

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON ADIPONEKTIN AUF DIE INTERAKTION VON NEUTROPHILEN  
GRANULOZYTEN MIT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Inaugural ó Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Peter Sponagl

2015



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON ADIPONEKTIN AUF DIE INTERAKTION VON NEUTROPHILEN  
GRANULOZYTEN MIT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Inaugural ó Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Peter Sponagl

2015

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Salzberger

2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Wulf Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2016

Gewidmet meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis.....   | 7  |
| 1 Einleitung.....  | 9  |
| 1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....                               | 9  |
| 1.1.1 Historisches .....   | 9  |
| 1.1.2 Biologie.....  | 9  |
| 1.1.3 Pathogenität.....  | 10 |
| 1.1.4 Epidemiologie .....  | 11 |
| 1.1.5 Resistenzen.....   | 12 |
| 1.2 Immunantwort der neutrophilen Granulozyten.....                  | 13 |
| 1.2.1 Phagozytose.....   | 14 |
| 1.2.2 Opsonisierung.....   | 15 |
| 1.3 Das Adipokin Adiponektin.....                                    | 16 |
| 1.3.1 Aufbau von Adiponektin.....                                    | 16 |
| 1.3.2 Adiponektin-Rezeptoren .....                                   | 18 |
| 1.3.3 Adiponektin im Metabolismus .....                              | 18 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit .....                                     | 19 |
| 2 Material und Methoden.....   | 20 |
| 2.1 Material.....  | 20 |
| 2.1.1 Geräte.....  | 20 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....                                    | 21 |
| 2.1.3 Chemikalien .....  | 21 |
| 2.1.4 Kit Systeme .....  | 22 |
| 2.1.5 Puffer und Lösungen.....                                       | 23 |
| 2.2 Methoden.....  | 27 |
| 2.2.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten aus venösem Blut.....     | 27 |
| 2.2.2 HE-Färbung: Überprüfung der Isolierungsmethode.....            | 29 |
| 2.2.3 Vorstimulierung neutrophiler Granulozyten mit Adiponektin..... | 29 |

---

|  |    |
|--|----|
| 2.2.4 Erstellen einer definierten Bakteriensuspension .....  | 29 |
| 2.2.5 Herstellen von autologem Serum .....   | 30 |
| 2.2.6 Killing-Assay.....   | 30 |
| 2.2.7 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit Adiponektin und Inkubation mit LPS<br>und <i>S. aureus</i> .....                      | 31 |
| 2.2.8 Isolierung humaner Monozyten aus venösem Blut .....  | 32 |
| 2.2.9 IL-8-Elisa .....   | 33 |
| 2.2.10 LPS-Assay .....   | 34 |
| 2.2.11 Durchflusszytometrie.....   | 34 |
| 2.3 Statistik .....  | 36 |
| 3 Ergebnisse .....   | 37 |
| 3.1 Überprüfung der Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach deren Isolierung .....   | 37 |
| 3.2 Quantitatives Ausplattieren von <i>S. aureus</i> - Bestimmung der Korrelation zwischen<br>optischer Dichte und Konzentration ..... | 37 |
| 3.3 Einfluss von Adiponektin auf neutrophile Granulozyten.....   | 38 |
| 3.3.1 Killing-Assay.....   | 38 |
| 3.3.2 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit 0,5 µg/ml fAd .....   | 39 |
| 3.3.3 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit 1 µg/ml fAd .....   | 40 |
| 3.3.4 Einfluss von globulärem Adiponektin (gAd) auf die IL-8-Sekretion von<br>neutrophilen Granulozyten .....                          | 41 |
| 3.4 Einfluss von Adiponektin auf Monozyten.....  | 43 |
| 3.4.1 Einfluss von gAd auf die IL-8-Sekretion von Monozyten.....   | 44 |
| 3.5 LPS-Verunreinigung von kommerziellem globulären Adiponektin (gAd).....   | 45 |
| 3.6 Adiponektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche .....  | 46 |
| 4 Diskussion.....  | 48 |
| 4.1 Adiponektin im Kontext der Inflammation .....  | 48 |
| 4.2 Einfluss von Adiponektin auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit<br><i>S. aureus</i> .....                           | 48 |

---

|  |    |
|--|----|
| 4.2.1 Überprüfung der Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach deren Isolierung ...             | 49 |
| 4.2.2 Killing-Assay.....   | 49 |
| 4.2.3 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit 'full-length' Adiponektin (fAd) .....             | 50 |
| 4.2.4 Einfluss von globulärem Adiponektin auf die IL-8-Sekretion neutrophiler<br>Granulozyten..... | 50 |
| 4.3 LPS-Verunreinigung von kommerziellem globulärem Adiponektin (gAd).....                         | 52 |
| 4.4 Proinflammatorisch ó Antiinflammatorisch: Wie passt das zusammen?.....                         | 53 |
| 4.5 Einfluss von globulärem Adiponektin (gAd) auf die IL-8-Sekretion von Monozyten...              | 54 |
| 4.6 Darstellung von Adiponektin-Rezeptoren.....  | 54 |
| 4.7 Fazit und Ausblick .....   | 55 |
| 5 Zusammenfassung .....  | 56 |
| 6 Literaturverzeichnis .....   | 57 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                 |   |
|-----------------|---|
| Acrp30 / AdipoQ | Adiponektin                               |
| AdipoR1         | Adiponektin-Rezeptor 1                    |
| AdipoR2         | Adiponektin-Rezeptor 2                    |
| AIDS            | acquired immunodeficiency syndrome        |
| BSA             | bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) |
| C1q             | Komplementfaktor C1q                      |
| C1qRp           | C1q Rezeptor                              |
| C5a             | Komplementfaktor C5a                      |
| CaSo            | Casein-Soja-Pepton-Agar                   |
| CFU             | colony-forming unit(s)                    |
| CXCL8           | chemokine (C-X-C motif) ligand 8          |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle's Medium        |
| DNAse           | Desoxyribonuklease                        |
| ELISA           | enzyme-linked immunosorbent assay         |
| FACS            | fluorescence activated cell sorting       |
| fAd             | 'full-length' Adiponektin                 |
| FCS             | fetal calf serum (Fetales Kälberserum)    |
| gAd             | globuläres Adiponektin                    |
| G-Protein       | Guaninnucleotid-bindendes Protein         |
| IL-6            | Interleukin 6                             |
| IL-8            | Interleukin 8                             |
| IL-10           | Interleukin 10                            |
| KCl             | Kaliumchlorid                             |
| LPS             | Lipopolysaccharid                         |
| LRP             | Leukozyten-reiches Plasma                 |
| Mbp             | Megabasenpaare                            |
| MFI             | mean fluorescence intensity               |

---

|               |  |
|---------------|--|
| MOI           | multiplicity of infection                                  |
| MRSA          | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>       |
| NaCl          | Natriumchlorid   |
| NADPH-Oxidase | Nikotinamid-Adenin-Phosphatdinucleotid-Oxidase             |
| OD            | optische Dichte  |
| PAMPs         | Pathogen-assoziierte molekulare Muster                     |
| PBMCs         | peripheral blood mononuclear cells                         |
| PBS           | phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung) |
| PRRs          | pattern-recognition receptors                              |
| PSM           | Phenol-lösliche Moduline                                   |
| PVL           | Panton-Valentin-Leukozidin                                 |
| RT            | Raumtemperatur   |
| TLRs          | Toll-ähnliche Rezeptoren                                   |
| TMB           | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine                             |
| TNF-          | Tumornekrosefaktor-  |
| TSB           | Tryptic Soy Broth  |

# 1 Einleitung

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

### 1.1.1 Historisches

Abgeleitet von dem griechischen Wort Staphyle (=Traube) kamen die Staphylokokken aufgrund der traubenförmigen Lagerung unter dem Mikroskop zu ihrem Namen. 1874 beschrieb der Chirurg Theodor Billroth »Kugelmikrobien« in Eiter und 1878 konnte Robert Koch die Erregernatur von *Staphylococcus aureus* nachweisen. Louis Pasteur gelang 1880 in Nährmedium die Anzüchtung aus klinischem Material. Noch im gleichen Jahr gab Ogston dem Erreger seinen Namen und definierte die klinische Bedeutung (1,2). In einer Serie von klinischen Beobachtungen und Laborarbeiten beschrieb Ogston die Rolle von *S. aureus* in Sepsis und Abszessen (3). Aufgrund des Pigmentverhaltens klassifizierte 1884 der Göttinger Chirurg Friedrich Julius Rosenbach die Staphylokokken in *S. pyogenes aureus* und in *S. pyogenes albus* (1). Letztere Art ist heute unter dem Namen *Staphylococcus epidermidis* bekannt (4).

Mehr als 100 Jahre später ist *S. aureus* immer noch ein wandlungsfähiges und gefährliches Pathogen für den Menschen. Die Häufigkeiten von ambulant erworbenen und Krankenhaus-assoziierten *S. aureus* Infektionen sind stetig gestiegen. Die Gesamtsterblichkeit hat sich wenig verändert. Wegen des Auftretens von Stämmen mit mehrfacher Arzneimittelresistenz ('multidrug resistance') ist es schwieriger geworden, diese Infektionen zu behandeln (3).

### 1.1.2 Biologie

*S. aureus* ist ein kugelförmiges, Gram-positives Bakterium, das meist in Haufen angeordnet ist. Die Zellwand besteht aus einer dicken Peptidoglykanschicht. Das Genom setzt sich aus einem zirkulären Chromosom von ungefähr 2,8 Mbp und verschiedenen Plasmiden zusammen. Die Kompletsequenzierung zeigte ca. 2600 proteinkodierende Regionen. Etwa ein Viertel des Genoms besteht aus variablen Bereichen, bei denen es sich größtenteils um mobile genetische Elemente handelt (Bakteriophagen, Genom- und Pathogenitätsinseln, chromosomale Kassetten, Plasmide und Transposons), welche horizontal ausgetauscht werden

können (1,2). Staphylokokken kann man in Koagulase negative Staphylokokken (z.B. *S. epidermidis*) und in Koagulase positive Staphylokokken (z.B. *S. aureus*) unterteilen (1). Bei *S. aureus* handelt es sich um ein fakultativ anaerobes Bakterium (2).

### 1.1.3 Pathogenität

*S. aureus* ist ein primär extrazellulärer Erreger und kann sowohl oberflächliche als auch tief-invasive Infektionen verursachen. Typische Krankheitsbilder sind zum einen lokal-oberflächliche Entzündungen wie Follikulitis, Furunkel, Karbunkel, Impetigo contagiosa oder tiefe Prozesse wie z.B. Otitis media, Abszess, Mastitis puerperalis, Osteomyelitis und Parotitis. Für Staphylokokken charakteristische generalisierte Krankheitsbilder sind z.B. Sepsis und Endokarditis. Der Erreger lässt sich je nach Lokalisation aus Eiter, Abstrichen, Sputum, Blut bzw. Liquor cerebrospinalis sowie entnommenen Katheterspitzen bzw. Endoprothesen nachweisen. Bei der Pathogenese wirken zahlreiche extrazelluläre bzw. zellwandassoziierte Proteine zusammen, die man als Virulenzfaktoren bezeichnet. Sie dienen der Adhäsion, Evasion der Wirtsabwehr und der Invasion. Zu den Virulenzfaktoren, von denen mehr als 40 beschrieben sind, zählen u.a. Protein A, Clumping Factor A und B, Plasmakoagulase, Teichonsäure und Enzyme wie (Metallo-) Proteasen oder die hitzestabile DNase. Protein A beispielsweise ist ein Zellwand-Oberflächenprotein, bindet spezifisch den Fc-Teil dreier IgG-Klassen und wirkt antiphagozytär. Der Clumping Factor ist ein zellwandständiges Protein, der als Rezeptor für Fibrinogen wirkt. Dadurch vermittelt er als Virulenzfaktor die Bindung von Staphylokokken an Fibrinogen in verletztem Gewebe. Auch medizinische Produkte, an denen sich Fibrinogen zuvor angelagert hat (z.B. Implantate oder Katheter), können somit leichter durch *S. aureus* besiedelt werden. Weitere Virulenzfaktoren sind Exfoliativtoxine, Staphylokokken-Enterotoxine (SE), porenformende Toxine wie  $\alpha$ -Toxin (  $\alpha$ -Hämolysin) und Bikomponenten-Leukocidine sowie das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin 1 (TSST-1). Der Virulenzfaktor Leukozidin (Panton-Valentine-Leukozidin, PVL) behindert die Phagozytose, indem er polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen zerstört (1,2).

