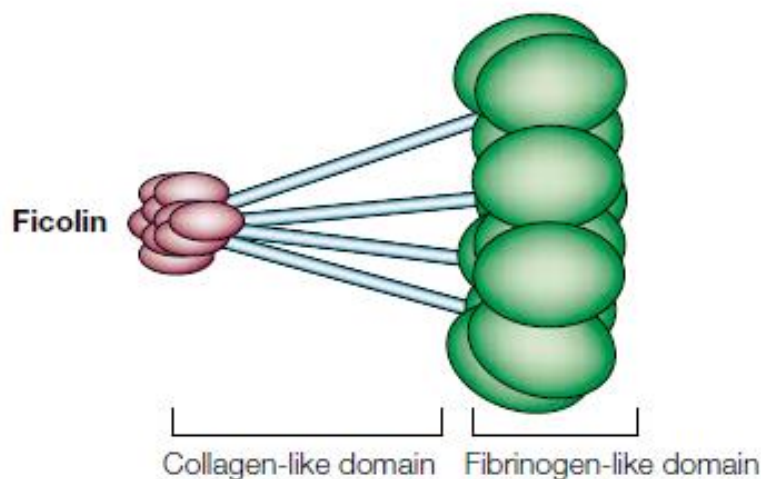


Abbildung 6 übernommen aus Fujita, 2002

Die Bindung an acetylierte Kohlenhydrate erfolgt mit der Fibrin-ähnlichen Domäne. Im Menschen konnte man drei verschiedene Ficoline identifizieren: M-Ficolin (Ficolin-1), L-Ficolin (Ficolin-2) und H-Ficolin (Ficolin-3). M-Ficolin wird hauptsächlich in Monozyten, aber auch im Knochenmark, der Lunge und der Milz synthetisiert. Es liegt jedoch zu einem großen Teil nicht frei im Serum vor, sondern membrangebunden an Monozyten, in den Granula der Neutrophilen, Monozyten und im Alveolarepithel der Lunge. L-Ficolin ist hauptsächlich im Serum zu finden und wird von der Leber sezerniert. H-Ficolin ist ebenfalls ein Serumprotein, das von Leber, Gallengangsepithel und Alveolarepithel gebildet wird. (Thielens et al. 2007) In der Maus konnten zwei verschiedene Ficoline gefunden werden: Ficolin-A (ortholog zum humanen L-Ficolin) und Ficolin-B (ortholog zum humanen M-Ficolin). Das Fehlen des

Orthologen zu dem humanen H-Ficolins erklärt sich mit dem Vorhandensein eines Pseudogens für dieses Protein (Thielens et al. 2007). Ficolin-A wird in der Maus hauptsächlich in der Leber und Milz produziert und sezerniert (Fujimori et al. 1998) und kommt somit frei im Serum vor. Ficolin-B hingegen wird sehr stark im Knochenmark in den Zellen der myeloiden Reihe (Lui et al. 2005) synthetisiert und wenig in der Milz (Ohashi et al. 1998).

Erst kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass rekombinantes Ficolin-B eine starke Bindung an apoptotische und nekrotische Zellen und Apoptosekörperchen aufweist (Schmid et al. 2011).

1.4. Die Trojanische-Pferd-Theorie

Es gibt eine Möglichkeit wie ein Erreger dem ausgefeilten Immunsystem entkommen und es sogar für seine Zwecke nutzen kann: die „Trojanische-Pferd“ Theorie. Diese besagt, dass sich ein Erreger in den Zellen, die ihn normalerweise vernichten sollen, einnistet und sich damit vor Angreifern wie anderen Zellen und Antibiotika schützen kann.

Ein Beispiel eines solchen Erregers ist *Staphylococcus aureus*. Ein typischer Infektionskeim, der sich in ca. 24% der Fälle einer Bakteriämie finden lässt (Aung et al. 2012). Eine aktuelle Studie aus Dänemark zeigt, dass die Inzidenz der *Staph. aureus* Bakteriämien bei Personen <1 Jahr und >75 Jahren in den Jahren 1995-2008 stabil bleibt und nur bei Personen zwischen 1 Jahr und 75 Jahren langsam sinkt. Diese Gruppe zeigte auch, dass das 30 Tage Überleben einer solchen Bakteriämie bei 25,7% lag (Mejer et al. 2012). In vielen Fällen sind große infizierte Wunden der Grund für diese Bakteriämie. Jedoch gibt es auch Fälle von kleinen Gewebeverletzungen, die dann zu einer Bakteriämie und Sepsis führen. In einem Case Report wird berichtet, wie eine Akupunkturbehandlung zu einer Sepsis mit beidseitigen Lungeninfiltraten führte (Maas et al. 2013). Auffällig ist, dass es bei Patienten mit Neutropenie seltener zu einer *Staph. aureus* Bakteriämie kommt als bei immungesunden Patienten (Thwaites, 2011).

Normalerweise ist *Staph. aureus* ein extrazellulärer Erreger und wird bei einer Infektion des menschlichen Organismus von unserem Immunsystem angegriffen und von Neutrophilen und Macrophagen phagozytiert. In den Phagosomen trifft der Keim auf mikrozide Substanzen wie reaktive Sauerstoffderivate, Peptide und Lysozyme. Die Phagozyten

verschmelzen ihre Granula mit dem Phagosom und vernichten somit den Keim. Staph. aureus kann diesen Mechanismen entgegen wirken, indem er protektive Antioxidantien wie Catalase, Staphyloxanthin und Carotenoid Pigment mit sich bringt. Dadurch kann er die gefährlichen freien Radikale abfangen und im Phagosom überleben (Liu et al. 2005). So gelangt der Keim unerkannt in die Blutbahn und kann in alle Organe streuen und dort neue Infektionsherde auslösen. Staph. aureus beginnt nun innerhalb des Neutrophilen Leukozidine zu produzieren, welche diesen dann zur Apoptose bringen und den Staph. aureus wieder freisetzen (Voyich et al. 2005). Die apoptotischen Neutrophilen können nun nicht nur den Erreger wieder freisetzen, sondern locken auch Macrophagen an, welche den infizierten und apoptotischen Neutrophilen nun phagozytieren. In diesem Phagosom können nun die Erreger sich weiter verstecken und damit fungieren dann auch die Macrophagen als Trojanische Pferde zum Beispiel für den Parasiten Leishmania (Ritter et al. 2009).

Somit können die Phagozyten, sowohl Neutrophile als auch Macrophagen, als Trojanische Pferde für Krankheitserreger, in diesem Beispiel Staph. aureus, dienen und so eine Sepsis bzw. einen Abszess auslösen.

1.5. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, ein Phagozytosemodell für die Trojanische-Pferd-Theorie zu entwickeln und zu überprüfen, ob Ficolin-B die Phagozytoserate steigern und somit helfen kann, dass opsonisierte Partikel besser phagozytiert werden und sich dadurch innerhalb der Phagozyten, die als Trojanischen Pferde dienen, überleben können. Hierfür wurde zunächst ein geeigneter Phagozytoseassay entwickelt und daraufhin die Phagozytoserate in Abhängigkeit von Ficolin-B getestet.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

B-Mercaptoethanol	PAN, Biotech
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Essigsäure	Merck
Estradiol	Sigma
Ficoll-Histopaque 1.119	Sigma
Ficoll-Histopaque 1.077	Sigma
FITC-markierte Latex-Beads	Polysciences
Foetal Bovin Serum (FCS)	PAN, Biotech GmbH
G-CSF	Uni Regensburg
Geneticin 50mg/ml 20ml	invitrogen
Glycerin	Merck
Glycin	USB
Ionomycin	Sigma
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Aldrich
M-CSF	Uni Regensburg
Methanol	Merck
Milchpulver	REAL
Para-Formaldehyd	Merck
Penicillin /Streptomycin	PAN, Biotech GmbH
PMA	Sigma
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protein Marker VI (10-245) prestained	AppliChem
Stem cell growth factor (SCF aus CHO-Zellen)	Uni Regensburg
Tris-HCL	Merck
Trypanblau	Sigma, Aldrich

Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)

PAN,Biotech GmbH

Tween 20

Fluka

Trypan-Blau Lösung 0,2%

Sigma

2.1.2. Kits

Substrate

SuperSignal West Femto

Thermo Scientific

NOWA Chemoluminescent

MoBiTec

SuperSignal West Pico

Thermo Scientific

DiffQuick Färbeset

(Medion Diagnostics)

Fixierlösung: Fast Green (0,002g/l) in Methanol

Färbelösung I: Eosin Y (1,22g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) und 0,1% (g/V) Natriumazid

Färbelösung II : Thiazin-Farbstoff (1,1g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6)

BCA Protein Assay

(Pierce/Thermo Scientific)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce/Thermo Scientific) benutzt. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine BSA-Standard Kurve verwendet. Dieses Kit basiert darauf, dass Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren (Biuret-Reaktion) und das BCA-Reagenz mit dem Cu^{+} einen violetten Komplex bildet. Dieser Komplex weist bei 562nm eine Absorption auf, die linear zur Menge des Proteins ist.

2.1.2. Zellmedien

RPMI 1640 Medium

with L-Glutamine, with 2,0g/l NaHCO_3

PAN, Biotech GmbH, Aidenbach

OPTI-MEM®I + GlutaMAX™ -I Medium

Invitrogen

2.1.3. Puffer und Lösungen

Phosphate Buffered Saline (PBS)

PAN, Biotech GmbH, Aidenbach

Laemli Laufpuffer 5x

Tris base 120 mM

Glycine 950 mM

SDS 0.5%

H₂O ad 2500 ml

Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert und vor der Benutzung für die SDS-Page wurde es mit Millipore Wasser zu 1x Puffer verdünnt.

FACS-Puffer

1xPBS

2mM EDTA

2% FCS

Transferpuffer

Tris 25 mM

SDS 0.02%

Glycine 192 mM

Methanol 20%

H₂O ad 1000 ml

Waschpuffer

Tween 20 0,05%

5mM Calcium

1xTBS

BlockPuffer

5% Milchpulver

1xTBS

Tween 20 0,05%

5mM Calcium

Coomassie-Färbelösung

Millipore Wasser 49.8 %

Methanol 40%

Coomassie Brilliant blue R250 0.2 %

Essigsäure 10%

Coomassie-Entfärber

Millipore Wasser 50%

Ethanol 40%

Essigsäure 10%

Brij Zelllysat Puffer

10mM TRIS pH7,5

150mM NaCl

2mM EDTA pH 8

0,875% Brij

0,125%NP40

Proteaseinhibitor complete

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Westernblot

1A4

Anti V5

Anti-mouse FcnB PoAb Chicken

Uni Regensburg

Invitrogen

Davids Biotech

2.1.4.2. FACS

Fc-Block

Fc receptor Blocking: Rat anti mouse FcγR II/III (clone 2.4G2)

Anti-Maus CD11b-APC e	Miltenyi Biotech
Ly-6C	BD Biosciences
Ly-6G	BD Biosciences
Gr-1	BD Biosciences
F4/80	BD Biosciences
CFSE-FITC	Invitrogen
Streptavidin Cy5	Invitrogen

2.1.5. rekombinantes Ficolin-B

Das rekombinante Ficolin-B, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde in *Drosophila* Schneider (DS2) Zellen exprimiert. DS2-Zellen enthalten einen Vektor mit dem Ficolin-B Gen, dem ein Metallothionein-Promoter voran geschaltet ist. Durch Zugabe von CuSO_4 wurden die Zellen aktiviert und sezernierten das rekombinante Ficolin-B. Mittels eines auf der C-terminalen Seite des Proteins befindlichen V5-Tags konnte es durch einen Anti-V5 Antikörper erkannt werden.

Die Produktion erfolgte im Labor des Universitätsklinikums Regensburg und wurde mir freundlicherweise von Katja Hunold und Dorothea Weber-Steffens zur Verfügung gestellt.

2.1.6. Tiere

In dieser Arbeit wurden die Zellen von C57BL/6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld) oder BALB/c Mäusen (Janvier, Le Genest, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden entsprechend den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes in einem konventionellen Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg gehalten. Sie wurden mit Nahrung und Leitungswasser ad libitum versorgt und hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

12-Well Platten	BD Biosciences
24-Well Platten	BD Biosciences
15ml Falcon	Sarstedt
50ml Falcon	Sarstedt
Zellkulturflaschen 25/75	BD Biosciences
100mm Square Petri Dish	Sterilin Ltd.
Tissue Culture Dish 60x15mm	BD Biosciences
Polystyrene, nonpyrogenic	BD Biosciences
Cell Stainer 40µm Nylon	BD Biosciences
Serologische Pipette 5/10/25ml	Sarstedt
Cell Scraper, Zellschaber	Sarstedt
FACS-Tubes	Sarstedt
Nadeln 20G, 27G	BD Biosciences
Spritzen 1ml, 5ml, 10ml	BD Biosciences
Whatman Papier	Hartenstein

2.1.8. Geräte

Accu Jet pro	Brand
Calibur	BD Biosciences
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Sterilbank HeraSafe K12	Thermo
Image Quant, LAS 4000 mini	GE Healthcare
Inkubator Heraeus BBD	Heraeus
Lichtmikroskop	Olympus
LSR II	BD Biosciences
Neubauer Zählkammer	HBG
Pipetten	Sarstedt
Power Pack P25 T (WB)	Biometra
Röntgenfilm Entwickler	Protec Medicine technique

Shandon Cytospin 4	Thermo, Electron Corporation
Softmax Elisa Reader	MWC-Biotech
ULWCD 0.30	Olympud Japan
Vortexer	Heidolph
WB Blotting	BioRad
WB Laufkammer	BioRad

2.1.9. Software

BD FACSDIVA Version 5.0.1	BD Biosciences
WindowsOffice2010	Microsoft Corporation
Cell [^] F Imaging	Olympus
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. HoxB8 Zellen

HoxB8 sind Granulozyten-Vorläufer Zellen, die einen Estradiolrezeptor (ER) besitzen. Durch Zugabe von Estradiol in das Medium verbleiben die HoxB8 in ihrem Vorläuferstadium. Entzieht man den HoxB8 Zellen das Estradiol, beginnen sie ihre Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten (Wang et al., 2006; die Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Häcker zur Verfügung gestellt).

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen in OPTIMEM Glutamax (Gibco/Invitrogen) Medium mit 10% FCS, 1% Pen/Strep und 30µM β-MeETOH und immer frisch dazugegebenen SCF Überstand(1:25) aus eigener Herstellung kultiviert.

Auftauen der HoxB8

Zuerst wurden 12ml des OPTIMEM Mediums mit Estradiol und SCF auf 37°C aufgewärmt.

Darauf wurden die Zellen im 37°C Wasserbad ca. 5 Minuten aufgetaut, in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und sehr langsam 9ml des aufgewärmten Mediums hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit den restlichen 3ml des Mediums resuspendiert und in ein 6er-well gegeben.

Am darauffolgenden Tag wurde 1ml frisches Medium hinzugefügt und am übernächsten Tag wurden die Zellen bei 1000rpm abzentrifugiert, in 6ml frischem Medium aufgenommen und jeweils 3ml in ein 6er-well gegeben.