Auch sogenannte Phenol-lösliche Moduline (PSM) werden von *S. aureus* sezerniert, die wohl eine der Hauptursachen für deren Virulenz sind. Diese Peptide können neutrophile

Granulozyten nach deren Anlockung und Aktivierung lysieren und haben somit die Fähigkeit, die größte zelluläre Abwehr gegen eine *S. aureus* Infektion auszuschalten (5).

### 1.1.4 Epidemiologie

*S. aureus* ist ein wandlungsfähiges Pathogen, das erheblich für Morbidität und Mortalität in Gesundheitseinrichtungen und bei ambulant erworbenen Infektionen verantwortlich ist (6). In den meisten Ländern<sup>1</sup> ist<sup>2</sup> *S. aureus* der häufigste Erreger von Bakteriämien, Haut- und Weichteilinfektionen sowie von Infektionen der unteren Atemwege (7).

Die Hauptursache für Krankenhaus assoziierte Infektionen in den USA ist<sup>3</sup> *S. aureus* (8). 51% der Fälle von *S. aureus*-Infektionen treten nosokomial oder in Verbindung mit einer Gesundheitseinrichtung auf (9).

Schätzungsweise 20 % gesunder Menschen sind nahezu immer Träger eines *S. aureus* Stamms. Etwa 60 % der Bevölkerung sind intermittierend mit *S. aureus* besiedelt und nur eine Minderheit der Menschen (20 %) ist fast nie mit *S. aureus* besiedelt (10,12). Eine Kolonisation mit *S. aureus* Stämmen birgt das erhöhte Risiko, eine Infektion durch diese Stämme zu erleiden. Meistens kommt es durch die Hände von Klinikpersonal zu einer nosokomialen Übertragung. Die Mitarbeiter haben den Keim durch den Kontakt mit einem infizierten Patienten oder von ihrem eigenen Reservoir (3). Erhöhte Raten von *S. aureus*-Kolonisation finden sich beispielsweise bei Menschen mit intravenösem Drogenmissbrauch (13) sowie bei Menschen, die an AIDS leiden (14). Ebenfalls erhöhte Kolonisationsraten mit *S. aureus* haben Patienten mit Typ 1 Diabetes (15), bei denen überdurchschnittlich viele *S. aureus*-Infektionen auftreten können (16). Ähnlich hohe Risiken für eine Infektion mit *S. aureus* haben Menschen mit einem Krebsleiden oder rheumatoider Arthritis. Ein deutlich höheres relatives Risiko für eine *S. aureus*-Infektion haben Patienten, die sich in Hämodialyse oder Peritonealdialyse befinden (9). Weiterhin bleibt *S. aureus* auch ein großes Problem für kranke und gesunde Neugeborene (17) sowie bei chirurgischen Patienten (18).

---

<sup>1</sup> USA, Kanada, Europa, Lateinamerika und der Westpazifik

<sup>2</sup> beschrieben für den Zeitraum zwischen Januar 1997 und Dezember 1999

<sup>3</sup> in einem Beobachtungszeitraum von 7 Jahren (1998 ó 2005)

Die Zunahme invasiver Infektionen -in den letzten 70 Jahren weltweit- ist mutmaßlich auch auf die Verbreitung virulenter und teils auch Medikamenten-resistenter Stämme zurückzuführen. Gerade die Kombination aus antibiotischer Resistenz zusammen mit hoher Virulenz macht *S. aureus* zu einem gefährlichen Erreger. Diese Infektionen in den Griff zu bekommen, ist eine große Herausforderung (19,20).

### 1.1.5 Resistenzen

Ein großes Problem für die Behandlung von Infektionen sind Resistenzen gegen Antibiotika. Eine Reihe von Faktoren ist schuld an den immer mehr werdenden resistenten bakteriellen Stämmen. Zu diesen Faktoren zählen der ausgedehnte und teilweise unangebrachte Gebrauch von antimikrobiellen Substanzen sowie der intensive Gebrauch dieser Mittel als Wachstumsbeschleuniger in Tierfutter. Durch die Zunahme regionaler und internationaler Reisen ist es einfacher für die resistenten Stämme, geographische Barrieren zu überwinden (21).

In den 1940er Jahren entwickelte *S. aureus* sehr schnell Resistenzen zum ersten bekannten Antibiotikum überhaupt: dem Penicillin. Dies gelang dem Pathogen durch den Erwerb der Penicillinase. Nur ein Jahr nachdem Penicillinase-resistentes Methicillin eingeführt wurde, fand man bereits resistente Stämme. Diese ersten MRSA-(Methicillin-resistente *S. aureus*) Stämme breiteten sich nachhaltig in den nächsten Jahrzehnten auf einem weltweiten Level aus (20).

## 1.2 Immunantwort der neutrophilen Granulozyten

Von den intravasalen neutrophilen Granulozyten zirkulieren in etwa 50 % frei im Blut, wohingegen die andere Hälfte an Gefäßendothelzellen haftet und bei Bedarf schnell ins Blut freigesetzt wird. Die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten machen ca. 60 % der Leukozyten im peripheren Blut aus. Sie gehören zu den Phagozyten ('Fresszellen') und leben nur wenige Stunden bis Tage (22). Sie sind die bedeutendste zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems und spielen eine große Rolle bei der Beseitigung von eindringenden Bakterien wie *S. aureus* (19).

Durch Chemokine werden sie an den Ort der Entzündung aus dem Gefäßlumen in den extravasalen Raum rekrutiert (23). Obwohl schon viele Chemokine beschrieben sind, bilden sie eine auffallend homogene Familie (24), die man in 4 Subfamilien gliedert (CXC, CC, CX3C und C). Chemokine sind kleine lösliche Proteine, die ihre Funktion durch Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln (25). Das in dieser Arbeit fokussierte IL-8 wirkt proinflammatorisch und gehört zu der Gruppe der CXC-Chemokine (26).

Die Wanderung neutrophiler Granulozyten hin zur Gewebeschädigung und an den Ort bakteriellen Eindringens wird als Chemotaxis bezeichnet. Erstbeschreiber der Chemotaxis war Pfeffer, der es 1884 als eine Wanderung von Leukozyten entlang eines chemischen Gradienten beschrieb (27). Chemotaxis ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut und oder dem Knochenmark als Antwort auf chemotaktische Faktoren mobilisiert werden. Körpereigene Moleküle wie z.B. Interleukin-8 (IL-8, CXCL8), GRO (CXCL1), 'granulocyte chemotactic protein 2' (GCP2, CXCL6) sowie der Komplementfaktor C5a rekrutieren neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion (28). Zellwandbestandteile von *S. aureus* stimulieren die Produktion von Komplementfaktor C5a (29). Ebenso wirken bakterielle Produkte wie 'formylated peptides' als Chemoattraktantien (27).

Neutrophile Granulozyten sezernieren außerdem selbst ebenfalls IL-8 z.B. nach einer Stimulation mit LPS oder TNF- (30). Verschiedene Studien berichten von einer IL-8-Ausschüttung in Zusammenhang mit *S. aureus*, so produzieren beispielsweise mit *S. aureus* infizierte Endothelzellen IL-8 (31). Die kapsulären Polysaccharide CP5 und CP8 von *S. aureus* triggern bei Monozyten sowie Epithel- und Endothelzellen u.a. eine

IL-8-Ausschüttung (32). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass *S. aureus*-Lipoteichonsäure die Produktion von IL-8 durch periphere Blutmonozyten induziert (33).

### 1.2.1 Phagozytose

Sind die neutrophilen Granulozyten am Ort der Infektion angekommen, so beginnt der Prozess der Phagozytose, bei dem invasive Mikroorganismen gebunden und aufgenommen werden. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Beseitigung der Bakterien während einer Infektion (19).

Neutrophile Granulozyten erkennen viele Moleküle, die von Bakterien produziert werden, wie z.B. Lipoteichonsäure und Lipopolysaccharide. Diese Moleküle sind bekannt als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und interagieren mit 'pattern-recognition receptors' (PRRs). Solche Rezeptoren, zu denen auch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) zählen, exprimieren neutrophile Granulozyten auf ihrer Oberfläche. Neutrophile TLRs aktivieren Signalwege, die das Überleben der Zelle verlängern, die Adhäsion verbessern und die Phagozytose vorantreiben (28). Die Wichtigkeit der TLRs unterstreicht eine Studie, in der TLR2-Knockout-Mäuse eine höhere Sterblichkeit als Wildtyp-Mäuse nach einer Inokulation mit *S. aureus* hatten (34).

Nachdem der Erreger an der Zelloberfläche gebunden und inkorporiert wurde, entsteht ein von der Zellmembran umschlossenes Gebilde, das sogenannte Phagosom. Bei der anschließenden Fusion verschmelzen enzymhaltige Granula mit dem Phagosom und durch zytotoxische Substanzen können die phagozytierten Mikroorganismen abgetötet werden (23). Desweiteren wirken Sauerstoffradikale toxisch auf die Bakterien, welche die neutrophilen Granulozyten mithilfe einer NADPH-abhängigen Oxidase bilden (22). Eine abrupte Steigerung des oxidativen Stoffwechsels im Rahmen der Phagozytose bezeichnet man als 'respiratory burst' (23). Als Eiter (Pus) wird die beim Abbau von phagozytiertem Material entstehende Mischung aus neutrophilen Granulozyten und eingeschmolzenem Gewebe bezeichnet. Da die neutrophilen Granulozyten mittels Glykolyse ihre Energie gewinnen können, haben sie die Möglichkeit, in Eiter zu überleben und ihre Funktion zu erfüllen (22).

### 1.2.2 Opsonisierung

Die Effizienz der Phagozytose wird verbessert, wenn die Bakterien durch Proteine des Menschen opsonisiert sind. Zu den Opsoninen zählen Komplementfaktoren und Antikörper. Mit Komplementfaktoren opsonisierte Erreger werden von den Komplement-Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten gebunden. Hierzu zählen: ClqR, CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3) und CD11c/CD18 (CR4). Von Antikörpern gebundene Bakterien werden durch Fc-Rezeptoren auf den Granulozyten erkannt. Diese Rezeptoren haben folgende Namen: CD16 (Fc RIIIb, IgG receptor), CD23 (Fc RI, IgE receptor), CD32 (Fc RIIa, IgG receptor), CD64 (Fc RI, IgG receptor), und CD89 (Fc R, IgA receptor). Die gemeinschaftlichen Maßnahmen von Antikörper- und Komplementrezeptoren sowie von pattern-recognition receptors und Molekülen begünstigen eine gut funktionierende Phagozytose von Erregern (28).

### 1.3 Das Adipokin Adiponektin

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass das Fettgewebe nicht nur als Speicherort für überschüssige Energie in Form von Triglyceriden dient. Es fungiert auch als ein endokrin aktives Organ und sezerniert viele aktive biologische Mediatoren, die man als Adipokine bezeichnet (35). Die vorliegende Arbeit legt den Focus auf das Adipokin Adiponektin. Bekannt ist Adiponektin auch noch unter den Namen Acrp30, AdipoQ und GBP28 (36).

Anfangs vermutete man, dass Adiponektin ausschließlich in Adipozyten gebildet wird (37). Spätere Studien zeigten jedoch, dass Adiponektin in kleinen Mengen auch in der Leber (38), der Plazenta (39) und in der Darmmukosa (40) produziert werden kann. Auch für die Kardiomyozyten (41), die braunen Adipozyten (42), die Epithelzellen der Speicheldrüsen (43) und die Skelettmuskulatur (44) wurde dies bereits beschrieben.

#### 1.3.1 Aufbau von Adiponektin

Adiponektin besteht aus 247 Aminosäuren und weist 4 Domänen auf. Am N-Terminus befindet sich eine Signalpeptidstruktur, gefolgt von einer variablen Region und einer Kollagenomäne. Am C-terminalen Ende ist eine globuläre Domäne, die starke Ähnlichkeit mit dem Komplementfaktor C1q besitzt (37,45).

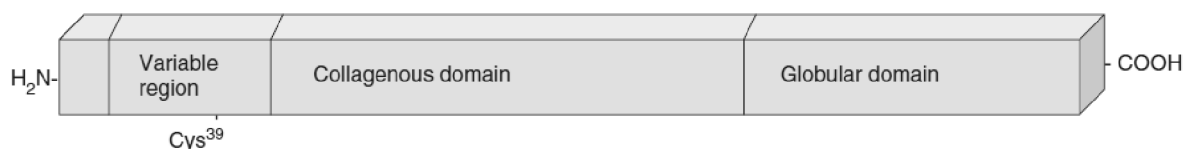


Fig. 1 Structure of adiponectin.

Abbildung 1 aus (45)

Adiponektin existiert sowohl als 'full-length' Adiponektin (fAd) als auch als proteolytisches Spaltfragment. Dieses Spaltfragment heißt auch globuläres Adiponektin (gAd) und besteht aus der globulären C-terminalen Domäne (46). Man geht davon aus, dass dieser Spaltungsprozess hin zum globulären Fragment von Adiponektin durch eine Leukozyten

Elastase vermittelt wird, welche von aktivierten Monozyten und/oder neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird (47). FAd existiert als Trimer (low-molecular-weight Adiponektin) und Hexamer (middle-molecular-weight Adiponektin), welches dann auch weiter zu einem Polymer (high-molecular-weight Adiponektin) oligomerisieren kann (46).

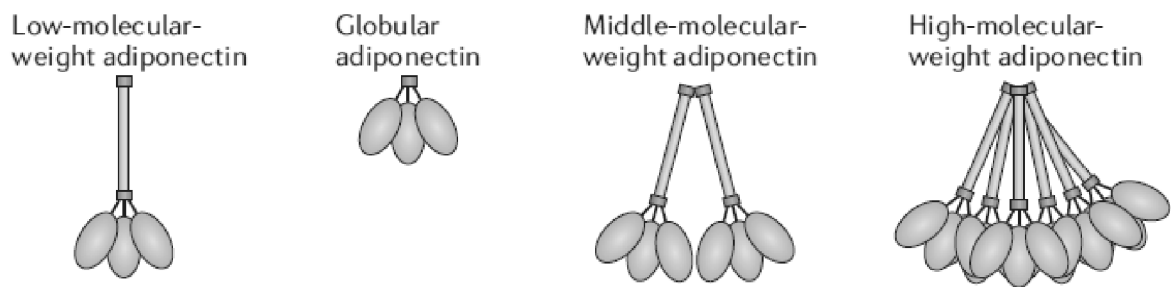


Abbildung 2 aus (46)

Bei Erwachsenen beträgt die Plasmakonzentration zwischen 0,5 und 30 mg/l. Im Durchschnitt stellt Adiponektin ungefähr 0,01 % aller Plasmaproteine. Das ist  $10^3$  mal mehr als Leptin, das erste und am besten erforschte Adipokin, und  $10^6$  mal mehr als andere Zytokine, beispielsweise TNF- (35). Das für Adiponektin kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 3q27 (48).

### 1.3.2 Adiponektin-Rezeptoren

Als Adiponektin-Rezeptoren wurden die beiden Rezeptoren AdipoR1 (375 AS) und AdipoR2 (311 AS) beschrieben, die beide 7 Transmembrandomänen enthalten. Eine Besonderheit verglichen mit anderen 7-Transmembran-Rezeptoren ist die Tatsache, dass sich das N-terminale Ende im Zytoplasma und das kleine C-terminale Ende mit ungefähr 25 AS extrazellulär befindet (49,50).

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von Adiponektin zu C1q könnte es sehr gut sein, dass auch der Rezeptor C1qRp einer der Rezeptoren für Adiponektin ist (51).

### 1.3.3 Adiponektin im Metabolismus

Im Gegensatz zu vielen Adipokinen, wie Leptin, TNF- $\alpha$ , Resistin, etc., die bei adipösen Individuen überproduziert werden und eine schädliche Wirkung auf die Insulinsensitivität, den Lipoproteinmetabolismus und das kardiovaskuläre System haben, so scheint Adiponektin ein besonderes Adipokin mit hauptsächlich 'gesundheitsfördernder' Wirkung zu sein. Interessanterweise haben adipöse Menschen eine geringere Adiponektin-Produktion als dünnere Leute. Adiponektin besitzt vorzugsweise positive Effekte wie z.B. die Erhöhung der Insulinsensitivität, die Stimulierung der Fettsäureoxidation sowie die Unterdrückung von Entzündungsreaktionen (35). Es gibt jedoch noch einige Diskussionen über die antiinflammatorischen Eigenschaften, da es bei manchen entzündlichen Erkrankungen zu einer Abnahme der Blutplasmakonzentration kommt, wohingegen bei anderen entzündlichen Zuständen ein Anstieg des Adiponektins im Blut auftritt. In einer Reihe von Zelltypen und Tiermodellen hat Adiponektin sowohl entzündungshemmende als auch entzündungsfördernde Aktivitäten gezeigt (52).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Adiponektin wird als Adipokin mit antiinflammatorischer Funktion beschrieben (53). Es gibt jedoch auch Arbeiten, in denen proinflammatorische Funktionen von Adiponektin aufgezeigt werden konnten (54). Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zu der bereits bestehenden Literatur über Adiponektin im Kontext von Entzündung zu leisten. Da in anderen Studien die Existenz von Adiponektin-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten beschrieben wurde, (55,56) sollen in dieser experimentellen Arbeit mögliche Interaktionen zwischen Adiponektin und neutrophilen Granulozyten aufgezeigt werden. Die neutrophilen Granulozyten werden jeweils frisch durch eine venöse Blutentnahme bei humanen Spendern gewonnen, um eine praxisrelevante Situation zu schaffen.

Es soll zum einen untersucht werden, ob Adiponektin einen Einfluss auf das 'Killing'-Verhalten von neutrophilen Granulozyten hat. Desweiteren soll untersucht werden, ob Adiponektin einen Einfluss auf die Zytokinsekretion (am Beispiel von IL-8) neutrophiler Granulozyten hat. Hierzu werden neutrophile Granulozyten mit LPS und einem klinischen *S. aureus*-Isolat (Stamm PS80) stimuliert. *S. aureus* wurde ausgewählt, da es sich dabei um ein (hoch-)relevantes Pathogen handelt (57). In den Versuchen sollen lebendige Bakterien verwendet werden, um eine möglichst praxisrelevante Situation zu schaffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

|   |                            |
|---|----------------------------|
| Analysenwaage AC 210 S                    | Sartorius                  |
| Analysenwaage PT 120                      | Sartorius                  |
| Autoklav                                  | Fedegari Autoclavi Spa     |
| Autoklav                                  | Tecnomara Deutschland GmbH |
| ELISA-Reader Emax                         | Molecular Devices          |
| FACS Epics XL MCL                         | Beckman Coulter            |
| IBS Pipetboy acu                          | Integra Biosciences        |
| Inkubationsschrank 37° 5% CO <sub>2</sub> | Heraeus Instruments        |
| Magnetrührer MR 2002                      | Heidolph                   |
| Mikroskop DM IL                           | Leica                      |
| Multipipette plus                         | Eppendorf                  |
| Nanophotometer                            | Implen                     |
| pH-Meter CG 840                           | Schott                     |
| Pipettensatz                              | Eppendorf                  |
| Reagenzglasrotator                        | BIOSAN                     |
| Schüttelgerät KS 260 basic                | IKA                        |
| Sterilbank Laminair HB 2448               | Heraeus                    |
| Tischzentrifuge Biofuge fresco            | Heraeus                    |
| Transferpette ó 8                         | Brand                      |
| Vakuumpumpe                               | KNF Neuberger              |
| Vortex-2 Genie                            | Scientific Industries      |
| Wasserbad                                 | GFL                        |
| Zellzählkammer, Tiefe 0,100 mm            | Neubauer improved CE       |
| Zentrifuge Megafuge 1.0 R                 | Heraeus                    |

Zentrifuge Multifuge 3 S-R

Heraeus

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Butterfly Safety-Multifly-Set

Sarstedt

CaSo-Agar-Platten

Mikrobiologie Uniklinikum

Regensburg

ELISA-Platte (96 Loch)

nunc

Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)

BD Falcon

Mucasept-A Lösung

MERZ

Pasteurpipetten

Roth

Perfusion Spritze (50 ml)

BD (Becton Dickinson)

Pipettenspitzen

Sarstedt

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)

Eppendorf

Serum Monovette

Sarstedt

Vakuum Filtrationssystem 50 ml

Merck Millipore

Vakuum Filtrationssystem 500 ml

TPP

Zellkulturplatten (96 Loch)

Corning Costar

### 2.1.3 Chemikalien

Adiponektin, human, rekombinant

R&D Systems

BSA

Sigma

BSA (Fraktion 5)

Biomol

Citrat-Dextrose-Lösung

Sigma

Dextran Clinical Grade

MP Biomedicals, LLC

di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat

Roth (für PBS)

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

PAA

|   |                      |
|---|----------------------|
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline                            | Sigma                |
| Eosin Y Lösung, wässrig   | Sigma-Aldrich        |
| FCS   | Sigma                |
| Ficoll-Paque PLUS   | GE Healthcare        |
| gAcrp30, human, rekombinant<br>(adipolean variant nr. 450 - 20) | PeptoTech            |
| Gentamicin solution   | Sigma                |
| HUMAN IgG   | Sigma                |
| Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%                                    | Braun                |
| Kaliumchlorid   | Merck (für PBS)      |
| Kaliumdihydrogenphosphat  | MERCK (für PBS)      |
| LPS   | Alexis               |
| Mayers Hämatoxylinlösung  | Sigma-Aldrich        |
| NaCl  | Roth                 |
| NaCl Pulver   | Merck                |
| Paraformaldehyde (Pulver)                                       | Sigma                |
| Saponin practical grade   | ICN Biomedicals Inc. |
| Serumfreies Medium (AIM ó V Medium CTS)                         | Invitrogen           |
| TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)                            | Sigma                |
| TSB (Tryptic Soy Broth)   | Sigma                |
| Tween 20  | Sigma                |

### 2.1.4 Kit Systeme

|  |                       |
|--|-----------------------|
| ELISA MAX Standard SET Human IL-8                            | BioLegend             |
| Fluorokine - Biotinylated Human Adiponektin/Acrp30           | R&D Systems           |
| Monocyte Isolation Kit II, human                             | MACS, Miltenyi Biotec |
| Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Chromogenic<br>Endpoint Assay | Hycult Biotech        |

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

Im folgenden Abschnitt wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

### 2.1.5.1 Lösungen für die Isolierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

#### **Dextran-Lösung:**

|                              |     |    |
|------------------------------|-----|----|
| Dextran Clinical Grade       | 15  | g  |
| Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% | 500 | ml |

Anschließend wurde die Lösung steril filtriert. Die Dextran-Lösung wurde immer am Versuchstag hergestellt.