War die benötigte Zelldichte erreicht, wurde die Zellen gewaschen und in T25 Flaschen überführt und in diesen weiter kultiviert.

Ausdifferenzieren der HoxB8

Zum Ausdifferenzieren der Zellen wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert (1000rpm) und zweimal mit 10ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 2-3 ml Medium aufgenommen, gezählt und erneut ausgesät. Nach 5 Tagen sind die Zellen ausdifferenziert. Aus 3×10^5 Vorläuferzellen entwickeln sich ca. 3×10^6 neutrophile Granulozyten.

2.2.1.2. COS-Zellen

COS-Zellen sind Fibroblasten und wurden aus der Niere von Cercopithecus aethiops isoliert. Die COS-Zellen sind eine Weiterentwicklung der immortalisierten CV-1 Zellen, in welche mit SV40 Plasmide transfiziert wurden. „COS“ ist ein Akronym für „CV-1 origin, SV40“ (Gluzman, 1981).

Die Zellen können aus der Zell-Stammsammlung (zum Beispiel bei ATCC Nr. CRL-1651TM) bezogen werden.

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep bei 37°C und 5% CO₂ in 75cm² Flaschen kultiviert.

Die Zellen wurden zweimal in der Woche 1:10 gesplittet. Zuerst wurde das alte Medium abpipettiert und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Dann wurden die COS-Zellen mit 1ml Trypsin für 5 Minuten inkubiert und in 10ml Medium resuspendiert und gesplittet.

2.2.2. Zelllysate von COS-Zellen

Für die Zelllysate wurden 10 Millionen COS-Zellen in 100µl Brij-Puffer (mit einfach Proteaseinhibitor) vorsichtig suspendiert und 20 Minuten auf Eis gelegt. Danach für 15 Minuten bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Proteinkonzentration

Um die Proteinbestimmung durchzuführen, wurde die Mikroplatten Methode durchgeführt. Als erstes wurde das „Working Reagent (WR)“ hergestellt, indem man die benötigte Menge des WR ausrechnete und dann die beiden Reagenzien A und B in dem Verhältnis 50:1 mischte. Dann wurden 10µl des Standards und 10µl der Probe (1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt) in jeweils doppelter Ausführung auf die Mikroplatte pipettiert, woraufhin 200µl WR hinzugefügt wurden und die Platte ungefähr 30 Sekunden vorsichtig geschwenkt wurde. Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurde die Platte auf Raumtemperatur gekühlt und dann im SOFTMAX Elisa Reader ausgemessen.

2.2.4. SDS-Page

Um Proteine in Zelllysaten aufzutrennen, wurden die Lysate auf ein Gel aufgetragen und mittels eines elektrischen Feldes voneinander getrennt.

4% - Sammelgel (5ml Gesamtvolumen für 2 Gele 1mm)

3,75 ml	1M Tris-HCL pH 8,8
3,3 ml	30% Acrylamid
2,2 ml	H ₂ O
574 µl	Glycerol
100 µl	10% SDS
50 µl	10% APS
10 µl	Temed

10% - Trenngel (10ml Gesamtvolumen für 2 Gele 1mm)

3,65 ml	H ₂ O
650 µl	30% Acrylamid
625 µl	1M Tris-HCL pH 6,8
50 µl	10% SDS
25 µl	10% APS
5 µl	Temed

2.2.5. Westernblot

Durch das Westernblotten werden die Proteine von dem SDS-Gel auf die Trägermembran übertragen.

Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und das Trenngel wurde dann in Transferpuffer inkubiert. Dann wurden die benötigten Materialien vorbereitet. Die PVDF-Membran (6cm*8,5cm) wurde durch Inkubation in Methanol für 3 Minuten aktiviert. Anschließend wurde die Membran gemeinsam mit 6 Whatman-Papieren (7cm*9cm) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in den Transferpuffer gelegt. Dann wurden die Whatman-Papiere, die SDS-Page und die Membran wie in Fig. XX gezeigt angeordnet und eine Stunde lang bei 25V geblottet.

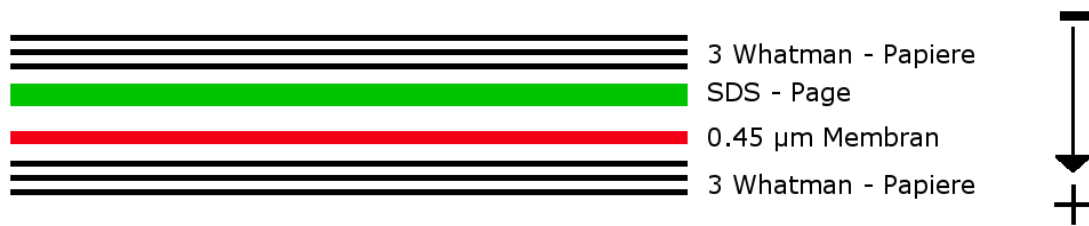


Abbildung 7 Western Blot Schema

Danach wurde mit Ponceau-Rot kontrolliert, ob sich Proteine auf der Membran befinden. Die Membran wurde für ca. 2 Minuten in Ponceau- Rot Lösung (1:5 in Wasser) gelegt und mit Wasser wieder entfärbt und in Blockpuffer überführt.

2.2.6. Coomassie-Färbung

Die SDS-Page wurde nach dem Westernblot für eine Stunde bei Raumtemperatur in Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt und danach entfärbt. Dadurch konnte man restliches Protein auf dem Gel erkennen. Anschließend wurde das Gel unter Vakuum getrocknet.



Abbildung 8 Beispiel eines Coomassie-gefärbtem und getrocknetem Gel

2.2.7. Blocken

Die Membran wird eine Stunde bei Raumtemperatur in 10% Magermilchpulver in 1xTBS, 0,05% Tween, 5mM Ca²⁺ inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken.

2.2.8. Antikörper Färbung

Nach dem Blocken wurde die Membran in die Antikörper Lösung (mit 5% Magermilchpulver in 1xTBS, 0,05% Tween, 5mM Ca²⁺ und dem Antikörper 1A4 5µg/ml) überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in dem Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (gt anti Rat 1:2000 in 5% Magermilchpulver in 1xTBS, 0,05% Tween, 5mM Ca²⁺) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Membran wieder dreimal im Waschpuffer gewaschen.

2.2.9. Antigen-Detektion

Zum Detektieren wurde das Substrat von NOWA verwendet. Die Lösungen A und B wurden 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und für fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde in den Detektor Image Quant geben und analysiert.

2.2.10. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, im weiteren Verlauf auch FACS genannt (= fluorescence activated cell separation), erlaubt eine große Anzahl von Zellen aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften, wie z.B. Größe, Struktur oder auch Färbung, zu unterscheiden. Die Zellen befinden sich in einem Reagenzglas und werden mittels eines Flüssigkeitsstrahls durch einen Mikrokanal, und somit einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Hierbei entstehen verschiedene Signale wie z.B. Streulicht oder Fluoreszenzsignale, die von verschiedenen Detektoren ermittelt werden.

Bei ungefärbten Zellen kann man zwei verschiedene Eigenschaften voneinander trennen: Größe und Granularität, die mittels des Vorwärtsstreulicht („forward scatter“ FSC) und dem Seitwärtsstreulicht („side scatter“ SSC) detektiert werden können. Dadurch können bereits Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Zelle geschlossen werden.

Möchte man spezifischere Rückschlüsse auf die Zellsubtypen schließen, kann man fluoreszenz-markierte Oberflächenantikörper (der „cluster of differentiation“ CD Klasse) verwenden oder Farbstoffe (z.B. CFSE = Carboxyfluorescein succinimidyl ester) die irreversibel an Zellproteine haften. Enthält ein FACS-Gerät verschiedene Laser kann man unterschiedliche Farbstoffe kombinieren und so die Informationsdichte erhöhen.

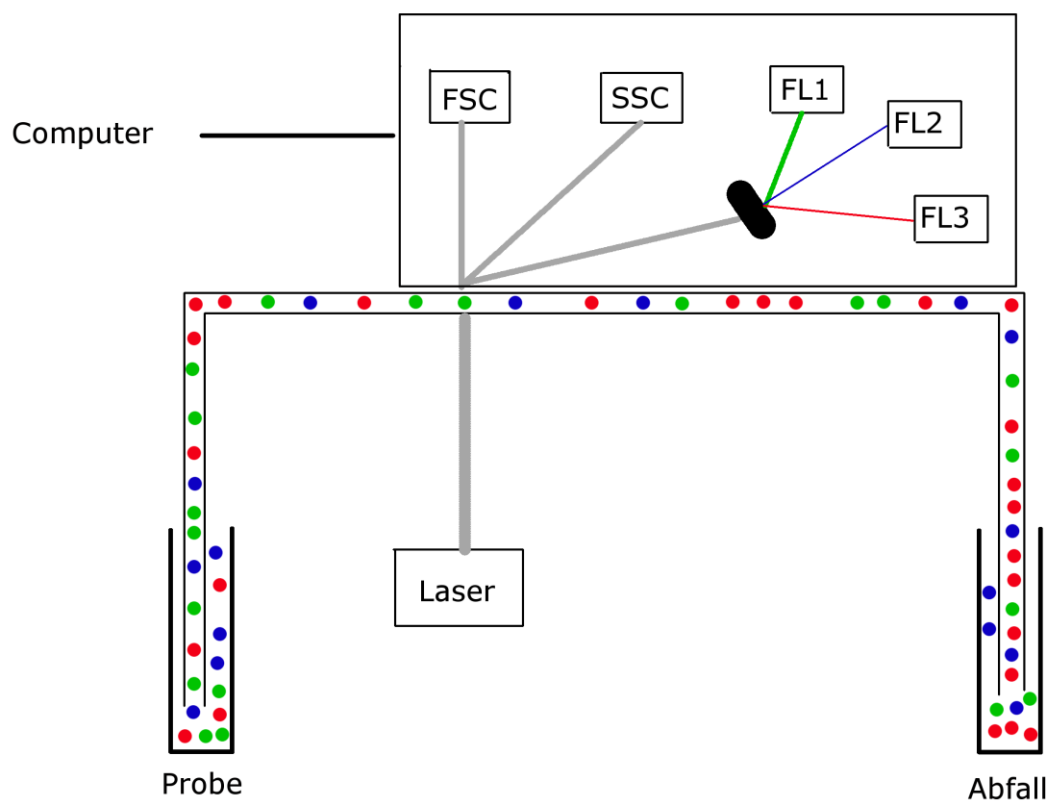


Abbildung 9 Schema eines Durchflusszytometers

2.2.10.1. FACS-Oberflächenfärbung

Um die Zelloberflächen zu färben, wurde zuerst eine Zellsuspension mit ca. $0,5 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^6$ Zellen/ml (s. 2.2.16. – 2.2.18.) mit den zu untersuchenden Zellen hergestellt. 1ml dieser Suspension wurde in FACS-Tubes mit 1ml FACS-Puffer überführt. Die Tubes wurden dann bei 300g und 4°C für 5 Minuten gefügt. Der Überstand wurde verworfen, 1ml FACS-Puffer hinzugegeben, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dann wurden die Zellen für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis mit $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ des Fc-Block inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 1ml Puffer gewaschen und bei 300g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit einem Mastermix der benötigten Oberflächenmarker für 20 Minuten im Dunkel auf Eis inkubiert. Manche Antikörper benötigen einen sekundären Antikörper und andere nicht, daher kam hier optional noch ein Zwischenschritt mit Inkubation, Waschen und Fugen mit dem sekundären Antikörper hinzu. Die Zellen wurden nun wieder mit 1ml Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Schluss wurden 400µl des Puffers hinzugegeben und die Zellen gemessen.

2.2.10.2. FACS intrazelluläre Färbung mittels CFSE

Der Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ist ein intrazellulärer Farbstoff, der in der Lage ist passiv durch die Zellmembran zu diffundieren. Innerhalb der Zelle wird durch Esterasen die Acetat-Gruppe abgespalten und somit zum fluoreszieren gebracht. Zusätzlich kann CFSE mittel seiner Succinimidyl-Gruppe eine stabile Verbindung mit intrazellulären Molekülen eingehen. Somit kann man einerseits Zellteilungen nachweisen, da der vorhandene Farbstoff gleichmäßig an Tochterzellen weitergegeben wird. Andererseits kann er zum Nachweis einer Phagozytose wie in dieser Arbeit verwendet werden, da der Farbstoff nach der Phagozytose auch innerhalb der Phagozyten gefunden werden kann.

2.2.10.3. FACS-Analyse mit FITC-Beads

FITC-Beads sind kleine ca. 1µm große Partikel, die mit FL1 detektiert werden können. Die Beads wurden in dieser Arbeit als Stellvertreter für die Bakterien in der Trojanischen-Pferd Theorie verwendet. Wurden in einem Phagozytoseansatz FITC-Beads verwendet, wurden die Phagozyten vor der FACS-Analyse gewaschen, um mögliche Beads im Medium zu entfernen und die Zellen wurden kurz vor der Analyse „gequencht“. Dies bedeutet, dass zu dem FACS-Tube mit der gefärbten Zellsuspension 1:1 0,2% Trypanblau Lösung hinzugegeben wurde. Trypanblau ist nicht zellgängig, kann aber das Signal der FITC-Beads unterdrücken, sodass nur die FITC-Beads fluoreszieren, die in den Zellen sind, jedoch nicht die, die außen an den Zellen anhaften. Damit ist gesichert, dass nur die Phagozytoserate gemessen wurde.

2.2.11. Cytospin

Bei der Cytospinanalyse wurden Zellen mittels Zentrifuge auf einen Objektträger gebracht. Die zu analysierende Zellsuspension wurde auf $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt, 100 µl in die Kammer gegeben und bei 600 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Nach der Lufttrocknung wurden diese Zellen mittels „Diff Quik“, einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung, gefärbt und dann unter einen Mikroskop analysiert und fotografiert.

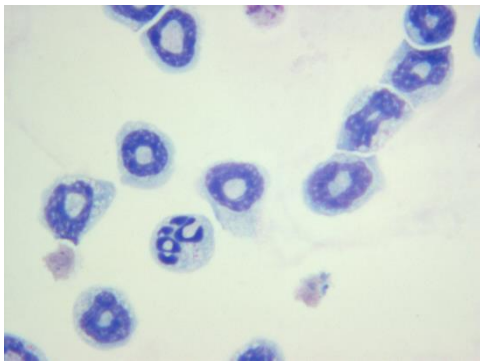


Abbildung 10 Cytospin von d5- HoxB8

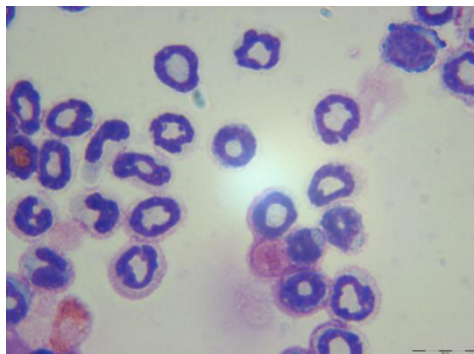


Abbildung 11 Cytospin von bm-PMN

2.2.12. Primäre Zellen

2.2.12.1. PEC (peritoneal exudat cells)

Den Mäusen wurde 1ml steriles PBS intraperitoneal injiziert und nach 12-16h wurden diese Mäuse mit Äther betäubt und durch Genickbruch getötet. Das Fell wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und nach einem kleinen Hautschnitt wurde das Fell am Bauch aufgezogen. Wenn die Peritonealhöhle frei von Blutungen war, wurden je Maus 10ml eiskaltes RPMI-Medium (mit 10% FCS) durch das Fettgewebe in die Peritonealhöhle injiziert. Danach wurde unter dem Brustbein eingestochen und das Medium wieder abgezogen und in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden bei 300g für 10min bei 4°C abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Mit der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt. Dabei wurde auf eine mögliche Kontamination durch Erythrozyten geachtet. Danach wurden die Zellen auf die benötigte Konzentration eingestellt und in die Wells einer 24-well Platte ausgesät. Bevor die Zellen weiter verwendet wurden, wurden sie für 1-2h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Cytospin-Analyse verwendet.