#### **0,2 % NaCl-Lösung:**

|                 |     |    |
|-----------------|-----|----|
| NaCl            | 1   | g  |
| steriles Wasser | 500 | ml |

#### **1,6 % NaCl-Lösung:**

|                 |     |    |
|-----------------|-----|----|
| NaCl            | 8   | g  |
| steriles Wasser | 500 | ml |

Anschließend wurden beide Lösungen (0,2 % und 1,6 %) steril filtriert. Die beiden NaCl-Lösungen wurden immer am Versuchstag hergestellt.

### Zusätzliche Lösung für die Monozyten-Isolierung

#### MACS-Puffer:

|      |         |
|------|---------|
| PBS  | 1000 ml |
| BSA  | 0,5 %   |
| EDTA | 2 mM    |

#### 2.1.5.2 Lösung für das Erstellen einer gewünschten *S. aureus*-Konzentration

#### Nährmedium:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| TSB-Pulver           | 30 g    |
| destilliertes Wasser | 1000 ml |

Nach dem Auflösen von TSB-Pulver wurde die Lösung autoklaviert.

#### 2.1.5.3 Lösungen für Killing-Assay

#### 0,05 % Saponin:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Saponin         | 0,25 g |
| steriles Wasser | 500 ml |

Die Lösung wurde immer am Versuchstag hergestellt. Nach dem Auflösen von Saponin wurden 50 ml Lösung zur weiteren Verwendung steril filtriert.

**1 % BSA in DMEM:**

|                  |     |    |
|------------------|-----|----|
| DMEM             | 50  | ml |
| BSA (Fraktion 5) | 0,5 | g  |

Nach dem Auflösen von BSA wurde das Medium noch steril filtriert. Die Lösung wurde immer am Versuchstag hergestellt.

**2.1.5.4 Lösungen für IL-8-Elisa****Assay Diluent:**

|     |    |    |
|-----|----|----|
| FCS | 5  | ml |
| PBS | 45 | ml |

Der Assay Diluent wurde immer am Versuchstag hergestellt.

**Coating-Puffer:**

|                                 |      |    |
|---------------------------------|------|----|
| NaHCO <sub>3</sub>              | 8,4  | g  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 3,56 | g  |
| Wasser                          | 1000 | ml |
| pH                              | 9,5  |    |

Der Coating-Puffer wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

**Waschpuffer:**

|         |      |    |
|---------|------|----|
| PBS     | 2000 | ml |
| Tween20 | 1    | ml |

**PBS:**

|                                     |      |    |
|-------------------------------------|------|----|
| NaCl                                | 8    | g  |
| KCl                                 | 0,2  | g  |
| Kaliumdihydrogenphosphat            | 0,2  | g  |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat | 1,44 | g  |
| Millipore-Wasser                    | 1000 | ml |

**Stopplösung:**

|                                    |     |    |
|------------------------------------|-----|----|
| destilliertes Wasser               | 946 | ml |
| 96% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 54  | ml |

**2.1.5.5 Lösungen für Durchflusszytometrie****1 X Waschpuffer:**

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| Steriles Wasser  | 9 | ml |
| 10 X Waschpuffer | 1 | ml |

**Formaldehyd 4 % in PBS:**

|                                      |      |    |
|--------------------------------------|------|----|
| Paraformaldehyde (Pulver)            | 40   | g  |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | 1000 | ml |

Beide Lösungen wurden immer am Versuchstag hergestellt.

**2.1.5.6 Lösung für LPS-Assay****Stopplösung:**

|                                |    |    |
|--------------------------------|----|----|
| destilliertes Wasser           | 15 | ml |
| 2,5x konzentrierte Stopplösung | 10 | ml |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten aus venösem Blut

Alle freiwilligen Spender wurden über den Versuch und somit über die Verwendung ihrer neutrophilen Granulozyten und Monozyten vorab informiert. Bei den Blutspendern handelt es sich um gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 40 Jahren.

Am Vortag des Versuchs wurde ein 3-Ösen-Ausstrich von *S. aureus* angefertigt und über Nacht in den 37 ° Raum gestellt.

Angelehnt an die Beschreibung 'Isolation of human neutrophils from venous blood' von William M. Nauseef (58) entstand das Versuchsprotokoll. Am Versuchstag wurde unter der Sterilbank eine 50 ml Perfusorspritze mit 23 ml Dextran-Lösung und 2 ml Citrat-Dextrose-Lösung gefüllt. Anschließend wurden 25 ml venöses Blut entnommen. Unmittelbar nach der Blutabnahme invertierte man die Perfusorspritze 10-fach, um die Citrat-Dextrose in der Spritze mit dem Blut zu vermischen und um dadurch eine Gerinnung zu verhindern. Danach wurde die Perfusorspritze für 1 Stunde senkrecht aufgestellt, sodass die Erythrozyten beschleunigt durch das Dextran sedimentierten.

Nach einer Stunde machte man einen Transfer des Leukozyten-reichen Plasmas (LRP) über eine Butterfly Nadel in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. In ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen, gefüllt mit 15 ml Ficoll, wurde das LRP geschichtet. Dieser Schritt erforderte höchste Vorsicht und man musste mit dem Pipet Boy auf langsamster Stufe arbeiten, sodass sich das LRP nicht mit dem Ficoll vermischte, sondern dass Ficoll weiterhin die untere Schicht bildete und darauf schwimmend das LRP lag. Es folgte ein Zentrifugationsschritt ohne Bremse bei 850 g für 20 min und bei Raumtemperatur (RT).

Entsprechend des Ficoll-Dichtegradienten ergibt sich nun folgendes Bild: Im Spitzboden des Falcon-Röhrchens finden sich die Granulozyten zusammen mit Erythrozyten, während sich Lymphozyten, Monozyten, basophile Granulozyten und Thrombozyten als Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll befinden.

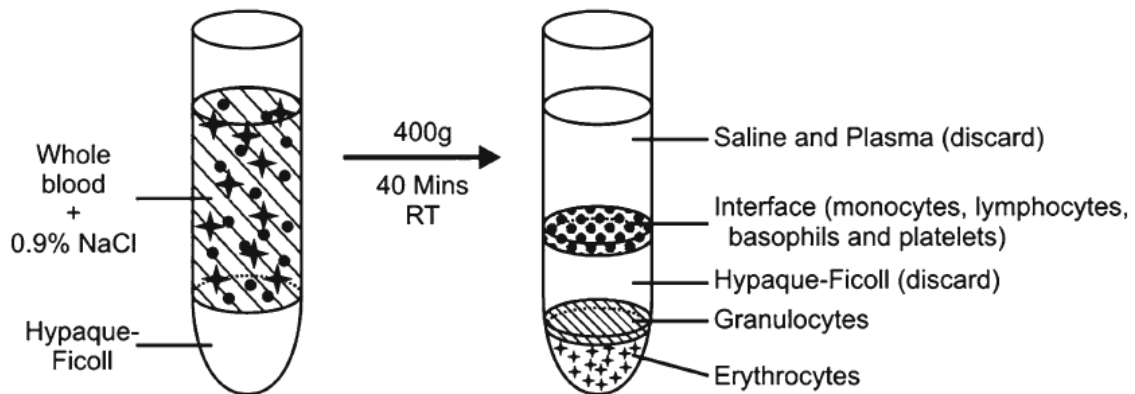


Abbildung 3 aus (58)

Mit einer Vakuumpumpe wurde nun der Überstand (u.a. Plasma, PMBCs und Ficoll) abgesaugt. Anschließend wurden die übrigen Erythrozyten im Zellpellet durch Zugabe von 8 ml 0,2 % NaCl hypoton lysiert. Um die Lyse zu stoppen, wurde durch Zugabe nach 20 sec von 8 ml 1,6 % NaCl die Suspension wieder isoton gemacht. Es folgte eine Zentrifugation bei 170 g für 5 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Lyse-Schritt wurde 1-mal wiederholt. Nun wurden die neutrophilen Granulozyten in 5 ml serumfreien Medium (auf 37 ° erwärmt) resuspendiert und hiervon 10  $\mu$ l in der Neubauer Zählkammer ausgezählt, um die Zellzahl zu ermitteln. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Granulozyten/ml gebracht.

### **2.2.2 HE-Färbung: Überprüfung der Isolierungsmethode**

Um die Reinheit der Isolierungsmethode von neutrophilen Granulozyten zu überprüfen, wurde stichprobenartig eine HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde eine Suspension neutrophiler Granulozyten auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Antrocknen der Suspension, wurde der Objektträger kurz durch eine Flamme gezogen. Anschließend wurde der Objektträger in Hämalaun getaucht. Hierauf folgte ein vorsichtiges Spülen mit wenig Wasser und darauffolgend die Färbung des Objektträgers mit Eosin. Mit Hilfe eines Öltropfens wurden die Zellen bei 100-facher Vergrößerung begutachtet und ausgezählt.

### **2.2.3 Vorstimulierung neutrophiler Granulozyten mit Adiponektin**

Adiponektin wurde in der gewünschten Konzentration zur Granulozyten-Suspension (Bereitstellung siehe 2.2.1) gegeben. In 2 ml Eppendorf Cups rotierten sowohl die Granulozyten-Proben mit Adiponektin als auch die Granulozyten-Kontrollproben ohne Adiponektin für 60 min im 37 ° Raum auf dem Reagenzglasrotator. Der Reagenzglasrotator wurde eingestellt auf 90 Gradwinkel  $\pm$  30/min  $\pm$  2 sec Pause. Auch bei allen weiteren Schritten wurde der Reagenzglasrotator auf 90 Gradwinkel  $\pm$  30/min  $\pm$  2 sec Pause eingestellt.

### **2.2.4 Erstellen einer definierten Bakteriensuspension**

In Vorversuchen (siehe Ergebnisteil 3.2) wurde bestimmt, welche optische Dichte (OD) von *S. aureus*-Suspension welcher Konzentration dieser Bakterien entspricht. Somit konnte am Versuchstag durch eine bestimmte OD von *S. aureus*-Suspension der MOI zwischen neutrophilen Granulozyten und *S. aureus* wie gewünscht eingestellt werden.

Aus der am Vortag ausgestrichenen *S. aureus* CaSo-Agar-Platte wurden mit einer Öse Bakterien aufgenommen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen in 5 ml PBS suspensiert. Am Photometer wurde bei 650nm gemessen und die Bakteriensuspension auf eine optische Dichte von 0,340 gebracht (Toleranzbereich 0,330  $\pm$  0,350).

Durch eine Verdünnungsreihe von  $10^{-7}$  in Nährmedium mit anschließendem Ausplattieren auf 2 Caso-Agar-Platten wurde die Konzentration von *S. aureus*-Suspension überprüft. Die beiden Platten und eine Nährmediumkontrolle in einem 50 ml Falcon-Röhrchen kamen über Nacht in den  $37^\circ$  Raum. Eine trübe Nährmediumkontrolle signalisierte, dass es womöglich zu einer Kontamination mit anderen Bakterien kam und machte den gesamten Granulozyten-Inkubationsversuch ungültig. Die CFU (colony-forming units) der beiden Platten wurden am Folgetag ausgezählt und dienten der Bestätigung der in den Vorversuchen ermittelten Korrelation zwischen OD und Konzentration.

### **2.2.5 Herstellen von autologem Serum**

Für die Opsonisierung von *S. aureus* benötigte man autologes Serum, welches man durch Blutabnahme in eine Serum-Monovette gewann. Das Serumröhrchen wurde nach Koagulation bei 1660 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und unmittelbar weiter verwendet.