2.2.12.2. BMDM (bone-marrow-derived-macrophages)

Die Mäuse wurden mit Äther betäubt und durch Genickbruch getötet. Das Fell wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und Femur und Tibia frei präpariert. Die Knochen wurden für 2min in 70% Ethanol inkubiert und darauf mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Epiphysenfugen wurden geöffnet und das gesamte Knochenmark mit 10ml eiskaltem, sterilem PBS in ein auf Eis stehendes 50ml Falconröhrchen gespült. Die Zellen im PBS durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendieren bis eine gleichmässige Zellsuspension entsteht. Diese Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb 40µm filtriert und danach bei 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und mit Türk's-Lösung gezählt. $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 20ml RPMI-Medium (mit 10% FCS, 1%Pen/Strep, 2mM Glutamin, 50µM β -MeETOH, 10% M-CSF Überstand) in bakteriologischen square plastic plates (Bibby Sterilin) ausgesät. Am fünften Tag wurden die square plates auf Eis gestellt mit eiskaltem PBS für 2-3min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde bei 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen, gezählt und $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in wells ausgesät. Am Tag sechs wurden die Zellen weiter verwendet.

2.2.12.3. bm-PMN

Das Knochenmark wurde wie bei den BMDM ausgespült, zweimal mit Medium gewaschen, bei 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert und in 3ml Medium pro Maus aufgenommen. In der Zwischenzeit wurde pro Maus ein Ficoll-Gradient vorbereitet. 3ml 1.119 Ficoll wurde in ein 15ml Falconröhrchen pipettiert, darauf wurden vorsichtig 3ml 1.077 Ficoll geschichtet, darauf dann die 3ml Zellsuspension. Die Falconröhrchen wurden vorsichtig bei 700g für 30min bei 4°C mit der Einstellung Beschleunigung 0 und Bremse 0 zentrifugiert. Danach konnte man zwei Zelllayer erkennen. Das obere Zelllayer wurde verworfen und das untere Layer aufgenommen und bei mehreren Gradienten gepoolt. Die Zellsuspension wurde zweimal mit RPMI-Medium (mit 10% FCS) gewaschen und bei 400g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Nach erneuter Aufnahme in Medium wurden die Zellen gezählt und die

benötigte Konzentration eingestellt und weiter verwendet. Ein kleiner Teil wurde jeweils für die FACS- und Cytospin-Analyse verwendet.

2.2.13. UV-induzierte Apoptose

Zur Apoptoseinduktion wurden $5 \cdot 10^6$ CFSE-markierte Zellen in 5ml RPMI-Medium (mit 10% FCS und P/S) in eine 60mm Schale gegeben und ohne Deckel unter der Sterilbank für jeweils 5 Minuten bestrahlt. Dies entspricht einer UV Dosis von 18 kJ. Danach wurden die Zellen gut resuspendiert und in der benötigten Menge zur Phagozytose hinzugegeben.

2.2.14. hitzeinduzierte Nekrose

Für die Nekroseinduktion wurden $1 \cdot 10^6$ /ml CFSE-gefärbte Zellen in RPMI-Medium (mit 10%FCS und P/S) in der benötigten Menge in ein 15ml Falconröhrchen überführt und für 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gut resuspendiert und in der benötigten Menge zur Phagozytose hinzugegeben.

2.2.15. Mausserum

Das Mausserum stammt aus eigener Herstellung durch Bluten von C57BL/6 Mäusen und wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.16. Phagozytose von FITC-markierten Beads

2.2.16.1. durch HoxB8

Die Neutrophilen wurden wie oben beschrieben generiert und am Tag fünf nach dem Estradiolentzug verwendet. Die Zellen wurden aufgenommen, einmal mit Medium (OPTIMEM) gewaschen und bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden sie in frischem Medium resuspendiert und mit der Neubauzählkammer gezählt. Danach erneut zentrifugiert und in verschiedenen Medien (siehe einzelne Beschreibung) aufgenommen

und zu 1 Mio. Zellen/ml die Wells einer 24er-Platte ausgesät. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 1µl/ml FITC-markierte Beads hinzugefügt. Die Kontrollen wurden bei 4°C die Phagozytose bei 37°C für 2h inkubiert und anschließend für die FACS-Messung gefärbt. Die Versuche wurden nur bei unauffälligen Kontrollen ausgewertet und verwendet.

2.2.16.2. durch PEC

Die PEC wurden wie oben beschrieben generiert und nach der 1-2 stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden sie im Lichtmikroskop betrachtet um zu sehen, ob die Macrophagen bereits adhären waren. Konnte die Adhärenz mikroskopisch bestätigt werden, wurden die Zellen mit 0,5 µl, 1 µl und 2 µl Beads pro ml Medium jeweils in 3 Ansätzen und Kontrollen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die PEC geschwenkt, das alte Medium abgesaugt und einmal mit frischem Medium gewaschen, um noch frei schwimmende Beads zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig mit einem Schaber von den Platten gelöst, zentrifugiert und für die FACS-Färbung vorbereitet.

2.2.17. Phagozytose von CFSE-markierten apoptotischen/nekrotischen COS-Zellen

2.2.17.1. durch BMDM

Die BMDM wurden wie oben beschrieben hergestellt. Um die COS-Zellen mit CFSE zu markieren, wurden die Zellen in ihren Flaschen einmal mit sterilem PBS gewaschen und dann in PBS mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden gut resuspendiert und noch einmal mit sterilem PBS gewaschen und bei 300g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Trypan-Blau 0,2% gezählt, in $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Danach wurde 1µM CFSE hinzugefügt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit kaltem, sterilem PBS gewaschen und in entsprechender Menge Medium (RPML, 10%FCS, P/S) für die Konzentration $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Die CFSE-markierten COS-Zellen wurden wie oben beschrieben mit UV oder Hitze behandelt und dann zur Phagozytose hinzugefügt. Die Kontrollen wurden bei 4°C und die Phagozytose-Platte wurde bei 37°C für 4h inkubiert.

2.2.17.2. durch PEC

Die PEC wurden wie oben beschrieben generiert und nach der 1-2 stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden sie im Lichtmikroskop betrachtet um zu sehen, ob die Makrophagen bereits adhären waren. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt, um nicht adhären Zellen, die die Phagozytose stören würden, zu entfernen. Die CFSE-markierten COS-Zellen wurden wie oben beschrieben mit UV oder Hitze behandelt und dann in frischem RPMI-Medium (+10% FCS, P/S) in der benötigten Konzentration hinzugegeben. Die Kontrollen wurden bei 4°C und die Phagozytose bei 37°C im Inkubator für 2h inkubiert.

2.2.18. Stimulation von HoxB8 Zellen

Es wurde gezeigt, dass HoxB8 Zellen, die mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden, eine deutlich höhere Expression von Ficolin-B aufweisen und dass mit PMA stimulierte Granulozyten NETs bilden (Hunold, 2011). Die HoxB8-Zellen wurden soweit nicht anders beschrieben mit 15ng/ml PMA während der Phagozytose stimuliert. Andere Dosierungen oder Stimulationszeiträume sind bei den jeweiligen Versuchen beschrieben.

2.2.19. Phagozytose von HoxB8 durch PEC

Die HoxB8 wurden wie oben beschrieben generiert (abweichendes s.u. bei den einzelnen Beschreibungen). Um die HoxB8-Zellen mit CFSE zu markieren, wurden die Zellen in ihren Flaschen einmal mit sterilem PBS gewaschen und dann in PBS mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden gut resuspendiert und noch einmal mit sterilem PBS gewaschen und bei 300 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Trypan-Blau 0,2% gezählt, in $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Danach wurde 1µM CFSE hinzugefügt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen wie in den jeweiligen Abschnitten beschrieben in die Wells verteilt und mit PMA und/oder Ionomycin stimuliert, um zu sehen, ob die höhere Expression von Ficolin-B einen Einfluss auf die Phagozytose hat. Daraufhin wurden die generierten PEC zu den stimulierten HoxB8-Zellen hinzugegeben, um die gebildeten Netz-Strukturen der HoxB8-

Zellen nicht zu zerstören. Die Kontrollen wurden bei 4°C und die Phagozytose-Platte wurde bei 37°C für 4h inkubiert.

2.2.20. Statistik

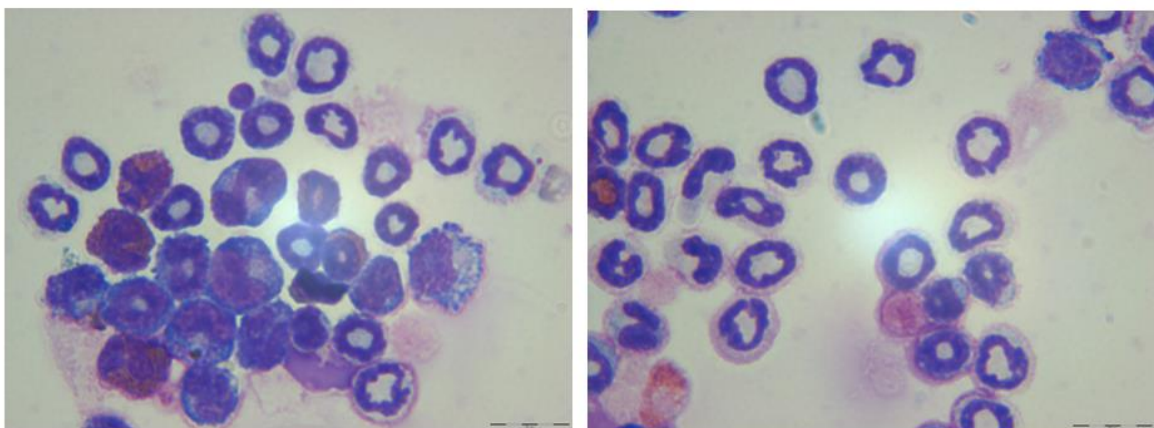
In den dargestellten Grafiken zeigen die Balken die Standardabweichung der Daten an. Soweit nicht anders angegeben wurden jeweils 3 Replikate pro Ansatz verwendet. Die Sternchen in den Grafiken geben die jeweilige Signifikanz der Daten an, welche mit dem Student's-T-Test mit Graph Pad Prism durchgeführt wurde. Werte mit $p < 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert und mit „*“ markiert, Werte mit $p < 0,001$ wurden mit „**“ und Werte mit $p < 0,0001$ wurden mit „***“ markiert.

3. Ergebnisse

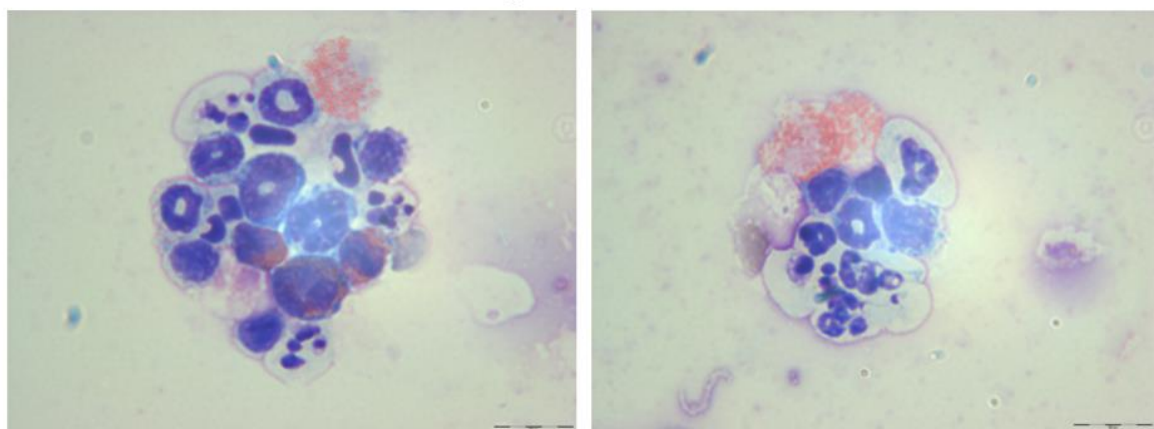
3.1. Apoptose und Nekrose in bm-PMN

Zuerst musste ausgeschlossen werden, dass bereits die CFSE-Färbung zur Apoptose führt. Hierzu wurden frische bm-PMN mit CFSE gefärbt und nach 4 Stunden mittels Cytospin und FACS analysiert. Der Zeitraum von 4 Stunden wurde gewählt, da die maximale Phagozytosezeit in dieser Arbeit 4 Stunden betrug.

Im Cytospin (s. Abbildung 12) zeigten sich nach 4 Stunden keine Anzeichen einer Apoptose, da die Apoptose nach einer gewissen Zeit von selber einsetzt, wurden die Zellen nach 25 Stunden noch einmal untersucht. Hier zeigten sich deutliche Anzeichen aller Apoptosestufen.



bm-PMN 4h nach CFSE-Färbung



bm-PMN 25h nach CFSE-Färbung

Abbildung 12 bm-PMN nach CFSE-Färbung

Um nachzuprüfen, ob die UV-Bestrahlung eine Apoptose bei den Granulozyten auslöst, wurde ebenfalls von bm-PMN nach dem CFSE-färben und der UV-Bestrahlung nach 4 Stunden eine Cytospin Analyse ausgeführt.

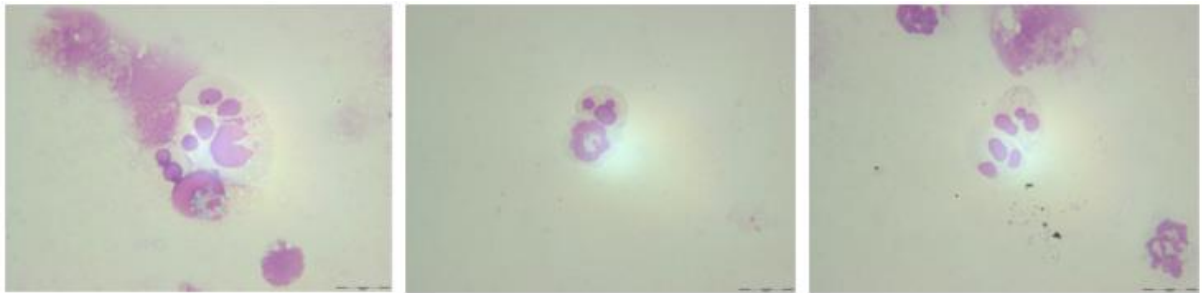


Abbildung 13 bm-PMN 4h nach 18kJ UV-Bestrahlung

Auf der Abbildung 13 kann man deutlich die apoptotischen Zellen erkennen. Somit ist gezeigt, dass die Zellen in unseren Versuchen deutlich apoptotisch waren.

Um zu prüfen, ob nach 4 Stunden die hitzebehandelten Zellen nekrotisch geworden sind, wurde auch hier nach CFSE-Färbung und Hitzebehandlung eine Cytospinanalyse durchgeführt.



Abbildung 14 bm-PMN 4h nach 30min 56°C

In Abbildung 14 kann man deutlich die nekrotischen Zellen erkennen. Die Zellmembranen sind völlig instabil, die Zellen zerplatzt und zerlaufen. Somit ist gezeigt, dass sich die Zellen nach 4 Stunden und somit auch in den Versuchen dieser Arbeit in Nekrose befanden.

3.2. Kontrolle für FcnB in COS-Zellen

Die COS-Zellen sind immortalisierte Fibroblasten und enthalten oder produzieren daher normalerweise kein Ficolin-B. Um jedoch jegliche Verunreinigung oder Kreuzkontamination auszuschließen, wurden sowohl das Medium in dem die COS-Zellen 5 Tage kultiviert waren, als auch die Zelllysate mittels Westernblot analysiert. Das gesammelte Medium wurde zentrifugiert und von dem Überstand 5µl auf das Gel aufgetragen (s. Abbildung 15, Zeile 2). Von den Zelllysaten wurden 30µg und 50µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen (s. Abbildung 15, Zeile 3 und 4). Als Positivkontrolle wurden das rekombinante Ficolin-B (s. Abbildung 15, Zeile 1) und Zelllysate von HoxB8 Zellen Tag 5 ebenfalls mit 30 µg und 50 µg Gesamtprotein (s. Abbildung 15, 5 und 6) verwendet.



Abbildung 15 Westernblot Zelllysate COS-Zellen, HoxB8 und rekombinantes Ficolin-B

1. Rekombinantes Ficolin-B 0,3µg 2. Überstand v. COS-Zellen 5µl Protein 3. Zelllysate COS-Zelle 30µg Protein 4. Zelllysate COS-Zelle 50µg 5. Zelllysate HoxB8 (Tag 5) 30µg 6. Zelllysate HoxB8 (Tag 5) 50µg Protein

Man kann deutlich das Signal in Zeile 1 erkennen, hierbei handelt es sich um das rekombinante Ficolin-B. In Zeile 5 und 6 kann man ebenfalls zwei deutliche Signale erkennen, die sich auf derselben Höhe befinden wie das rekombinante Ficolin-B in Zeile 1. In den Zeilen 2, 3 und 4 kann man kein Signal erkennen. Daraus kann man schließen, dass die COS-Zellen weder Ficolin-B in das Medium sezernieren, noch dass die COS-Zellen Ficolin-B enthalten. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass sich in den verwendeten HoxB8-Zellen das Ficolin-B befindet.

3.3. PEC-Phagozytose von FITC-Beads

Um ein Phagozytose Assay zu entwickeln musste zuerst geprüft werden, ob PEC überhaupt phagozytieren und welche Phagozytosezeit sinnvoll ist.

Hierfür wurden in 12 wells einer 24-well Platte jeweils $0,5 \cdot 10^6$ PECs in 1ml ausgesät. In jeweils 3 wells wurden entweder 0,5 μ l, 1 μ l oder 2 μ l FITC-Beads hinzugefügt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeschabt, resuspendiert und mittels FACS und Cytospin analysiert.

In Abbildung 16 kann man deutlich erkennen, dass in Abhängigkeit der Menge der FITC-Beads die Phagozytoserate deutlich steigt. Dadurch wurde gezeigt, dass die PEC innerhalb von 2 Stunden eine gute Phagozytoserate aufweisen und basierend auf diesem Experiment wurde in den folgenden Experimenten die Phagozytosezeit bei PEC von 2 Stunden gewählt, um eine optimale Phagozytoserate zu gewährleisten. Diese muss signifikant hoch sein, darf aber noch nicht gesättigt sein, damit fördernde Effekte noch untersucht werden können.

Phagozytose von FITC-Beads durch PEC

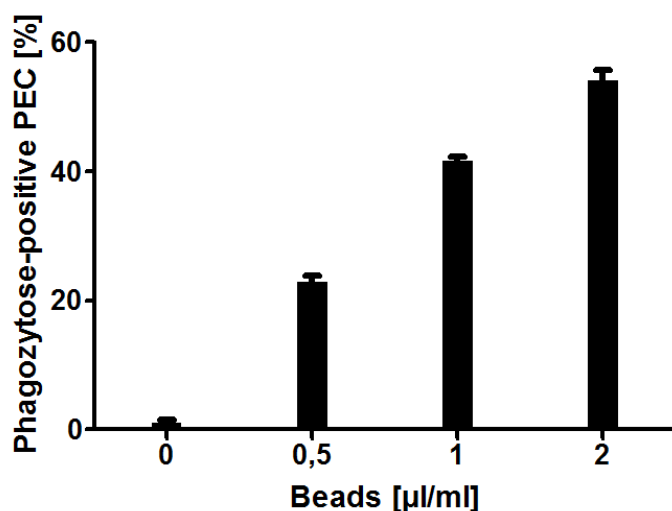


Abbildung 16 Phagozytose von FITC-Beads durch PEC; Phagozytosezeit 2h, 0,5 Mio. PEC in 1ml in 24-well Platte

Der Cytospin in Abbildung 17 zeigt einen Makrophagen, der für 2 Stunden bei 37°C mit 1 μ l/ml Beads inkubiert wurde. Man kann deutlich die Beads innerhalb der Vakuolen des Makrophagen erkennen, wodurch die Phagozytose ebenfalls gezeigt werden konnte.

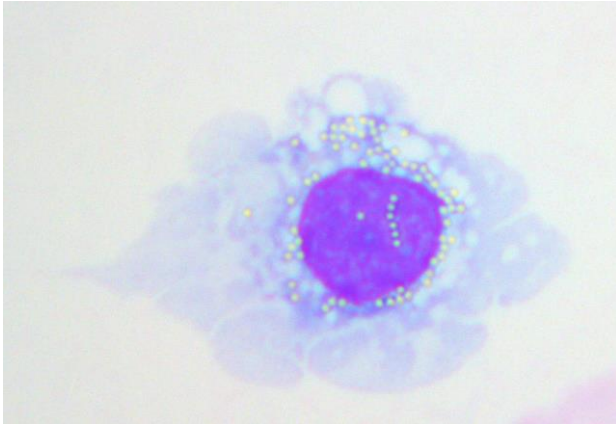


Abbildung 17 Cytospin: Phagozytose von FITC-Beads durch PEC

3.4. HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads

Um später die Trojanische-Pferd-Theorie zu überprüfen, muss zuerst geprüft werden, ob die Granulozyten überhaupt phagozytieren.

Der Versuch wurde wie oben beschrieben in dreifacher Ausführung pro Ansatz durchgeführt und die Eiskontrollen waren unauffällig und zeigten keine Phagozytose.

Während einer Infektion mit Bakterien stoßen diese auch bakterielle Endotoxine aus. Da die Beads hier die Bakterien in der Trojanischen-Pferd-Theorie darstellen, wurde das Experiment mit und ohne LPS durchgeführt, um die Stimulation der Granulozyten durch Endotoxine zu simulieren. Wie in Abbildung 18 deutlich zu erkennen ist, phagozytieren die HoxB8 bereits ohne Stimulation durch LPS. Unter Anwesenheit von 100 ng/ml LPS im Medium lässt sich die Phagozytoserate signifikant steigern.

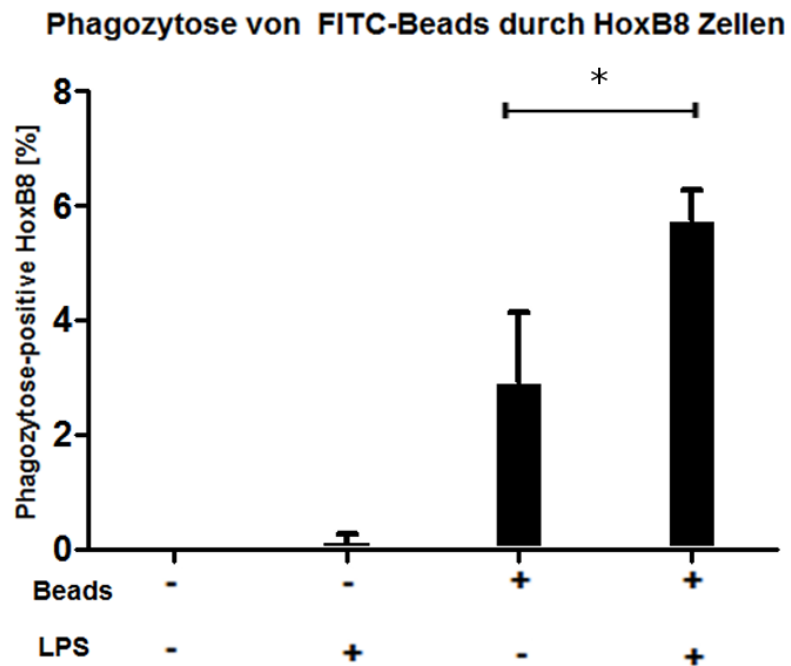


Abbildung 18 Phagozytose von FITC-Beads 1 μ l/ml durch 1 Mio. HoxB8 in 1ml in 24-well Platte

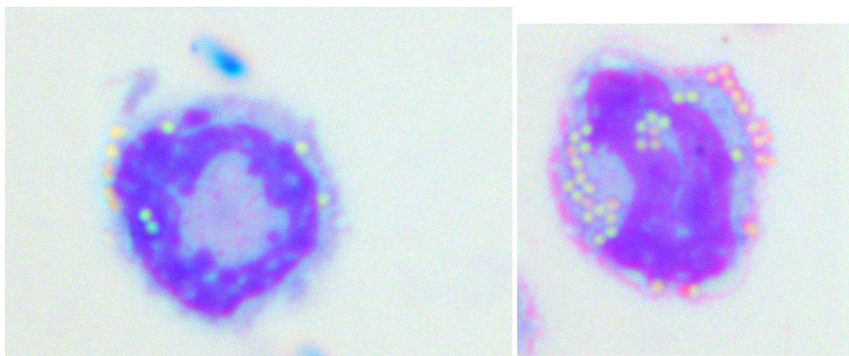


Abbildung 19 Cytospin Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8

Dieses Experiment zeigt, dass Granulozyten generell phagozytieren. Um die Phagozytoserate noch etwas zu steigern wurde überlegt, welche Faktoren die Phagozytose in vivo positiv beeinflussen. Da in vivo die Phagozytose durch verschiedene Faktoren im Serum des Organismus beeinflusst wird, wurde das Experiment mit verschiedenen Seren im Medium wiederholt.

3.4.1. HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads in verschiedenen Seren

Wie bereits beschrieben, sind nicht nur zelluläre Komponenten des Immunsystems an der Verteidigung einer Infektion beteiligt, sondern auch humorale Komponenten (Janeway, 2009). Ficoline sind Bestandteile des Komplementsystems und können dieses durch den Lektin-Weg aktivieren (Thielens et al. 2007)(Endo et al. 2011). Im Lektin-Weg sind jedoch noch andere Proteine beteiligt, sodass überlegt wurde, ob diese benötigt werden, damit Ficolin-B einen Einfluss auf die Phagozytose haben kann. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Ficoline und somit auch humanes M-Ficolin und Ratten-Ficolin-B mit ihrer Kollagen-ähnlichen-Domäne und dem Schlüsselenzymen MASP das Komplementsystem aktivieren können. Kürzlich wurde von Endo et al. 2012 gezeigt, dass Maus Ficolin-B als aktivierendes Molekül für den Lektin-Weg funktioniert. Um auszuschließen, dass die fehlenden Komponenten des Komplementsystems in den Experimenten dieser Arbeit der Grund sind, warum Ficolin-B nicht zu einer signifikanten Phagozytosesteigerung führt, wurden verschiedene Tierseren im Medium getestet. Als Tierseren wurden das übliche FCS und Mausserum ausgewählt. FCS wurde überprüft, da es in Zellkulturen immer wieder zum Schutz der Zellen eingesetzt wird. Mausserum wurde ausgewählt, da in den Testmodellen mit Mauszellen gearbeitet wird und das Phagozytosemodell möglichst nah an der Realität aufgebaut werden sollte. Ein Ansatz erfolgt mit dem üblichen 10% FCS („fetal calf serum“), ein weiterer Ansatz erfolgte in 3% Mausserum (MS) und der dritte Ansatz erfolgte in 3% hitzeinaktiviertem Mausserum (hMS).

Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen

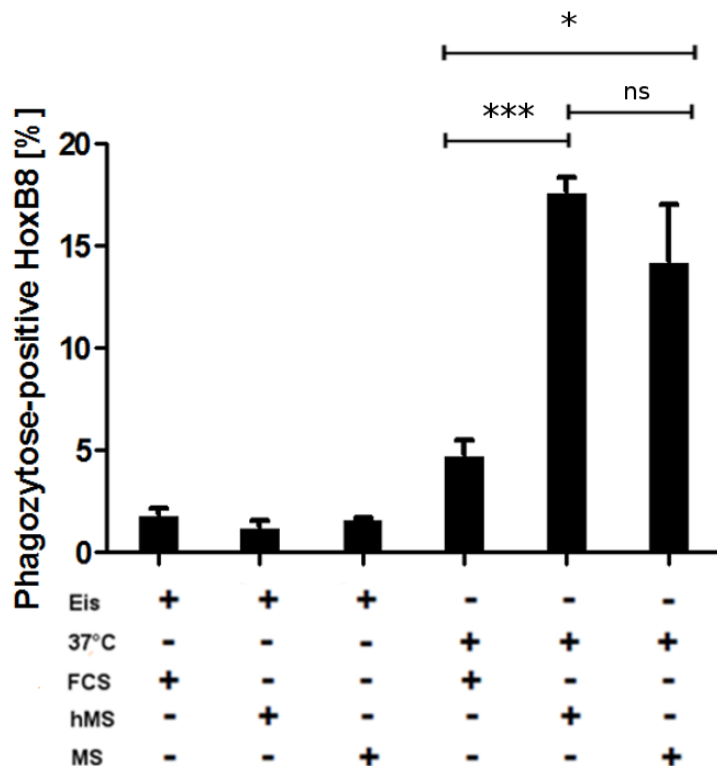


Abbildung 20 Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen; Phagozytosezeit 2h, 1 Mio. HoxB8-Zellen in 1ml in 24-well Platte und 1µl/ml FITC-Beads; 3% hitzeinaktiviertes Mausserum (hMS), 3% Mausserum (MS), 10% Fetales Kälberserum (FCS)

Wie in Abbildung 20 deutlich zu sehen ist, steigt die Phagozytoserate in 10% FCS Medium nicht signifikant an. Im Gegensatz zu der Phagozytose, welche im Mausserum stattgefunden hat. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen hitzeinaktiviertem Mausserum und unbehandeltem Mausserum, daher wurde das hitzeinaktivierte Mausserum für weitere Experimente gewählt.