### **2.2.6 Killing-Assay**

Wie unter 'Isolierung neutrophiler Granulozyten aus venösem Blut' beschrieben, wurden neutrophile Granulozyten auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$ /ml gebracht mit dem einzigen Unterschied, dass hierfür als Medium DMEM mit 1 % BSA (Fraktion 5) verwendet wurde. Desweiteren benötigte man opsonierte *S. aureus*. Um die Bakterien zu opsonieren, wurden 330  $\mu$ l der Bakteriensuspension (siehe 2.2.4) mit 570  $\mu$ l Medium und 100  $\mu$ l autologem Serum in einem 2 ml Eppendorf Cup für 20 min im  $37^\circ$  Raum auf dem Reagenzglasrotator rotiert. Der Reagenzglasrotator wurde eingestellt auf 90 Grad Drehung  $\acute{o}$  30/min  $\acute{o}$  2 sec Pause. Anschließend wurde die opsonierte Bakteriensuspension bei 7000g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Pellet mit 1 ml Medium resuspendingiert. Diese Suspension opsonierter Bakterien entspricht einer MOI von 1:10 bei Einhaltung der Mischverhältnisse (siehe 2.2.7). Eine MOI von 1:1 entstand, indem 100 ml der obigen Suspension mit 900 ml Medium gemischt wurden.

Zur Herstellung einer Probe mit nicht opsonierten *S. aureus* wurde die Bakteriensuspension (siehe 2.2.4) ebenfalls für 20 min auf dem Reagenzglasrotator rotiert und setzte sich wie folgt zusammen: 330 µl Bakteriensuspension + 570 µl Medium + 100 µl PBS.

Für das Killing-Assay wurde fAd verwendet. Nachdem die neutrophilen Granulozyten, wie unter 'Vorstimulierung neutrophiler Granulozyten mit Adiponektin' beschrieben, mit Adiponektin vorstimuliert wurden, entstanden die Ansätze aus 500µl Granulozytensuspension sowie jeweils hinzugegebener 110 µl Bakteriensuspension. Bei den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min und 120 min wurden jeweils 75 µl entnommen, mit 925 µl Saponin Lösung vermischt, mit dem Schüttler (Vortex-2 Genie) homogenisiert und für 10 min auf Eis gestellt. Durch eine Verdünnungsreihe in Nährmedium und anschließendem Ausplattieren auf je 2 CaSo-Agar-Platten konnte durch Auszählen der CFU am Folgetag das stattgefundene 'Killing' ermittelt werden. Über den Zeitraum von 120 min befanden sich die Ansätze im 37° Raum auf dem Reagenzglasrotator eingestellt auf 90 Grad Drehung ó 30/min ó 2 sec Pause.

### **2.2.7 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit Adiponektin und Inkubation mit LPS und *S. aureus***

Eine mit Adiponektin vorstimulierte Versuchsreihe wurde mit einer Versuchsreihe ohne weiteren Zusatz als Kontrollgruppe (siehe 2.2.3) verglichen. Aus beiden Versuchsreihen entstanden jeweils 4 Ansätze: Negativansatz (ohne weitere Stimulation), mit LPS stimulierter Ansatz, mit *S. aureus* (MOI 1:1) und mit *S. aureus* (MOI 1:10) stimulierter Ansatz.

Für die Herstellung der Negativansätze gab man zu 500 µl Granulozytensuspension 110 µl serumfreies Medium. Für die LPS-Ansätze wurde zunächst das LPS in serumfreiem Medium auf eine Konzentration von 10 µg/ml gebracht (LPS-Verdünnung). Danach gab man zu 500 µl Granulozytensuspension 61 µl der LPS-Verdünnung sowie 49 µl des serumfreien Mediums, sodass sich eine LPS-Konzentration von 1 µg/ml im Ansatz ergab. Man stellte die *S. aureus*-Ansätze (MOI 1:1 und MOI 1:10) durch Zugabe von 110 µl opsonierter Bakteriensuspension (siehe 2.2.6) zu 500 µl Granulozytensuspension her.

Alle Proben (jeweils 610 µl) befanden sich in 2 ml Eppendorf Cups, da sich darin die Suspension gut vermischen konnte. Alle Proben kamen für 60 min im 37 ° Raum auf den Reagenzglasrotator. Dieser wurde eingestellt auf 90 Grad Drehung ó 30/min ó 2 sec Pause.

Anschließend wurden die Ansätze bei 1800g für 7 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Granulozyten-Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl serumfreien Medium wieder in Lösung gebracht. Allen Proben wurde 1 µl Gentamicin-Lösung zugesetzt, um ein weiteres extrazelluläres Wachstum zu verhindern. Zu den Negativ- und zu den *S. aureus*-Ansätzen wurde noch 50 µl serumfreies Medium hinzugegeben, zu den LPS-Ansätzen 50 µl der LPS-Verdünnung. In die Versuchsreihe mit Adiponektin gab man Adiponektin in der gewünschten Konzentration.

Die Proben wurden auf eine 96-Loch-Platte ausgesät und für 20 Stunden im Brutschrank bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 20 Stunden überführte man die Proben zurück in Eppendorf Cups und es folgte eine Zentrifugation mit 7000g für 5 min bei 37°. Der Überstand wurde in gleicher Anordnung in eine neue 96-Loch-Platte pipettiert und bei -20 Grad für eine spätere IL-8-Bestimmung mittels ELISA aufbewahrt. Das Pellet im Eppendorf Cup wurde verworfen.

### **2.2.8 Isolierung humaner Monozyten aus venösem Blut<sup>4</sup>**

Um die Versuche ebenso mit Monozyten durchführen zu können, wurden Monozyten durch den kommerziellen 'Monocyte Isolation Kit II' im Sinne einer negativen Selektion aus den PBMCs isoliert. Die PBMCs erhielt man analog der Methode 'Isolierung neutrophiler Granulozyten aus venösem Blut', indem man nach der Zentrifugation (ohne Bremse bei 850 g für 20 min) mit Ficoll die PBMCs absaugte. Anschließend wurden in einem magnetischen Feld die 'Nicht-Monozyten' (z.B. T-Zellen, B-Zellen, etc.) durch Antikörper vermittelte Kopplung an sogenannte MicroBeads (Eisenkügelchen) in einer Säule zurückgehalten und Monozyten somit isoliert.

Die Inkubation mit LPS und *S. aureus* wurde analog zu den Versuchen mit neutrophilen Granulozyten durchgeführt.

---

<sup>4</sup> Vielen Dank an Irina Fink (MTA, Uniklinikum Regensburg) für die Hilfe bei der Durchführung dieses Versuchs

### 2.2.9 IL-8-Elisa

Die Konzentration von IL-8 in den Überständen wurde mit dem kommerziellen ELISA MAX Standard SET Human IL-8 (BioLegend) nachgewiesen.

Am Vortag wurde der Erstantikörper 1:200 in Coating-Puffer verdünnt und anschließend 100 µl/Loch auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach dem Versiegeln der Platte mit einer Folie wurde sie über Nacht bei 4 ° im Kühlschrank inkubiert. Zunächst wurde die Platte am Versuchstag 4-fach mit Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde mit einer Mehrkanalpipette 300 µl Waschpuffer in jedes Loch pipettiert und anschließend auf trockenen Papiertüchern ausgeklopft. Es folgte der Blockierungsschritt mit 200 µl Assay Diluent/Loch, um ungewollte Bindungen auf der Platte zu vermeiden. Die versiegelte Platte kam für 1 Stunde bei RT auf einen Schüttler. Während dieser Stunde wurde die Standardreihe hergestellt und die Proben wurden verdünnt, sodass diese im messbaren Bereich lagen. Die Standardreihe wurde in Assay Diluent verdünnt und bestand aus 2-fach Bestimmungen mit 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml und der Blindkontrolle. Um die gemessenen Proben im messbaren Bereich zu haben, mussten die Proben verdünnt werden. Die Negativproben wurden normalerweise mit 1:10, die LPS und die *S. aureus* (MOI 1:1) Proben wurden mit 1:20 und die *S. aureus* (MOI 1:10) Proben mussten mit 1:30 in Assay Diluent verdünnt werden. Es wurden 4-fach Bestimmungen für jede Probe gemacht und der Wert gemittelt. Bevor von den verdünnten Proben und der Standardreihe jeweils 100 µl pro Loch auf die Platte pipettiert wurde, musste zunächst der Waschvorgang der Platte, wie oben bereits beschrieben, 4-fach durchgeführt werden. Die versiegelte Platte kam für 2 Stunden bei RT auf das Schüttelgerät. Es folgte nach den 2 Stunden wieder der Waschschrift in 4-facher Ausführung. Der Detektionsantikörper wurde 1:200 in Assay Diluent verdünnt und anschließend 100 µl davon in ein Loch pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei RT auf dem Schüttelgerät folgte wieder der Waschschrift in 4-facher Ausführung. Nun wurde die Meerrettichperoxidase (Enzym) 1:1000 in Assay Diluent verdünnt und 100 µl davon in ein Loch pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT auf dem Schüttelgerät folgte der Waschschrift in abgewandelter Form. Der Waschpuffer wurde nicht gleich wieder ausgeklopft, sondern man ließ ihn 30-60 sec in jedem Loch, ehe man die Platte auf den trockenen Tüchern ausklopfte. Dies wurde 4-mal wiederholt. Anschließend pipettierte man 100 µl TMB in jedes Loch und inkubierte die Platte im Dunkeln für 15 min. Danach gab man 100 µl Stopplösung in jedes Loch und es folgte die Messung der Signalstärke mit dem

Photometer. Die Messung machte man bei 540nm und subtrahierte davon die Absorption bei 450nm.

### **2.2.10 LPS-Assay<sup>5</sup>**

Um herauszufinden, ob das verwendete Adiponektin mit bakteriellen Endotoxinen kontaminiert ist, verwendeten wir den kommerziellen Limulus Amebocyte Lysate Chromogenic Endpoint Assay (Hycult Biotech). Dieser wird in der Arbeit als LPS-Assay bezeichnet. Das Prinzip dieses Tests ist eine durch Endotoxine ausgelöste Gelbildung in Limulus Amöbocyten Lysat. Dieser Prozess basiert auf einer enzymatischen Reaktion.

Die Proben und die Standardreihe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des LAL Reagens und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde mittels Stopplösung die enzymatische Reaktion beendet. Die Absorption wurde bei 405nm gemessen.

### **2.2.11 Durchflusszytometrie<sup>6</sup>**

Das Vorhandensein von Adiponektin-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Benutzt wurde das Kit System 'Fluorokine - Biotinylated Human Adiponektin/Acrp30' (R&D Systems). Das Prinzip basiert darauf, gewaschene Zellen mit biotinylierten Adiponektin zu inkubieren, welches dann an die Zellen über die Adiponektin-Rezeptoren bindet.

Alle Zentrifugationen wurden mit 100 g bei 4° für 5 min durchgeführt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation nur 1-mal abgegossen.

Einziger Unterschied zum Vorgehen bei 'Isolierung neutrophiler Granulozyten aus venösem Blut' war, dass die neutrophilen Granulozyten nach der hypotonen Lyse noch 1-mal in PBS

---

<sup>5</sup> Vielen Dank an Irina Fink (MTA, Uniklinikum Regensburg) für die Hilfe bei der Durchführung dieses Versuchs

<sup>6</sup> Vielen Dank an Irina Fink (MTA, Uniklinikum Regensburg) für die Hilfe bei der Messung am FACS Gerät

gewaschen wurden, anschließend in Waschpuffer suspensiert und auf die gewünschte Konzentration von  $6 \times 10^6$ /ml gebracht wurden. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der neutrophilen Granulozyten bei RT mit humanen Immunglobulinen, um unerwünschte Fc-Rezeptor bedingte Interaktionen zu blockieren. Ohne einen Waschschrift dazwischen pipettierte man sofort im Anschluss 25  $\mu$ l der Zellsuspension ( $\cong$  150000 Zellen) in ein Röhrchen und inkubierte diese für 45 min mit 10  $\mu$ l des biotinylierten Adiponektin bei 4°. Bei einem Röhrchen wurde das biotinylierte Zytokin zuvor mit im Kit mitgeliefertem 'Adiponektin-blocking Antibody' für 15 Minuten bei RT inkubiert, welche somit eine Negativkontrolle lieferte. Ein weiteres Röhrchen wurde, anstelle mit dem biotinylierten Adiponektin zu inkubieren, mit ebenfalls im Kit mitgeliefertem 'Negative Control Reagent' inkubiert. Bei dem 'Negative Control Reagent' handelt es sich um ein anderes Protein, welches aber genauso biotinyliert ist wie das biotinylierte Adiponektin. Dies stellte die 2. Negativkontrolle dar. Ohne einen Waschschrift dazwischen gab man 10  $\mu$ l Avidin-Fluorescein in die gewünschten Röhrchen und inkubierte für 30 min bei 4° im Dunkeln. Es folgten 2 Waschschriffe mit je 2 ml Waschpuffer und der jeweils dazugehörigen Zentrifugation. Auf das Pellet nach der 2. Zentrifugation gab man 100  $\mu$ l 4% formaldehydhaltiges PBS. Dieser Fixierungsschritt machte es möglich, die Durchflusszytometrie nicht unmittelbar im Anschluss an den Versuch durchführen zu müssen. Nach 10 Minuten fand ein leichtes vorsichtiges Vortexen statt. Die Röhrchen mit den Proben wurden immer im Kühlschrank aufbewahrt und nie später als 4 Tage danach gemessen.