Dieser fehlende Anstieg der Phagozytose unter Anwesenheit von FCS konnte auch von einer anderen Gruppe beobachtet werden (Schorn et al. 2010). Ein ähnlicher Versuch mit aktivem und hitze-inaktivem Serum und der Phagozytoserate von Neutrophilen führte die Gruppe um Laufs et al. 2002 durch und zeigte anhand von Leishmanien, dass die initiale Phagozytoserate sinkt, sie sich jedoch bei Verlängerung der Phagozytosezeit wieder angleicht. Es wird vermutet, dass zwar die hitze-labilen Faktoren des Komplementsystems und damit die schnelle Phagozytose in der ersten Stunde beeinflusst wird, sich diese aber nach einiger Zeit durch die hitze-stabilen wieder angleichen (Laufs et al 2002). Da sich in dieser Arbeit nach 2

Stunden Phagozytosezeit kein signifikanter Unterschied zwischen MS und hMS zeigte, wurde für die folgenden Experimente 3% hitzeinaktiviertes Mausserum verwendet, um sicherzugehen, dass - wenn das Ficolin-B als Opsonin die hitze-stabilen Faktoren des Komplementsystems für die Beeinflussung der Phagozytose benötigt - diese auch anwesend sind.

3.4.2. HoxB8-Phagozytose von FITC-Beads in hMS in Abhängigkeit von Ficolin-B

Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass PMA zur Stimulation von HoxB8 Zellen führt (Hunold, 2011). In Abbildung 18 wurde gezeigt, dass auch LPS die Phagozytoserate deutlich steigern kann. Im Folgenden wurde nun überprüft, ob sich die Phagozytoserate bei stimulierten HoxB8 durch hitzeinaktiviertes Mausserum erneut steigern lässt. Außerdem wurde getestet, ob die Anwesenheit von Ficolin-B eine Auswirkung auf die Phagozytoserate hat.

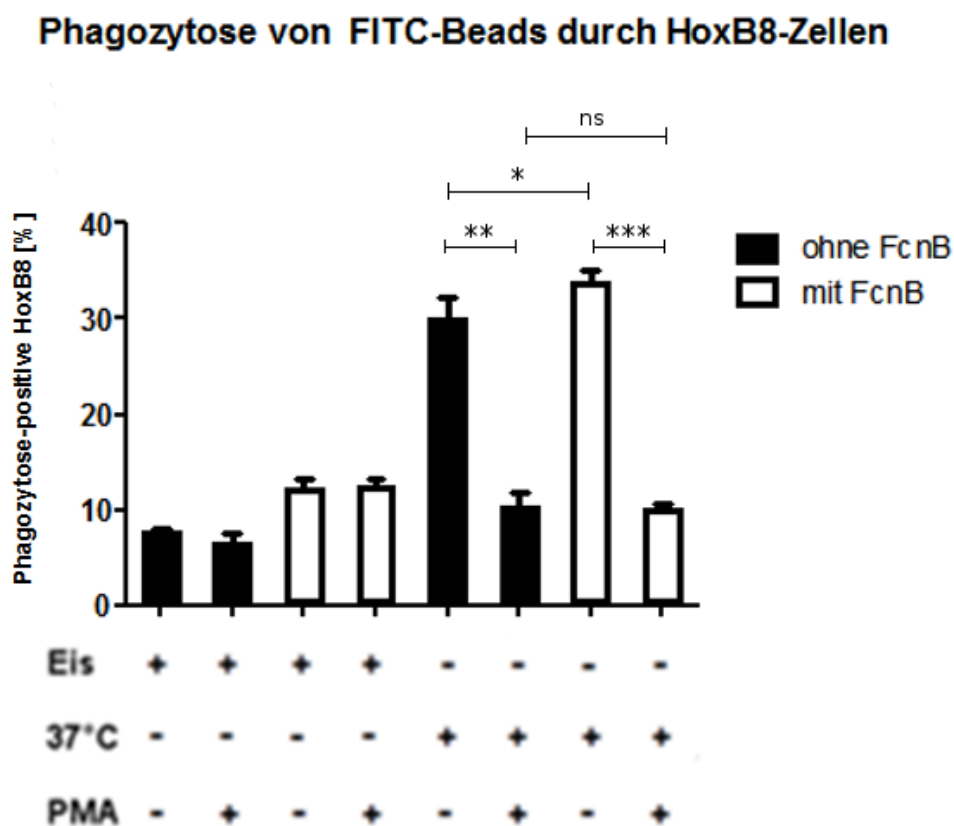


Abbildung 21 Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen; Phagozytosezeit 2h, 0,5 Mio. HoxB8-Zellen in 0,5ml in 24-well Platte und 1µl/ml FITC-Beads; Stimulation mit 100nM PMA

In Abbildung 21 ist die Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen in Anwesenheit von 3% hitzeinaktiviertem Mausserum im Medium dargestellt. Die HoxB8-Zellen für den Ansatz mit PMA wurden eine Stunde vor Phagozytosebeginn mit 100 nM PMA inkubiert und es blieb während der gesamten Phagozytose im Medium. Dadurch ergibt sich eine PMA-Stimulationszeit von insgesamt 3 Stunden. Außerdem wurde geprüft, ob 20 µg/ml Ficolin-B im Medium zu einer Verbesserung der Phagozytose führt. Zur Kontrolle wurde das Ficolin-B auch bei HoxB8-Zellen hinzugefügt, welche nicht mit PMA vorstimuliert waren oder während der Phagozytose stimuliert wurden. Man kann in Abbildung 21 deutlich die gute Phagozytoserate bei nicht stimulierten HoxB8-Zellen erkennen. Ebenfalls kann man erkennen, dass die stimulierten HoxB8-Zellen nicht mehr phagozytieren. In Abbildung 21 kann man eine signifikante Steigerung mit Ficolin-B im Medium der unstimulierten HoxB8-Zellen gegenüber dem Medium ohne Ficolin-B erkennen.

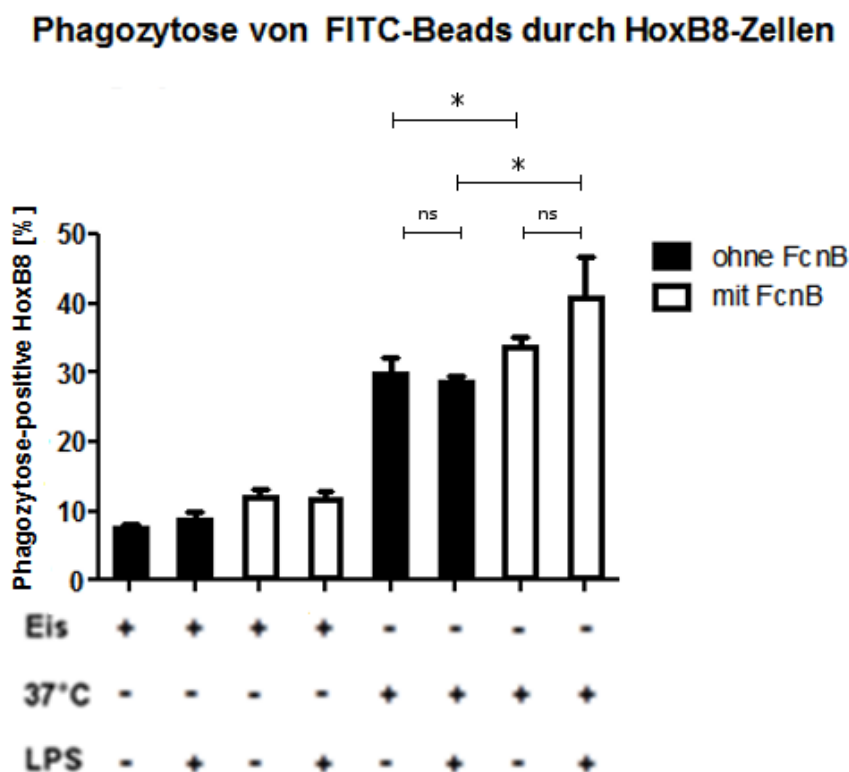


Abbildung 22 Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen; Phagozytosezeit 2h, 0,5 Mio. HoxB8-Zellen in 0,5ml in 24-well Platte und 1µl/ml FITC-Beads; Stimulation mit 100ng/ml LPS

Abbildung 22 zeigt die Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen in Medium mit 3% hitzeinaktiviertem Mausserum. Wie im bereits in 3.5. gezeigt, beeinflusst LPS die

Phagozytose positiv. In diesem Experiment wurde kontrolliert, ob die durch LPS stimulierten HoxB8-Zellen in Anwesenheit von 20µg/ml Ficolin-B besser phagozytieren. Man kann erkennen, dass sich nur durch Zugabe von LPS die Phagozytoserate nicht mehr steigern lässt. Die alleinige Zugabe von Ficolin-B ohne LPS zeigt eine signifikante Steigerung der Phagozytoserate. Betrachtet man die stimulierten HoxB8-Zellen lässt sich ebenfalls eine signifikante Steigerung bei Anwesenheit von Ficolin-B zeigen.

3.5. Makrophagen-Phagozytose von toten COS-Zellen

Um die besten Makrophagen für den späteren Phagozytoseansatz mit Granulozyten zu finden, wurden BMDM und PEC getestet.

3.5.1. BMDM-Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen COS-Zellen

Abbildung 23 zeigt die Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen COS-Zellen durch BMDM. Bei diesem Versuch wurden apoptotische, nekrotische und lebende COS-Zellen von BMDM phagozytiert. Man kann deutlich die gegenüber den Eiskontrollen signifikant erhöhte Phagozytose sowohl bei den nekrotischen, apoptotischen als auch lebenden Zellpopulationen erkennen. Die höchste Phagozytoserate erkennt man bei den nekrotischen Zellen. Aufgrund der guten Phagozytoserate innerhalb der 4 Stunden wurde in den folgenden Experimenten mit BMDM dieser Phagozytosezeitraum beibehalten.

Phagozytose von toten Cos-Zellen durch BMDM

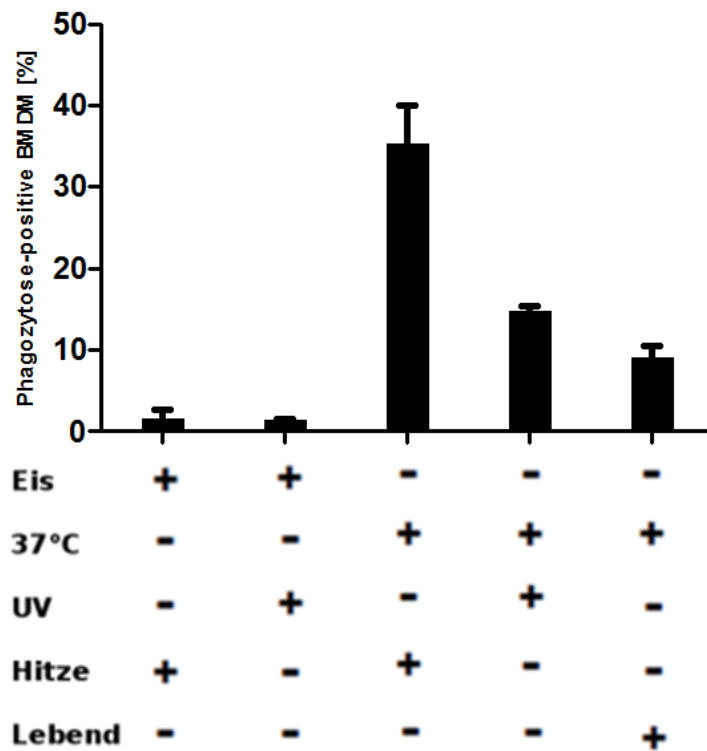


Abbildung 23 Phagozytose von CFSE-gefärbten COS-Zellen durch BMDM, Phagozytosezeit 4 Stunden, UV-Exposition 18kJ, Hitzeexposition 56°C für 30min; 1,5 Mio. BMDM und 1,5 Mio. COS-Zellen in 2ml Medium in einer 12well-Platte

Phagozytose von toten COS-Zellen durch BMDM

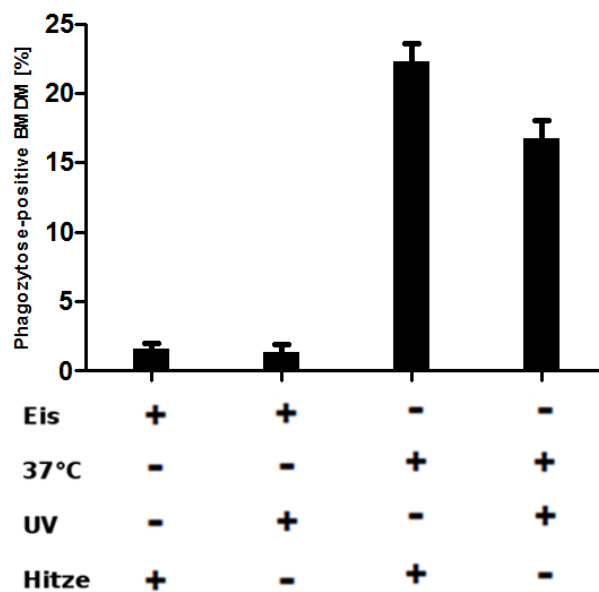


Abbildung 24 Phagozytose von COS-Zellen durch BMDM, Phagozytosezeit 4h, UV-Exposition 18kJ und Hitzeexposition 56°C für 30min; Phagozytoseansatz 0,75 Mio. BMDM und 0,75 Mio. COS-Zellen in 1ml Medium in einer 24well-Platte

In Abbildung 24 wurde der Versuchsansatz von Abbildung 23 in einem kleineren Ansatz wiederholt und die Reproduzierbarkeit getestet. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber den unauffälligen Eiskontrollen und eine geringere Phagozytoserate als in Abbildung 23. Durch die weniger gesättigte Phagozytoserate lassen Einflüsse zum Beispiel durch Ficolin-B deutlicher zeigen und daher wurde für das folgende Experiment der kleinere Ansatz gewählt.