Neben den neutrophilen Granulozyten wurden auch PBMCs untersucht. Nach der Zentrifugation des LRP und dem Ficoll (siehe 2.2.1) wurden 10 ml der PBMCs (sichtbare Schicht zwischen Plasma und Ficoll) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und nach Zugabe von 10 ml PBS zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde dieser Waschschrift ein 2. Mal wiederholt und der Zellpellet nach der 2. Zentrifugation in Waschpuffer resuspensiert. Die Zellen wurden genauso wie auch die neutrophilen Granulozyten auf eine Konzentration von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml gebracht und ebenso gefärbt. Bei der weiteren Untersuchung wurden Monozyten aus der PBMC Fraktion von Lymphozyten über Unterschiede im Forward/Sideward Scatter differenziert.

## 2.3 Statistik

Die statistische Signifikanz der IL-8-Ausschüttung und der CFU-Werte wurde, sofern eine Normalverteilung vorlag, mit dem t-Test überprüft. Die Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet (p-Werte jeweils in Klammern). Solange die Vergleichsgruppen gleich groß waren ( $n_1 = n_2$ ), wurde lediglich die für beide Gruppen zutreffende Anzahl (n) angegeben.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Überprüfung der Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach deren Isolierung**

Um die Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach deren Isolierung aus venösem Blut zu überprüfen, wurden HE-Färbungen angefertigt. Um ein Vermischen der granulozytären Fraktion mit der monozytären Fraktion zu vermeiden, wurde bei der Isolierungsmethode nach der Zentrifugation mit Ficoll der Überstand vorsichtig abgesaugt. Bei Anwendung des Standardprotokolls waren in den Stichproben 99-100 % der isolierten Zellen neutrophile Granulozyten.

### **3.2 Quantitatives Ausplattieren von *S. aureus* - Bestimmung der Korrelation zwischen optischer Dichte und Konzentration**

Ziel dieses Versuchs war herauszufinden, welche optische Dichte (OD) von einer *S. aureus*-Suspension welcher Konzentration entspricht. Durchschnittlich zeigte sich eine Konzentration von  $6,9 \times 10^8$  Bakterien/ml PBS-Lösung (im Bereich der OD von 0,330 ó 0,350). Entsprechende Verdünnungen wurden anhand dieser Daten für die weiteren Versuche veranlasst, um somit erwünschte Konzentrationen und MOIs zu erhalten.

### 3.3 Einfluss von Adiponektin auf neutrophile Granulozyten

Da der Adiponektin-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten sowohl auf Gen-Ebene (55) als auch auf Protein-Ebene (56) beschrieben wurde, sollte untersucht werden, welchen Einfluss Adiponektin auf neutrophile Granulozyten hat.

#### 3.3.1 Killing-Assay

Um herauszufinden, ob Adiponektin einen Einfluss auf das 'Killing'-Verhalten neutrophiler Granulozyten hat, wurde ein sogenanntes Killing-Assay durchgeführt. In der Grafik ist auf der y-Achse die Anzahl an Bakterien in Millionen aufgetragen, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt im Probenröhrchen befanden. Ein 'Killing' erkennt man durch eine Abnahme der Bakterienanzahl von einem Zeitpunkt zum nächsten. So reduziert sich beispielsweise bei dem Ansatz '+Adiponektin; opsonisiert' die Anzahl der Bakterien von Minute 0 bis Minute 30 um ca. 35% (Abbildung 1).

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Entsprechend der jeweiligen Zeitpunkte (0 min, 30 min, 60 min und 120 min) entstanden  $p_0$ ,  $p_{30}$ ,  $p_{60}$  und  $p_{120}$ .

In diesem Versuch konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anwesenheit von Adiponektin festgestellt werden. Für die opsonisierten Ansätze ( $n=9$ ) konnten bei den verschiedenen Zeitpunkten folgende p-Werte festgestellt werden:  $p_0 = 0,931$ ;  $p_{30} = 0,258$ ;  $p_{60} = 0,863$ ;  $p_{120} = 0,113$ . Für die nicht opsonisierten (PBS-)Ansätze ( $n=9$ ) konnten bei den verschiedenen Zeitpunkten folgende p-Werte festgestellt werden:  $p_0 = 0,605$ ;  $p_{30} = 0,605$ ;  $p_{60} = 0,605$ ;  $p_{120} = 0,34$ .

Ein 'Killing' wurde nur bei den opsonisierten Proben beobachtet. Die nicht opsonisierten Bakterien (nur mit PBS vorstimuliert) vermehrten sich sogar über den Zeitraum von 120 min. Es konnte somit ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Opsonisierung beobachtet werden. Für die '+Adiponektin-Ansätze' ( $n=9$ ) konnten bei den verschiedenen Zeitpunkten folgende p-Werte festgestellt werden:  $p_0 = 0,011$ ;  $p_{30} < 0,0005$ ;  $p_{60} < 0,0005$ ;  $p_{120} < 0,0005$ .

Für die '-Adiponektin-Ansätze' (n=9) konnten bei den verschiedenen Zeitpunkten folgende p-Werte festgestellt werden:  $p_0 = 0,019$ ;  $p_{30} < 0,0005$ ;  $p_{60} < 0,0005$ ;  $p_{120} < 0,0005$ .

Es wurde fAd bei einer Konzentration von  $1\mu\text{g/ml}$  verwendet.

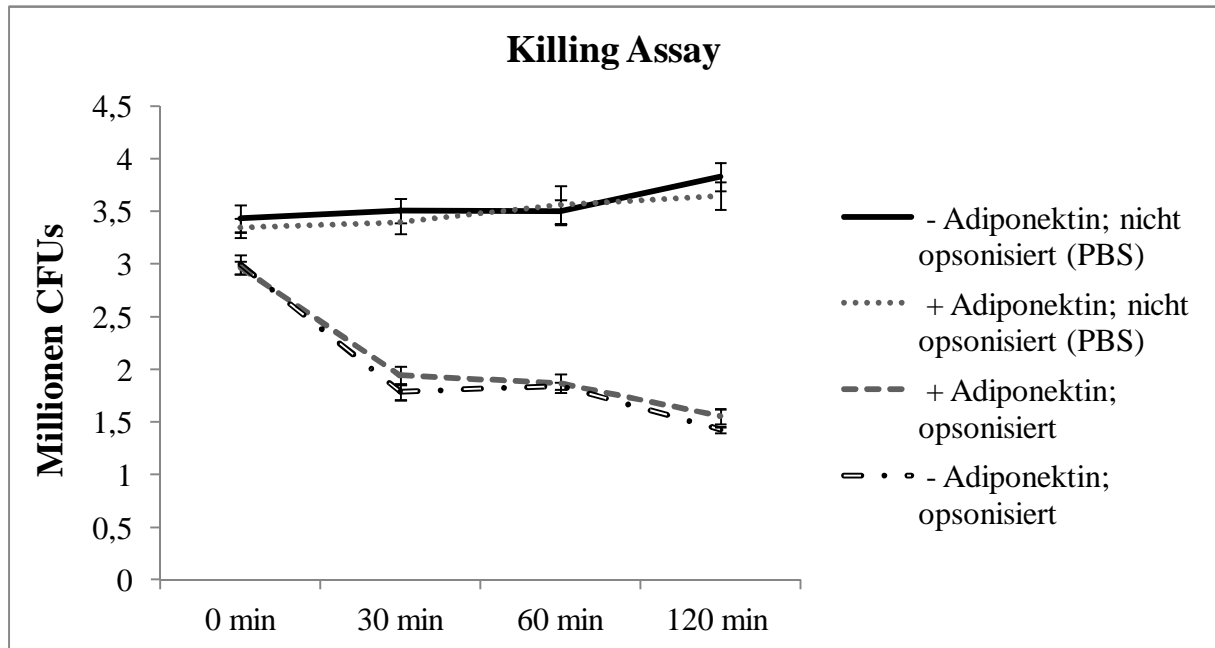


Abbildung 4: Im zeitlichen Verlauf (0-120 min) durch quantitatives Ausplattieren ermittelte Anzahl der CFU. Gegenüberstellung von opsonierten und nicht opsonierten (PBS) *S. aureus* im Eppendorf Cup (mit  $610\mu\text{l}$  Ansatz gefüllt) bei Anwesenheit von humanen, neutrophilen Granulozyten bei einem MOI von 1:1. Stimulierung mit  $1\mu\text{g/ml}$  fAd (+ Adiponektin) oder ohne Adiponektin (- Adiponektin). Angabe des SEM.

### 3.3.2 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit $0,5\mu\text{g/ml}$ fAd

Hierzu wurden die neutrophilen Granulozyten mit fAd inkubiert. Gleichzeitig fand auch eine Stimulierung der neutrophilen Granulozyten durch LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) und *S. aureus* (MOI 1:1 sowie 1:10) statt. Es wurde die IL-8-Sekretion der neutrophilen Granulozyten untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte IL-8-Sekretion nach Stimulierung mit LPS. Ebenso fand sich eine gesteigerte IL-8-Sekretion durch Inkubation mit *S. aureus*, die durch eine Erhöhung der MOI auf 1:10 weiter gesteigert werden konnte.

Bei einer Kostimulation mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  fAd konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IL-8-Sekretion zwischen den Ansätzen ohne Adiponektin-Stimulation (- Adiponektin) und denen mit Adiponektin-Stimulation (+ Adiponektin) festgestellt werden (Abbildung 2). Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test durchgeführt. Die IL-8-Sekretion wurde verglichen ohne weitere Stimulierung (neg) ( $n=7$ ;  $p=0,638$ ), nach Inkubation mit LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) ( $n=7$ ;  $p=0,882$ ) sowie nach Inkubation mit *S. aureus* bei einem MOI von 1:1 ( $n=5$ ;  $p=0,819$ ) und *S. aureus* bei einem MOI von 1:10 ( $n=5$ ;  $p=0,823$ ).

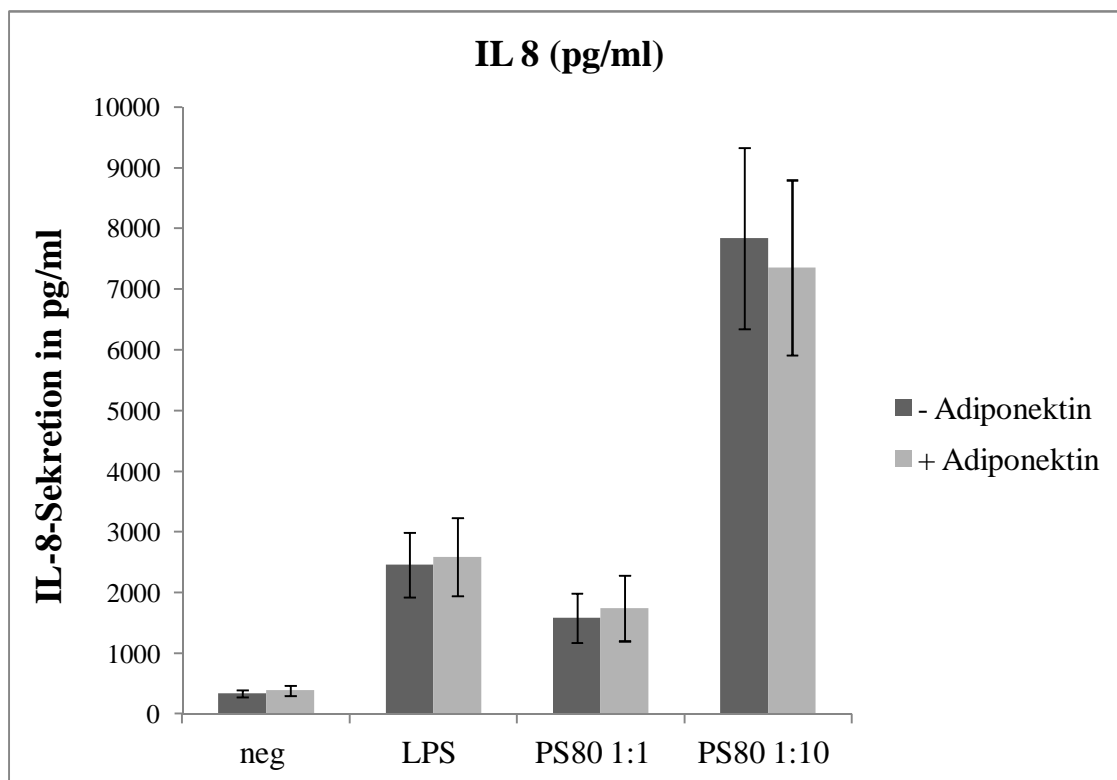


Abbildung 5: Konzentration von IL-8 in pg/ml im Zellüberstand von neutrophilen Granulozyten ohne Adiponektin-Zugabe (- Adiponektin) und unter Stimulierung mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  fAd (+ Adiponektin). Angabe des SEM.

### 3.3.3 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ fAd

Auch eine Inkubation mit Adiponektin bei einer Konzentration von fAd 1  $\mu\text{g/ml}$  brachte keinen signifikanten Unterschied bei der IL-8-Sekretion zwischen den beiden Gruppen (- Adiponektin / + Adiponektin) (Abbildung 3). Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz

wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. IL-8-Sekretion wurde verglichen ohne weitere Stimulierung (neg) (n=16; p=0,305), nach Inkubation mit LPS (1µg/ml) (n=12; p=0,242) sowie nach Inkubation mit *S. aureus* bei einem MOI von 1:1 (n=9; p=0,546) und *S. aureus* bei einem MOI von 1:10 (n=20; p=0,841).

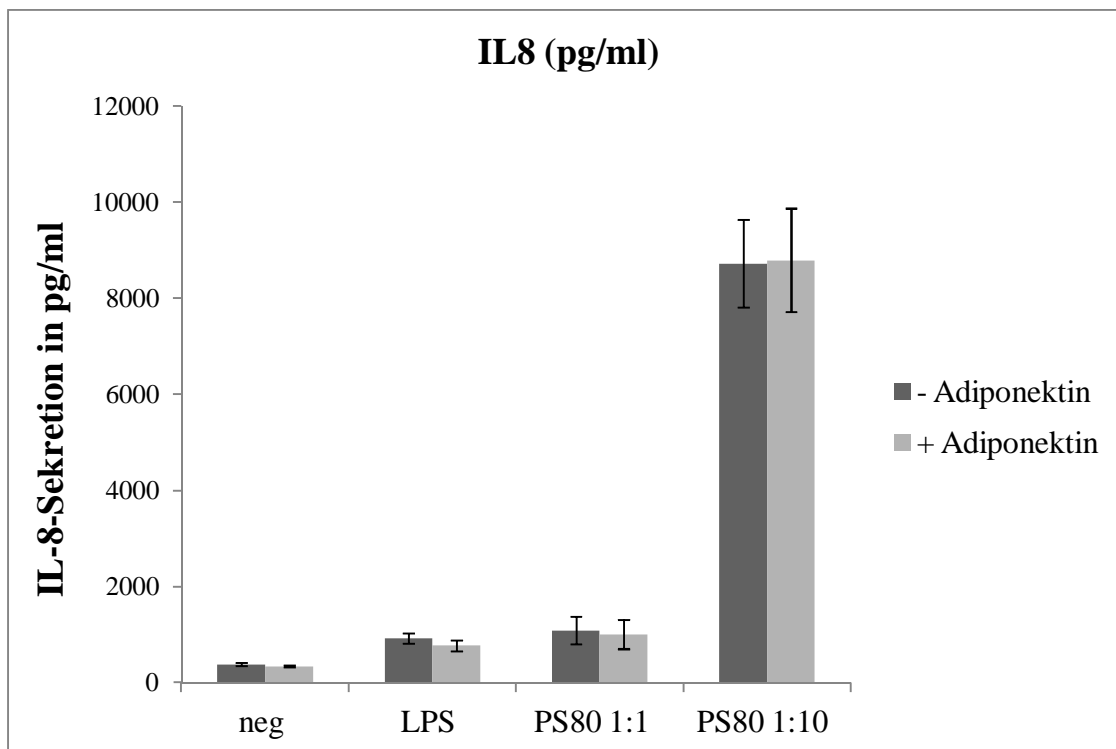


Abbildung 6: Konzentration von IL-8 in pg/ml im Zellüberstand von neutrophilen Granulozyten ohne Adiponektin-Zugabe (- Adiponektin) und unter Stimulierung mit 1 µg/ml fAd (+ Adiponektin). Angabe des SEM.

### 3.3.4 Einfluss von globulärem Adiponektin (gAd) auf die IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten

Im Gegensatz zu den Stimulierungen mit fAd konnte durch die Stimulierung mit 1 µg/ml gAd bei 2 Ansätzen ein signifikanter Unterschied bezüglich der IL-8-Sekretion gemessen werden (Abbildung 4). Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test durchgeführt.

Die Ansätze ohne weitere Zugabe (neg) zeigten eine vermehrte Sekretion von IL-8 bei Stimulierung mit 1 µg/ml gAd. Es wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt (n=8; p=0,001). Auch bei den *S. aureus* 1:1 Ansätzen konnte durch Zugabe von 1 µg/ml gAd hinsichtlich der IL-8-Sekretion zwischen den beiden Gruppen (+ Adiponektin / - Adiponektin) ein signifikanter Unterschied gemessen werden (n=8; p<0,0005).

Bei den LPS-Ansätzen (1µg/ml) (n=10; p=0,743) und den *S. aureus* 1:10 Ansätzen (n=10; p=0,124) war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (- Adiponektin / + Adiponektin) hinsichtlich der IL-8-Sekretion feststellbar.

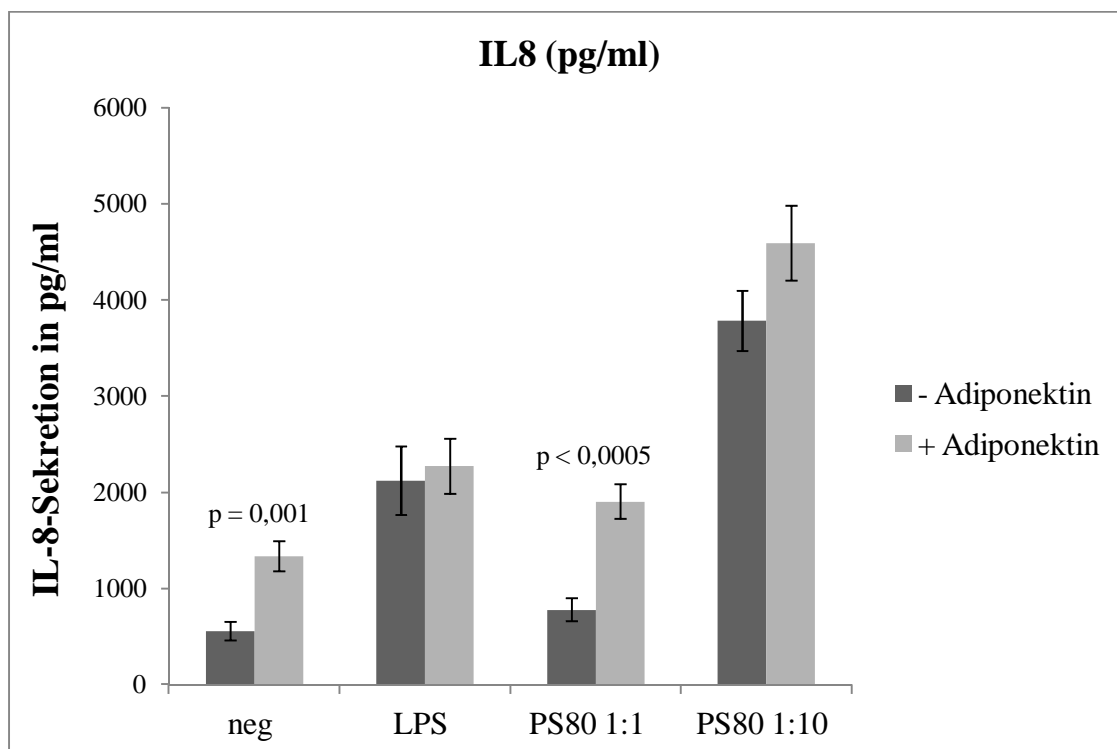


Abbildung 7: Konzentration von IL-8 in pg/ml im Zellüberstand von neutrophilen Granulozyten ohne Zugabe von Adiponektin (- Adiponektin) und unter Stimulierung mit 1 µg/ml gAd (+ Adiponektin). Angabe des SEM.

### **3.4 Einfluss von Adiponektin auf Monozyten**

Da Adiponektin-Rezeptoren auf Monozyten beschrieben sind (59), und gAd einen Einfluss auf die IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten hatte, sollte ein möglicher Einfluss gAds auf die IL-8-Sekretion von Monozyten untersucht werden. Der Inkubationsversuch wurde mit Monozyten aus venösem Blut durchgeführt.

### 3.4.1 Einfluss von gAd auf die IL-8-Sekretion von Monozyten

Es entstanden Ansätze, in denen gleichzeitig auch eine Stimulierung der Monozyten durch LPS (1µg/ml) und *S. aureus* (MOI 1:10) stattfand. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Bei den LPS-Ansätzen (1µg/ml) ( $n_1=4$ ;  $n_2=3$ ;  $p=0,857$ ) und den *S. aureus* 1:10 Ansätzen ( $n=4$ ;  $p=0,057$ ) war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (- Adiponektin / + Adiponektin) hinsichtlich der IL-8-Sekretion feststellbar. Jedoch kann bei den *S. aureus* 1:10 Ansätzen ein Trend zu einer vermehrten IL-8-Sekretion unter Stimulierung mit 1µg/ml gAd beobachtet werden.