Phagozytose von toten COS-Zellen durch BMDM

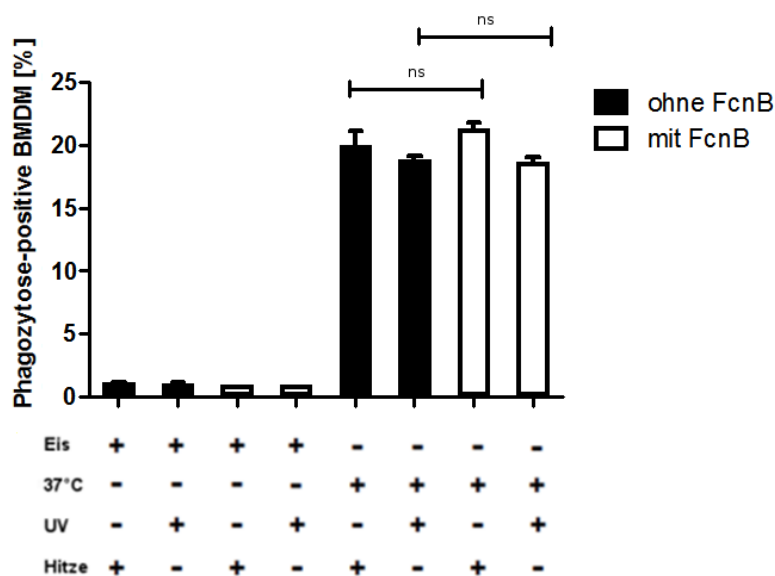


Abbildung 25 Phagozytose von COS-Zellen durch BMDM, Phagozytosezeit 4h, UV-Exposition 18kJ und Hitzeexposition 56°C für 30min; Phagozytoseansatz 0,75 Mio. BMDMs und 0,75 Mio. COS-Zellen in 1ml Medium in einer 24well-Platte, Ficolin-B (FcnB) Konzentration 5µg/ml (Eiskontrolle mit FcnB jeweils nur n=2)

Abbildung 25 zeigt die Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen COS-Zellen durch BMDM unter Zugabe von Ficolin-B und entsprechender Kontrollen. Deutlich zu erkennen ist die signifikante Erhöhung der Phagozytoserate von allen Ansätzen gegenüber den unauffälligen Eiskontrollen. Jedoch lässt sich keine signifikante Steigerung der Phagozytoserate unter Anwesenheit von Ficolin-B erkennen. Daher wurde im folgenden Experiment eine höhere Konzentration von Ficolin-B verwendet.

Um nun zu Überprüfen ob Ficolin-B bereits allein einen Einfluss auf die Phagozytose hat, wurde der Versuch aus Abbildung 25 mit einer Ficolin-B Konzentration von 5 µg/ml wiederholt. Diese Konzentration wurde gewählt, da die natürliche Serum Konzentration von

anderen Ficolinen in diesem Bereich liegt. Das humane L-Ficolin hat zum Beispiel eine durchschnittliche Serumkonzentration von 3,0-5,4 µg/ml (Thielens et al. 2007) und erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Serumkonzentration vom humanen M-Ficolin, dass ortholog zum Ficolin-B der Maus ist, zwischen 0,5 -5 µg/ml schwankt (Ammitzboll et al. 2012). In einem Versuch mit Ficolin-A wurde von einer Gruppe um Bidula et al. 2013 ebenfalls eine Konzentration von 5 µg/ml verwendet.

In Abbildung 26 kann man nun erkennen, dass es zwar eine signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber den Eiskontrollen gibt, aber nicht, dass die Phagozytoserate mit Ficolin-B signifikant höher ist als ohne. Es lässt sich auch kein Unterschied zwischen phagozytierten apoptotischen oder nekrotischen Zellen erkennen.

Phagozytose von toten COS-Zellen durch BMDM mit unterschiedlicher FcnB-Menge

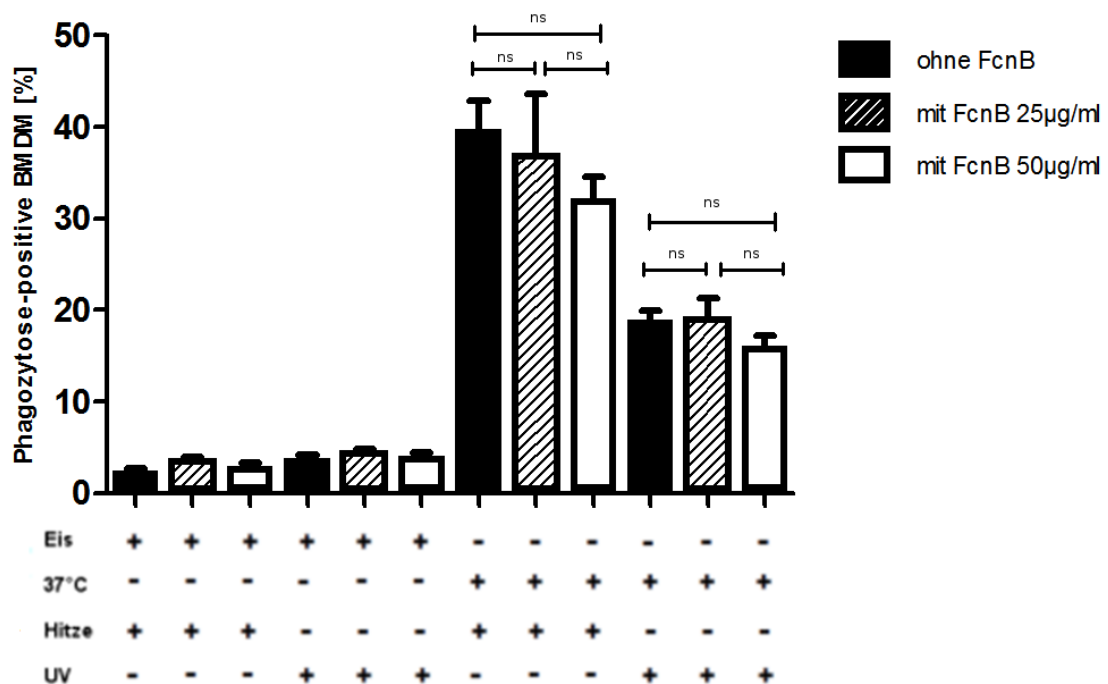


Abbildung 26 Phagozytose von COS-Zellen durch BMDM, Phagozytosezeit 4h, UV-Exposition 18kJ und Hitzeexposition 56°C für 30min; Phagozytoseansatz 1,0 Mio. BMDM und 1,0 Mio. COS-Zellen in 1ml Medium in einer 24well-Platte, Ficolin-B (FcnB) Konzentration 25µg/ml oder 50 µg/ml

In einer Arbeit von Honore et al. wurden apoptotische Zellen mit 25 µg/ml H-Ficolin inkubiert. Es gibt zwar kein Mausortholog zu dem humanen H-Ficolin, jedoch wurde dies als Hinweis gesehen, dass 5 µg/ml Ficolin-B evtl. zu niedrig ist, um einen Einfluss auf die Phagozytose zu haben. Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass die Bindung von Ficolin-B an apoptotische und nekrotische Zellen mit der Konzentration steigt. Hier wurden neben 5 µg/ml auch 25 µg/ml und 50 µg/ml verwendet (Schmid et al. 2011). Daraufhin wurde im nächsten Experiment die Phagozytoserate mit 25 µg/ml und 50 µg/ml Ficolin-B untersucht. In Abbildung 26 kann man erkennt man die deutlich erhöhte Phagozytoserate bei den nekrotischen und apoptotischen Zellen gegenüber den Eiskontrollen. Jedoch lässt sich auch hier kein signifikanter Unterschied bei Anwesenheit von 25 µg/ml oder 50 µg/ml Ficolin-B erkennen.

Daraus wurde geschlossen, dass es nicht an der Konzentration vom Ficolin-B allein liegen kann, wenn die Phagozytose nicht verbessert ist. Aus diesen Ergebnissen und denen von Schmid et al. 2011 wurde für die nächsten Experimente eine Ficolin-B-Konzentration von 20 µg/ml beschlossen und überlegt, welche Unterschiede zur Realität bestehen, die verhindern könnten, dass Ficolin-B Auswirkungen auf die Phagozytoserate hat.

3.5.2. PEC-Phagozytose von toten COS-Zellen

Wie in 3.4. bereits gezeigt wurde, weisen PEC bereits nach 2 Stunden eine sehr gute Phagozytose auf, daher wurde in den folgenden Experimenten diese Phagozytosezeit gewählt um mögliche Einflüsse durch Ficolin-B deutlicher zeigen zu können.

Phagozytose von toten COS-Zellen durch PEC

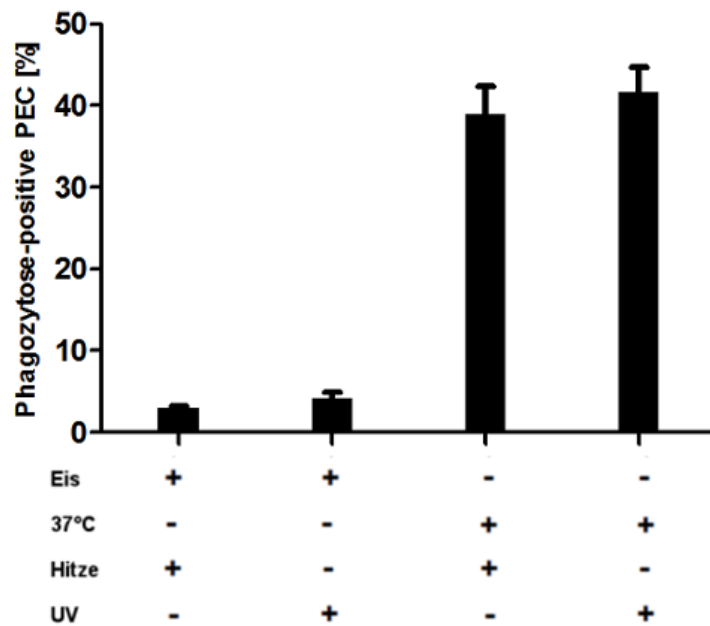


Abbildung 27 Phagozytose von COS-Zellen durch PEC, Phagozytosezeit von 2h, UV-Exposition 18kJ und Hitzeexposition 56°C für 30min; Phagozytoseansatz 1,0 Mio. PEC und 1,0 Mio. COS-Zellen in 1ml Medium in einer 24well-Platte

Abbildung 27 zeigt die Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen COS-Zellen durch PEC. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Phagozytoserate beider Ansätze gegenüber den unauffälligen Eiskontrollen. Ebenfalls zeigt sich im Vergleich zu den Abbildungen 23 und 24 trotz kürzerer Phagozytosezeit eine deutlich höhere Phagozytoserate.

Im Folgenden wurde nun überprüft, ob die Anwesenheit von Ficolin-B und hitzeinaktiviertem Mausserum wie in 3.5.1. und 3.5.2. Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen COS-Zellen weiter beeinflussen kann.

Phagozytose von toten COS-Zellen durch PEC

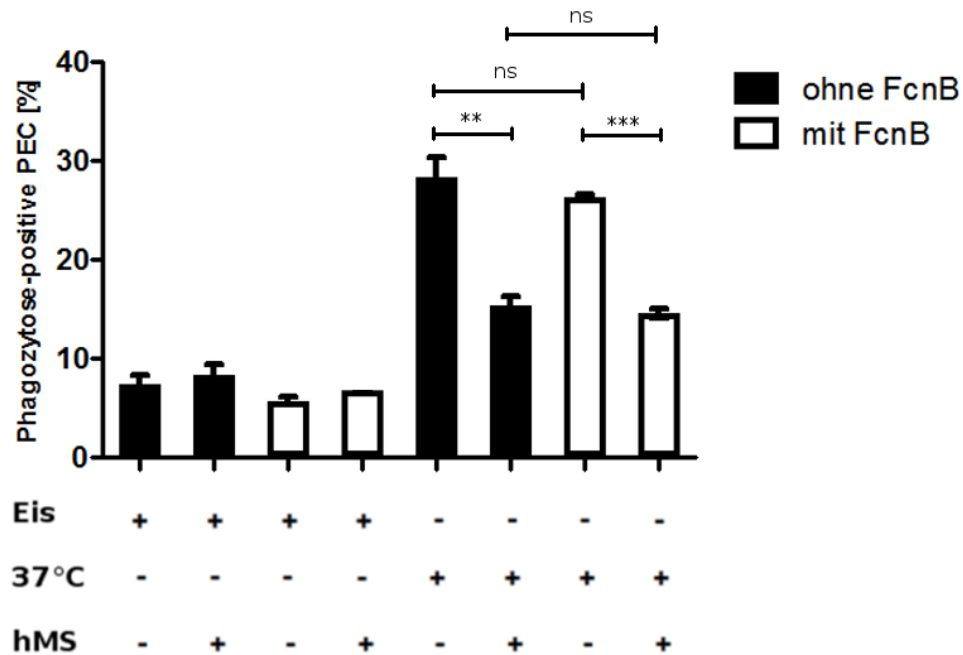


Abbildung 28 Phagozytose von COS-Zellen durch PEC, Phagozytosezeit von 2h, Phagozytoseansatz 0,5 Mio. PECs und 0,5 Mio. COS-Zellen in 0,5ml Medium in einer 24well-Platte, Ficolin-B (FcnB) Konzentration 20 µg/ml, 3% hitzeinaktiviertes Mausserum (hMS) in RPMI-Medium (Eis hMS + FcnB N=2)

Die in Abbildung 28 dargestellte Phagozytose in Abhängigkeit von 3% hitzeinaktiviertem Mausserum und 20 µg/ml Ficolin-B zeigt einen deutlichen Einbruch der Phagozytoserate bei Anwesenheit von hMS und keinen signifikanten Anstieg unter Anwesenheit von Ficolin-B. Da es sich jedoch bei den apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht um die eigentlich interessanten Zellen des zu etablierenden Phagozytoseassays handelt, sondern um Fibroblasten aus einer Affenart wurde das Experiment mit hMS und PEC mit Maus-Granulozyten wiederholt.

3.6. PEC-Phagozytose von HoxB8-Zellen

3.6.1. PEC-Phagozytose von stimulierten und unstimulierten HoxB8-Zellen

Der letzte Schritt der Trojanischen-Pferd-Theorie ist die Phagozytose von infizierten Neutrophilen durch Makrophagen. Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden PEC als Makrophagen-Quelle ausgewählt, da sie die reifsten und primärsten Zellen waren und auch in kurzer Zeit die optimale Phagozytoserate aufwiesen. Die infizierten Neutrophilen werden durch die Infektion auch stimuliert. Im Folgenden wurde daher untersucht, wie sich die Stimulation der HoxB8-Zellen auf die Phagozytose durch PEC auswirkt.

Es wurde gezeigt, dass die Stimulation mit PMA und Ionomycin die Expression von Ficolin-B in den Zellen sehr erhöht (Hunold, 2011). Durch die lange Stimulation wurde nicht nur die Expression von Ficolin-B in den Zellen erhöht, sondern auch eine Aktivierung der Zellen wie bei einer Infektion.

Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC

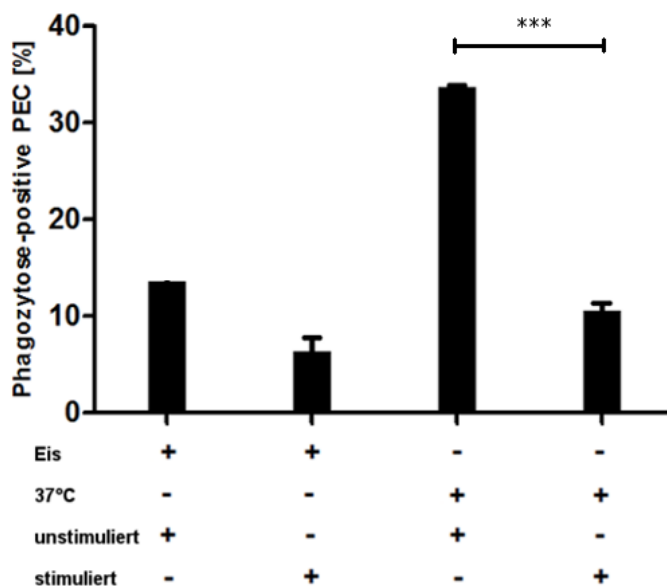


Abbildung 29 Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC, Phagozytosezeit von 2h, Stimulation von HoxB8 mittels 18h 15ng/ml PMA und 1µM Ionomycin; Phagozytoseansatz 0,5 Mio. PEC und 0,5 Mio. HoxB8-Zellen in 0,5ml Medium in einer 24well-Platte (bei der ersten Eiskontrolle Probenanzahl N=2)

In Abbildung 29 kann man die Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC erkennen. Die CFSE-gefärbten HoxB8-Zellen wurden für 18 Stunden mit 15ng/ml PMA und 1µM Ionomycin

stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen und in frischem Medium zu den PEC hinzugegeben und für 2h bei 37°C inkubiert. Wie man jedoch in Abbildung 29 erkennen kann, fand zwar eine gute Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC statt. Jedoch erhöhte sich die Phagozytoserate unter Anwesenheit von PMA/Ionomycin nicht gegenüber den Eiskontrollen. Es wurde daher vermutet, dass das Ionomycin toxisch auf die PECs gewirkt hat und im folgenden Experiment wurden die HoxB8-Zellen nur mit PMA stimuliert.

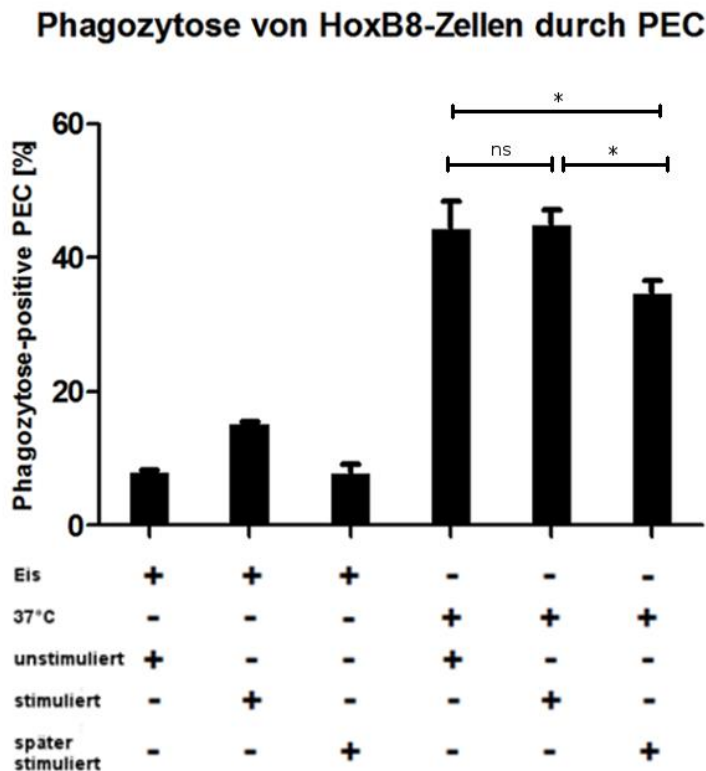


Abbildung 30 Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC, Phagozytosezeit von 3h, Stimulation von HoxB8 mittels 100nM PMA „stimuliert“: 1h Vorstimulation + 3h während Phagozytose, „später stimuliert“: 3h während Phagozytose; Phagozytoseansatz 0,5 Mio. PEC und 1 Mio. HoxB8-Zellen in 1ml OPTIMEM- Medium in einer 24well-Platte

In Abbildung 30 erkennt man die Phagozytose von stimulierten und unstimulierten HoxB8-Zellen durch PEC. Im Gegensatz zu Versuch in Abbildung 29 wurden diesmal die HoxB8 nur PMA stimuliert (100nM, 61ng/ml) und die PEC wurden zu den HoxB8 hinzugegeben. Die „stimulierten“ HoxB8-Zellen wurde eine Stunde vor Phagozytosebeginn bereits mit 100 nM PMA vorstimuliert. Die „später stimulierten“ HoxB8-Zellen wurden nur während der 3-stündigen Phagozytose mit 100nM PMA stimuliert. In diesem Fall wurde eine Phagozytosezeit von 3 Stunden gewählt, da die PEC zu den HoxB8-Zellen hinzugegeben wurden und somit im Gegensatz zu den anderen Versuchen keine Zeit hatten adhären zu

werden. Deutlich zu erkennen ist die signifikante Erhöhung der Phagozytoserate aller Ansätze gegenüber den Eiskontrollen. Jedoch zeigt sich keine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate der stimulierten HoxB8-Zellen gegenüber den unstimulierten HoxB8-Zellen. Deutlich zu erkennen ist die signifikante Hemmung der Phagozytose im „später stimulierten“ Phagozytoseansatz. Es zeigt sich also keine Steigerung wie zuerst vermutet. Dies könnte aufgrund der fehlenden Komponenten aus dem Komplementsystem sein. Daher wurde das nächste Experiment mit 3% hitzeinaktiviertem Mausserum durchgeführt.

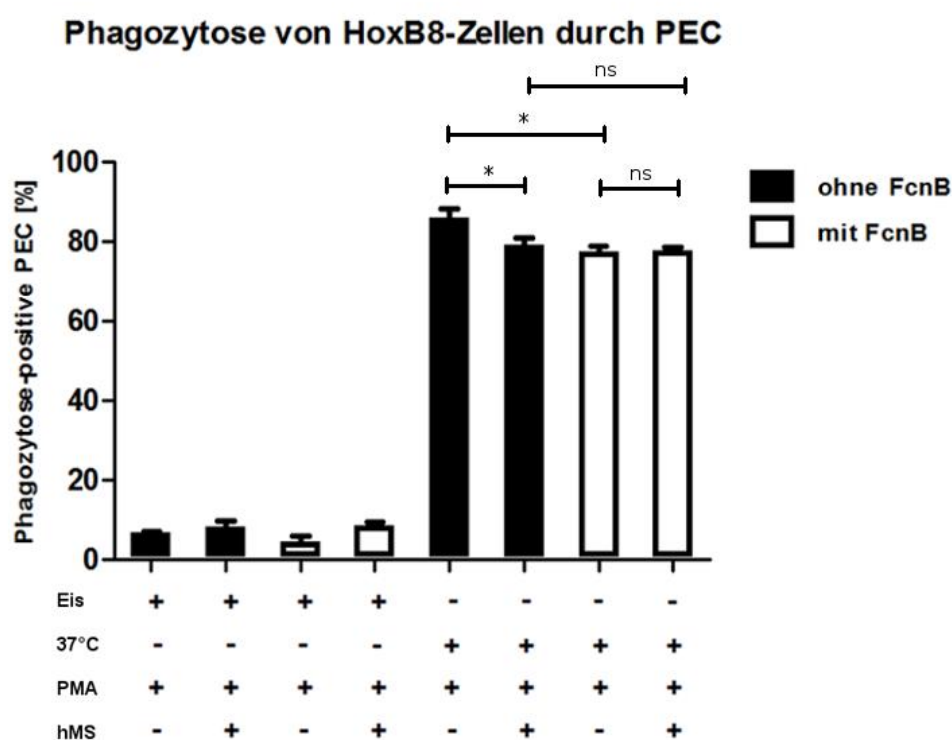


Abbildung 31 Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PECs, Phagozytosezeit von 2h, Stimulation von HoxB8 mittels 100nM PMA während der Phagozytose; Phagozytoseansatz 0,5 Mio. PECs und 1 Mio. HoxB8-Zellen in 1ml OPTIMEM- Medium in einer 24well-Platte

Abbildung 31 zeigt die Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC in Abhängigkeit von Ficolin-B und 3% hitzeinaktiviertem Mausserum. Zuerst fällt die deutlich signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber den unauffälligen Eiskontrollen, aber auch gegenüber den anderen Experimenten in den Abbildungen 23-30 auf. In diesem Experiment hemmt die Anwesenheit von hitzeinaktiviertem Mausserum signifikant die Phagozytoserate bei dem Ansatz ohne Ficolin-B. Ebenfalls gibt es einen signifikanten Unterschied bei Anwesenheit von

Ficolin-B ohne hitzeinaktiviertes Mausserum, jedoch hemmt hier das Ficolin-B. Um die Hemmungen durch PMA und durch das hitzeinaktivierte Mausserum, welche bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, auszuschließen, wurde die PEC-Phagozytose von HoxB8-Zellen ohne PMA und hitzeinaktiviertes Mausserum im nächsten Experiment wiederholt.

3.6.2. PEC-Phagozytose von HoxB8-Zellen in Abhängigkeit von Ficolin-B

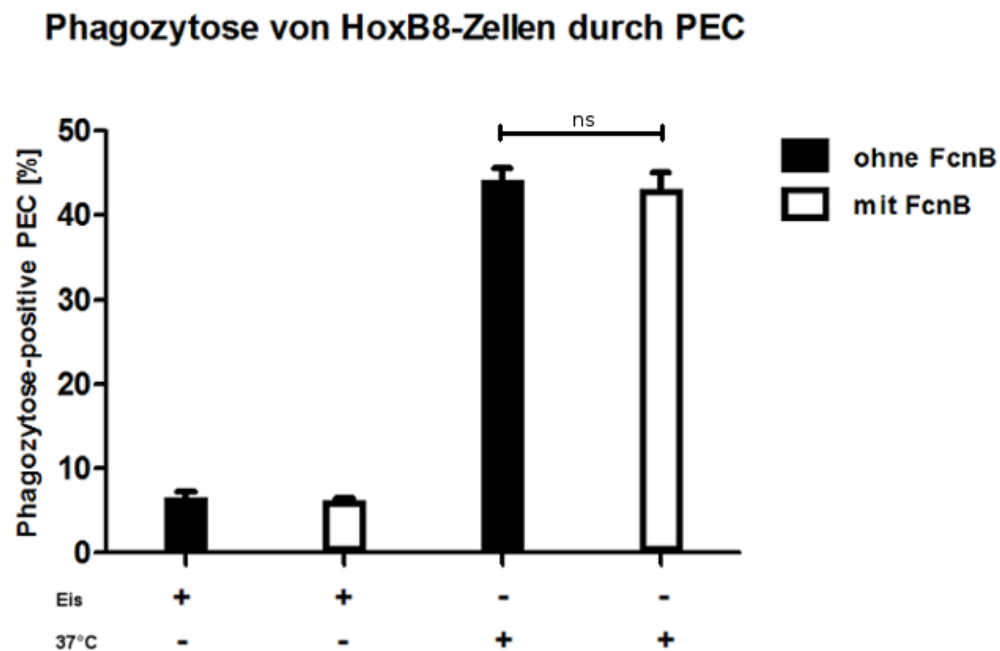


Abbildung 32 Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PECs in OPTIMEM-Medium; Ficolin-B (FcnB) Konzentration 20µg/ml

In Abbildung 32 ist die Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC in OPTIMEM-Medium zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber den Eiskontrollen, jedoch keine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate durch Ficolin-B.

4. Diskussion

In einer immer älter werdenden Gesellschaft spielt die Rolle des Immunsystems eine wichtige Rolle, denn seine Wirksamkeit nimmt mit dem Alter ab.

Infektionen werden mit dem Alter immer häufiger und somit auch Bakteriämien und Sepsis. Es ist daher wichtig die Funktionsweise des Immunsystems genauer zu erforschen und zu wissen, welche Faktoren einen positiven Effekt auf das eigene Immunsystem und die Behandlung einer solchen Infektion haben können.

Ein wichtiger Mechanismus der Bakterien ist die Nutzung des eigenen Immunsystems als Trojanisches Pferd und somit die Umgehung möglicher Verteidigungsmechanismen des Körpers. Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit war es die Rolle des Ficolin-B in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Dafür musste zuerst ein Assay gefunden werden, der der Infektion in der Realität am nächsten kommt.

4.1. Phagozytose Assay für Trojanische-Pferd-Theorie

Um einen Assay für die Trojanische-Pferd-Theorie zu entwickeln, wurde zuerst überlegt, welche Schritte bei einer solchen Infektion überhaupt stattfinden. Ein Erreger, zum Beispiel ein *Staphylococcus aureus*, muss zuerst die mechanischen Barrieren des Körpers überwinden und trifft dann auf die erste zelluläre Verteidigungslinie des Immunsystems. Diese besteht vorerst hauptsächlich aus Phagozyten wie Granulozyten und später auch Makrophagen. Der Erreger wird phagozytiert und verhindert jedoch möglicherweise seine eigene Zerstörung. Um dies nachzubauen, mussten zuerst Zellen gefunden werden, die im in-vitro Modell Stellvertreter der Zellen des Immunsystems in-vivo sind.

4.1.1. Etablieren der Testbedingungen

Hierfür wurden als Stellvertreter der Neutrophilen „bm-PMN“ und HoxB8-Zellen und als Stellvertreter der Makrophagen „BMDMs“ und „PEC“ gewählt.

Als Stellvertreter für die möglichen Erreger wurden FITC-markierte Latex-Beads gewählt.

Zu Beginn konnte gezeigt werden, dass die Beads sowohl von den PEC als auch von den HoxB8-Zellen erkannt und phagozytiert wurden und sich somit als Stellvertreter für die Bakterien eignen. Ebenfalls wurde eine Konzentrations-abhängige Phagozytoserate gezeigt. Um mögliche Einflüsse in späteren Experimenten besser erkennen zu können wurde eine nicht gesättigte Phagozytoserate und dementsprechend die Konzentration der Beads von 1 $\mu\text{l/ml}$ gewählt.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die HoxB8-Zellen eine Stimulation benötigten um eine erhöhte Phagozytoserate zu erreichen.

Um nun das in-vitro Modell weiter aufzubauen, mussten Makrophagen gefunden werden, die die infizierten Neutrophilen wieder phagozytieren und damit möglicherweise vernichten können. Da die Erreger die infizierten Neutrophilen zur Apoptose bringen, um selbst wieder zu entkommen, wurde nun überprüft, welche Makrophagen apoptotische und nekrotische Zellen besser phagozytieren. Als apoptotische und nekrotische Zellen dienten hierbei die COS-Zellen, welche durch UV und Hitze Einwirkung behandelt wurden.

Bei BMDM handelt es sich im Gegensatz zu PEC nicht um primäre und ausgereifte Macrophagen, daher wurde die Phagozytosezeit gegenüber den PEC auf 4 Stunden erhöht und somit eine gute Phagozytoserate erreicht.

Neben den üblichen Eiskontrollen wurde auch ein Ansatz mit einer Lebend-Kontrolle verwendet. In der Theorie sollten Makrophagen keine lebenden Zellen phagozytieren und daher schien die Lebendkontrolle als geeignet. Jedoch zeigte sich eine signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber den Eiskontrollen. Eine Erklärung hierfür ist, dass eine Population von lebenden Zellen nicht zwangsläufig nur lebende Zellen enthält. Auch hier sind aufgrund von unterschiedlichen Einflüssen wie zum Beispiel Alter und Nahrungsangebot einige Zellen in Apoptose, welche dann von den Makrophagen erkannt und phagozytiert wurden. Aufgrund von diesem Ergebnis wurden in den folgenden Experimenten die unauffälligen Eiskontrollen vorgezogen. Auch in einem kleineren Ansatz konnte die Phagozytose reproduziert werden und somit wurden die folgenden Experimente in einem Milliliter Medium und einer 24-well Platte durchgeführt.

Die PEC als reife und primäre Zellen konnten bereits nach zwei Stunden eine überzeugende Phagozytoserate erreichen und zeigten ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit.

Somit wurden stabile Testsysteme etabliert, an welchen nun verschiedene Einflüsse, wie Ficolin-B, Mausserum und Stimulation der Granulozyten überprüft werden konnten.

4.2. Einfluss von hitzeinaktiviertem Mausserum auf die Phagozytose

Das hitzeinaktivierte Mausserum konnte die Phagozytoserate der HoxB8-Zellen positiv steigern. Jedoch vermindert die Anwesenheit von hitzeinaktiviertem Mausserum die Phagozytoserate von PEC sowohl bei der Phagozytose von toten COS-Zellen, als auch bei der Phagozytose von HoxB8-Zellen. Daher stellt sich die Frage, ob das hitzeinaktivierte Mausserum die HoxB8-Zellen stimuliert und die PEC hemmt. Jedoch wurde in dieser Arbeit nur mit einer Konzentration von hitzeinaktiviertem Mausserum experimentiert. Es sollte weiter überprüft werden, ob eine höhere Konzentration von Mausserum und damit eine höhere Konzentration von Komplementfaktoren im Medium einen größeren Einfluss auf die Phagozytose hat.

4.3. Einfluss durch die Stimulation auf die Phagozytose

Für die Stimulation wurden einmal 100 ng/ml LPS und 100 nM PMA verwendet. LPS ist ein Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien und wird bei Zerstörung dieser freigesetzt. Es eignet sich also gut, um eine Stimulation durch eine Infektion mit gramnegativen Erregern zu simulieren. PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C und wird somit zur generellen Aktivierung der Zellen eingesetzt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Stimulation von Neutrophilen mit PMA das Auswerfen einer NET-Formation bewirkt. Diese dient dazu den Erreger festzuhalten (Hunold, 2011).

4.3.1. LPS Stimulation

Die LPS Stimulation der HoxB8-Zellen unter Anwesenheit von hitzeinaktiviertem Mausserum bringt keine signifikante Steigerung der Phagozytoserate. Daher wurde in den Experimenten auf diese Stimulation verzichtet.

4.3.2. PMA Stimulation

Die Phagozytoserate der HoxB8-Zellen unter PMA-Stimulation sank signifikant ab. Wie von Hunold et al. 2011 bereits beschrieben, bilden HoxB8-Zellen Netze, wenn sie durch PMA stimuliert werden. Diese Netze helfen Erreger festzuhalten und somit für andere Macrophagen zu markieren. So liegt die Vermutung nahe, dass HoxB8-Zellen nach dieser Stimulation nicht mehr in der Lage sind selbst zu phagozytieren.

Im Weiteren wurde die Phagozytose von stimulierten HoxB8-Zellen durch PEC überprüft. Zu Beginn war dies eine Stimulation von Ionomycin und PMA. Die deutlich reduzierte Phagozytoserate bei diesem Experiment wurde bereits in 3.6.1. mit dem Zellgift Ionomycin und dessen Hemmung der PEC erklärt. Ohne den Einfluss von Ionomycin hemmt PMA nur noch in einem Ansatz signifikant. Aber damit zeigte sich bisher auch kein positiver Einfluss durch diese Stimulation.

4.4. Einfluss von Ficolin-B auf die Phagozytose

4.4.1. HoxB8-Phagozytose

Zu Beginn wurde nun der Einfluss von Ficolin-B auf das erste Testmodell überprüft. Ficolin-B konnte die Phagozytose von FITC-Beads durch HoxB8-Zellen in mehreren Experimenten signifikant steigern. Es konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung unter Anwesenheit von LPS und Ficolin-B erzielt werden. Ficoline können mit ihrer Fibrin-ähnlichen-Domäne acetylierte Kohlenhydrate erkennen und binden (Krarup, 2008) (Girija, 2010) (Liu, 2005). Die verwendeten Beads haben eine eher hydrophobe Oberfläche und auch LPS hat eine hydrophobe Domäne. Es liegt also die Vermutung nahe, dass sich das LPS an die Beads geheftet hat und durch Ficolin-B erkannt wurde. Durch diese Opsonisierung konnten die Beads signifikant mehr phagozytiert werden.

Endo et al. konnten 2012 zeigen, dass rekombinantes Ficolin-B in den meisten Expressionssystemen in einer biologisch inaktiven Form produziert wird. So auch das Insektenzell-produzierte Ficolin-B, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

Jedoch konnten wir auch zeigen, dass rekombinantes Ficolin-B an DNA bindet (Schmid et al 2011) (Hunold et al 2011). Die NET-Formation, welche von den HoxB8 bei Stimulation ausgeworfen werden, bestehen aus DNA (Brinkmann et al. 2004) und können somit als Ziel von dem rekombinanten Ficolin-B angesehen werden. Rekombinantes Ficolin-B konnte in diesen Experimenten die Phagozytose ebenfalls signifikant steigern, obwohl es biologisch inaktiv ist. Es besitzt jedoch noch die Fähigkeit zur Opsonisierung und konnte so die NET-Formationen opsonisieren und somit zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytose führen.

4.4.2. BMDM und PEC Phagozytose

Ficolin-B konnte weder die Phagozytose von COS-Zellen durch BMDM, die Phagozytose von COS-Zellen durch PEC, noch die Phagozytose von HoxB8-Zellen durch PEC trotz verschiedener Konzentrationen nicht signifikant steigern.

Wie bereits erwähnt zeigten Endo et al. 2012 die biologische Inaktivität des in dieser Arbeit verwendeten Ficolin-B. Auch die positiven Einflüsse, wie NET-Formationen und hydrophobe Oberfläche der Beads fehlen in diesen Experimenten. Daher sollten diese Experimente mit dem nach Endo et al. 2012 nachgewiesenen intrazellulärem biologisch aktivem Ficolin-B wiederholt werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es einerseits ein Phagozytoseassay zu entwickeln, anhand dessen die Trojanische-Pferd-Theorie später auch mit Erregern getestet werden kann.

Es wurden folgende Testsysteme etabliert: 1. Granulozyten-Phagozytose von FITC-Beads 2. Makrophagen-Phagozytose von FITC-Beads und Granulozyten.

Mit diesen etablierten Testmodellen sollte überprüft werden, ob Ficolin-B die Phagozytose beeinflusst. Dies ließ sich nicht eindeutig bestätigen. Es gab in den Experimenten der Granulozyten-Phagozytose signifikante Erhöhungen der Phagozytose durch Ficolin-B. Jedoch konnten keine signifikanten Erhöhungen der Phagozytoserate in den weiteren Testmodellen gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Ammitzbøll, Christian Gytz; Kjær, Troels Rønn; Steffensen, Rudi; Stengaard-Pedersen, Kristian; Nielsen, Hans Jørgen; Thiel, Steffen et al. (2012): Non-Synonymous Polymorphisms in the FCN1 Gene Determine Ligand-Binding Ability and Serum Levels of M-Ficolin. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e50585.
- Aung, Ar Kar; Skinner, Matthew J.; Lee, Felicity J.; Cheng, Allen C. (2012): Changing epidemiology of bloodstream infection pathogens over time in adult non-specialty patients at an Australian tertiary hospital. In: *Commun Dis Intell Q Rep* 36 (4), S. E333-41.
- Bidula, S.; Kenawy, H.; Ali, Y. M.; Sexton, D.; Schwaeble, W. J.; Schelenz, S. (2013): Role of Ficolin-A and Lectin Complement Pathway in the Innate Defense against Pathogenic *Aspergillus* Species. In: *Infection and Immunity* 81 (5), S. 1730–1740.
- Endo, Y.; Nakazawa, N.; Liu, Y.; Iwaki, D.; Takahashi, M.; Fujita, T. et al. (2005): Carbohydrate-binding specificities of mouse ficolin A, a splicing variant of ficolin A and ficolin B and their complex formation with MASP-2 and sMAP. In: *Immunogenetics* 57 (11), S. 837–844.
- Endo, Yuichi; Iwaki, Daisuke; Ishida, Yumi; Takahashi, Minoru; Matsushita, Misao; Fujita, Teizo (2012): Mouse Ficolin B Has an Ability to Form Complexes with Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Proteases and Activate Complement through the Lectin Pathway. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (5), S. 1–7.
- Endo, Yuichi; Matsushita, Misao; Fujita, Teizo (2011): The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (5), S. 705–712.
- Fujita, Teizo (2002): Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. In: *Nat Rev Immunol* 2 (5), S. 346–353.
- Girija, Umakhanth Venkatraman; Dodds, Alister W.; Roscher, Silke; Reid, Kenneth B M; Wallis, Russell (2007): Localization and characterization of the mannose-binding lectin (MBL)-associated-serine protease-2 binding site in rat ficolin-A: equivalent binding sites within the collagenous domains of MBLs and ficolins. In: *J. Immunol.* 179 (1), S. 455–462.
- Girija, Umakhanth Venkatraman; Mitchell, Daniel A.; Roscher, Silke; Wallis, Russell (2011): Carbohydrate recognition and complement activation by rat ficolin-B. In: *Eur. J. Immunol.* 41 (1), S. 214–223.
- Gluzman, Yakov (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. In: *Cell* 23 (1), S. 175–182.

Honoré, Christian; Hummelshoj, Tina; Hansen, Bjarke E.; Madsen, Hans O.; Eggleton, Paul; Garred, Peter (2007): The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. In: *Arthritis Rheum* 56 (5), S. 1598–1607.

Hunold, Katja (2011): Characterization and functional analysis of mouse Ficolin B. Regensburg. Online verfügbar unter <http://epub.uni-regensburg.de/23208/>.

Ichijo, H.; Rönnstrand, L.; Miyagawa, K.; Ohashi, H.; Heldin, C. H.; Miyazono, K. (1991): Purification of transforming growth factor-beta 1 binding proteins from porcine uterus membranes. In: *J. Biol. Chem.* 266 (33), S. 22459–22464.

Janeway, Charles; Murphy, Kenneth P. (2009): Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.

Krarup, Anders; Mitchell, Daniel A.; Sim, Robert B. (2008): Recognition of acetylated oligosaccharides by human L-ficolin. In: *Immunology Letters* 118 (2), S. 152–156.

Laufs, H. (2002): Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. In: *Infection and Immunity* 70 (2), S. 826–835.

Liu, George Y.; Essex, Anthony; Buchanan, John T.; Datta, Vivekanand; Hoffman, Hal M.; Bastian, John F. et al. (2005): Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. In: *J. Exp. Med.* 202 (2), S. 209–215.

Liu, Yu; Endo, Yuichi; Homma, Shunsaku; Kanno, Kazuko; Yaginuma, Hiroyuki; Fujita, Teizo (2005): Ficolin A and ficolin B are expressed in distinct ontogenic patterns and cell types in the mouse. In: *Mol. Immunol.* 42 (11), S. 1265–1273.

Löffler, Georg; Petrides, Petro E.; Löffler-Petrides (2003): Biochemie und Pathobiochemie. Mit 218 Tabellen ; [mit Poster]. 7., völlig neu bearb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).

Maas, Martje L.; Wever, Peter C.; Plat, Arjan W.; Hoogveen, Ellen K. (2013): An uncommon cause of Staphylococcus aureus sepsis. In: *Scand J Infect Dis*, S. 1–3.

Majno, G.; Joris, I. (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. In: *Am. J. Pathol.* 146 (1), S. 3–15.

Mejer, Niels; Westh, Henrik; Schønheyder, Henrik C.; Jensen, Allan G.; Larsen, Anders R.; Skov, Robert; Benfield, Thomas (2012): Stable incidence and continued improvement in short term mortality of Staphylococcus aureus bacteraemia between 1995 and 2008. In: *BMC Infect Dis* 12 (1), S. 260.

Naber, Christoph K. (2009): Staphylococcus aureus Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. In: *CLIN INFECT DIS* 48 (s4), S. S231.

Ohashi, T.; Erickson, H. P. (1998): Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 360 (2), S. 223–232.

Ritter, Uwe; Frischknecht, Freddy; van Zandbergen, Ger (2009): Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? In: *Trends in Parasitology* 25 (11), S. 505–510.

Schmid, Maximilian; Hunold, Katja; Weber-Steffens, Dorothea; Männel, Daniela N. (2012): Ficolin-B marks apoptotic and necrotic cells. In: *Immunobiology* 217 (6), S. 610–615.

Schorn, Christine (2010): The uptake by blood-borne phagocytes of monosodium urate is dependent on heat-labile serum factor(s) and divalent cations. In: *Autoimmunity* 43 (3), S. 236–238.

Thielens, N.M.; Gaboriaud, C.; Arlaud, G.J. (2007): Ficolins: innate immune recognition proteins for danger sensing. In: *Inmunología* 26 (3), S. 145–156.

Thwaites, Guy E.; Gant, Vanya (2011): Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of Staphylococcus aureus? In: *Nat Rev Micro* 9 (3), S. 215–222.

van Cruchten, S.; van den Broeck, W. (2002): Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. In: *Anatom Histol Embryol* 31 (4), S. 214–223.

Voyich, Jovanka M.; Braughton, Kevin R.; Sturdevant, Daniel E.; Whitney, Adeline R.; Saïd-Salim, Battouli; Porcella, Stephen F. et al. (2005): Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils. In: *J. Immunol.* 175 (6), S. 3907–3919.

Wang, Gang G.; Calvo, Katherine R.; Pasillas, Martina P.; Sykes, David B.; Häcker, Hans; Kamps, Mark P. (2006): Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. In: *Nat Meth* 3 (4), S. 287–293.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet haben.

Zu allererst danke ich Frau Prof. Dr. Daniela Männel für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an ihrem Institut durchführen zu können, aber vor allem für die Unterstützung, die hervorragende Betreuung und ihre Geduld.

Katja Hunold möchte ich für die gute Einarbeitung, die Hilfe und die vielen Tipps bei jeglichen Fragen danken.

Mein besonderer Dank gilt Anne Pietryga-Krieger und Dorothea Weber-Steffens, die mir während meiner gesamten Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe im Institut für Immunologie für die vielen Anregungen, die Hilfsbereitschaft und vor allem für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Bei meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich mich für die Unterstützung und die allseits offenen Ohren bedanken, die mich durchs gesamte Studium begleitet haben.

Mein größter Dank geht an meinem Mann Timo, der mir seit Beginn meines Studiums immer zur Seite stand und mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe. Daher widme ich ihm diese Arbeit.