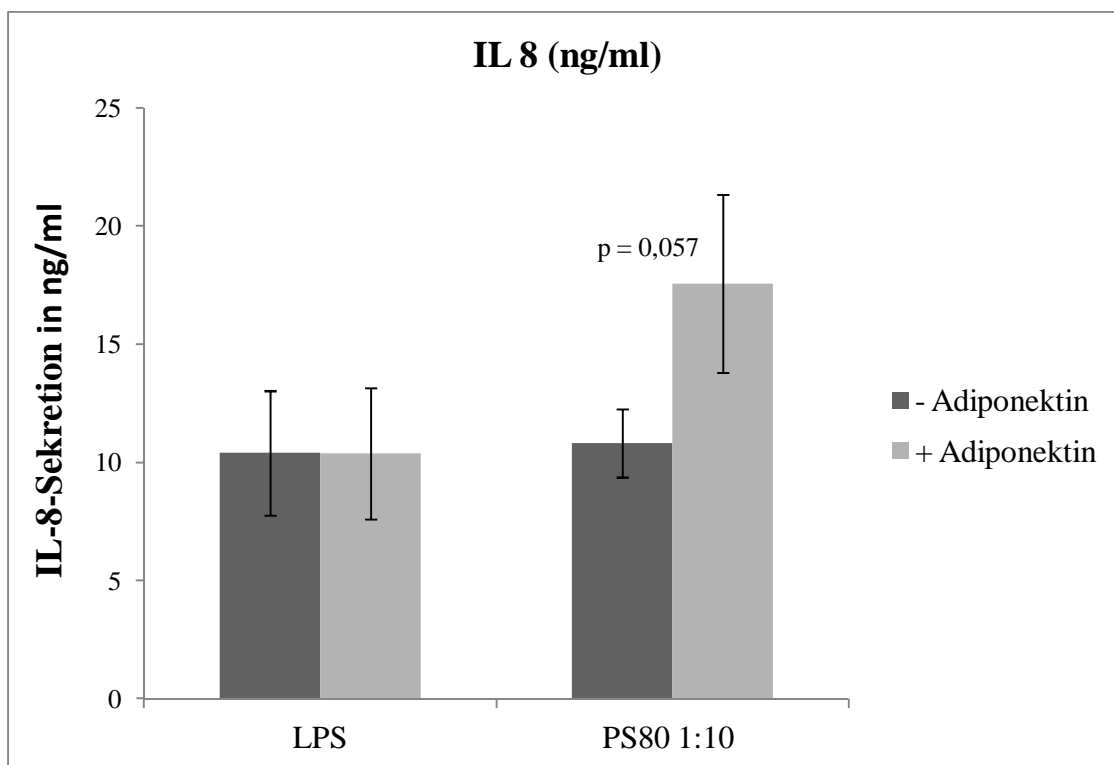


Abbildung 8: Konzentration von IL-8 in ng/ml im Zellüberstand von Monozyten ohne Zugabe von Adiponektin (- Adiponektin) und unter Stimulierung mit 1 µg/ml gAd (+ Adiponektin). Angabe des SEM.

### 3.5 LPS-Verunreinigung von kommerziellem globulären Adiponektin (gAd)

Wie auf dem Datenblatt ersichtlich, wird das für diese Arbeit kommerziell erworbene gAd in *E. coli* hergestellt. Das verwendete fAd wird laut Datenblatt nicht bakteriell, sondern durch eine Maus-Myelom-Zelllinie gewonnen. Der vermeintliche proinflammatorische Effekt von gAd könnte daher eventuell auf Endotoxin(LPS)-verunreinigtes Adiponektin zurückzuführen sein. Um dies herauszufinden, wurde der kommerziell verfügbare Limulus Amebocyte Lysate Chromogenic Endpoint Assay (Hycult biotech) durchgeführt. Dieser Test ermöglichte die Messung von bakteriellen Endotoxinen und wird in dieser Arbeit auch als LPS-Assay bezeichnet. Das kommerziell erworbene gAd erwies sich dabei als mit LPS verunreinigt. Sowohl in selbst hergestellten PBS als auch in kommerziell erworbenen PBS konnte durch die Zugabe von gAd eine LPS-Kontamination festgestellt werden. Die Negativkontrolle als auch die Überprüfung von kommerziellen PBS ohne gAd zeigten keine nennenswerten LPS-Kontaminationen.

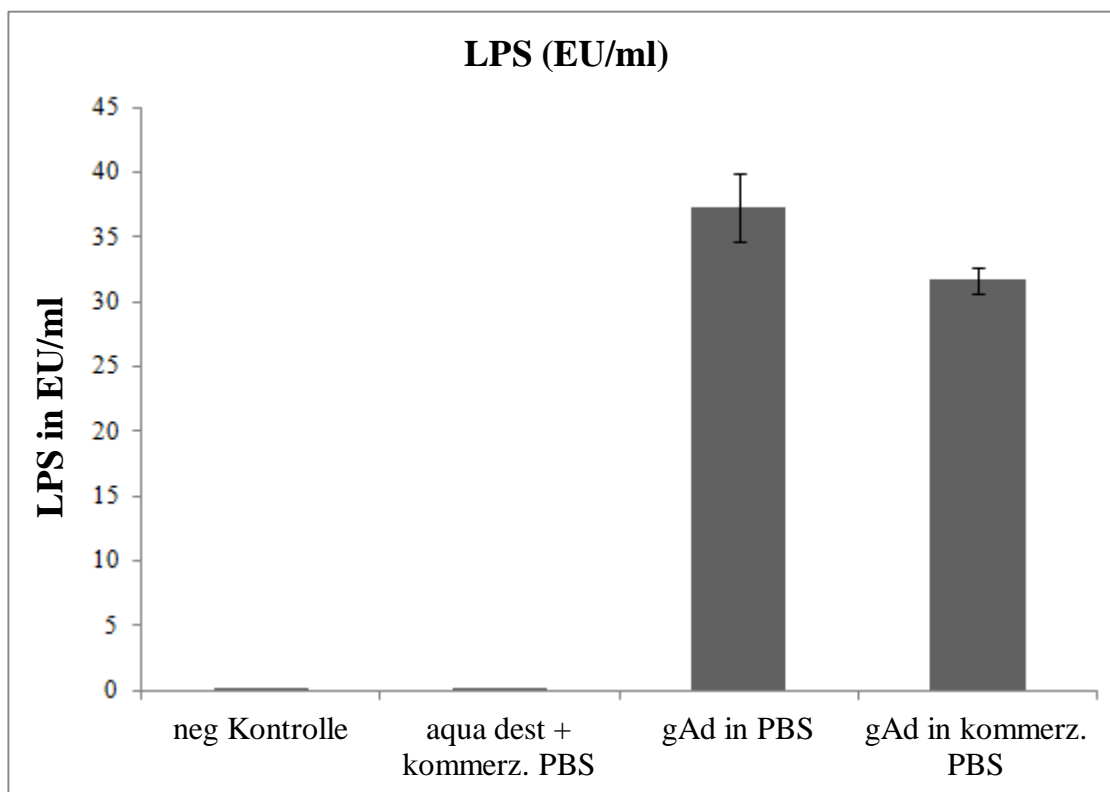


Abbildung 9: Konzentration von LPS in EU/ml, gemessen mittels LPS-Assay. Angabe des SEM.

### 3.6 Adiponektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Wie bereits erwähnt, wurden in anderen Arbeiten die Adiponektin-Rezeptoren (Adipor1 und Adipor2) auf neutrophilen Granulozyten beschrieben (55,56). Auf Monozyten konnten ebenfalls beide Adiponektin-Rezeptoren dargestellt werden (59). In dieser Arbeit sollte nun die Existenz von Adiponektin-Rezeptoren sowohl auf neutrophilen Granulozyten als auch auf Monozyten mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, werden Zellen, die spezifische Rezeptoren exprimieren, durch Fluorescein gefärbt. Die Färbungsintensität verhält sich proportional zur Dichte der Adiponektin-Rezeptoren. Bei den untersuchten neutrophilen Granulozyten konnten lediglich bei nur wenigen (ca. 3%) Zellen Adiponektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bei den Monozyten ergab sich ein anderes Bild: 92,1% waren hierbei Adiponektin-Rezeptor positiv.

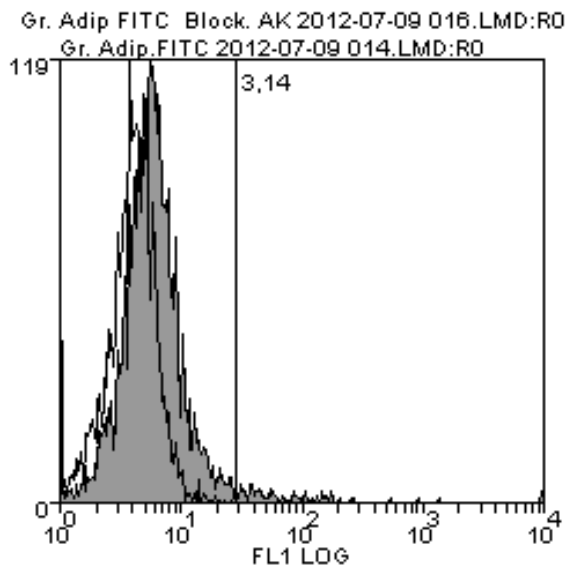


Abbildung 10: 3,1 % der neutrophilen Granulozyten sind Adiponektin-Rezeptor positiv. Darstellung in Form der grauen, leicht nach rechts versetzten Kurve. Mean fluorescence intensity (MFI): 4,5

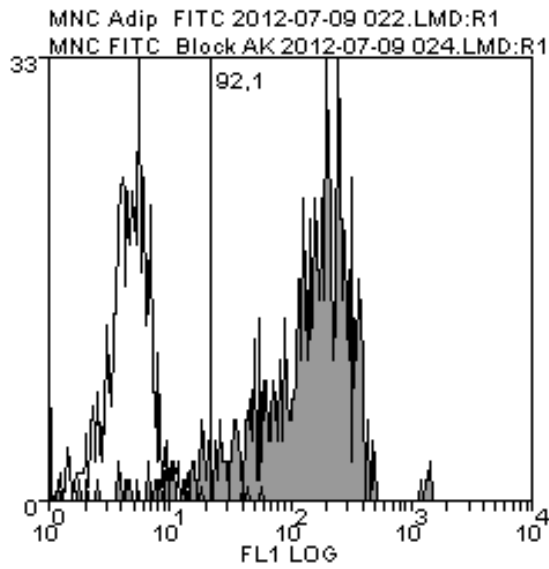


Abbildung 11: 92,1 % der Monozyten sind Adiponektin-Rezeptor positiv. Darstellung in Form der grauen, sich auf der rechten Bildhälfte befindenden Kurve. Mean fluorescence intensity (MFI): 180,9

## **4 Diskussion**

### **4.1 Adiponektin im Kontext der Inflammation**

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zu den bereits beschriebenen Eigenschaften von Adiponektin zu leisten. Ein Teil bisheriger Arbeiten beschäftigte sich beispielsweise mit seiner Rolle als antiinflammatorischer Mediator bei metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Fettleber und kardiovaskulären Erkrankungen (60). So besteht ein reziprokes Verhalten zwischen Adiponektin und dem Entzündungsmarker CRP sowohl im Plasma als auch im Fettgewebe (61). Adiponektin-Knockout-Mäuse haben hohe TNF-Plasmakonzentrationen und hohe TNF- $\alpha$ -mRNA-Spiegel im Fettgewebe (62). Ebenso besteht eine negative Korrelation zwischen Adiponektin und dem Entzündungsmarker IL-6 (63). In Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen führte Adiponektin zu einer supprimierten Progression von Arteriosklerose (64). In Entzündungsvorgängen kann Adiponektin reduzierend eingreifen, indem es die Funktion von Makrophagen verändert (60). So induziert Adiponektin beispielsweise die Produktion des antiinflammatorischen Interleukins 10 durch Monozyten. Aus Monozyten hergeleitete Makrophagen und dendritische Zellen werden ebenso durch Adiponektin zur IL-10-Ausschüttung stimuliert (65,66). Über einen rezeptorabhängigen und Calreticulin-involvierenden Signalweg fördert Adiponektin die Beseitigung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen. Dies stützt ebenfalls die These einer vor der Entzündung schützenden Funktion Adiponektins (67).

### **4.2 Einfluss von Adiponektin auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit *S. aureus***

Da neutrophile Granulozyten und der Prozess der Phagozytose einen wichtigen Pfeiler der Abwehr des angeborenen Immunsystems stellen (68), lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf dem Einfluss von Adiponektin auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit *S. aureus*.

### 4.2.1 Überprüfung der Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach deren Isolierung

Mittels HE-Färbung konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Isolierungsmethode auch tatsächlich neutrophile Granulozyten in einer hohen Reinheit zur Verfügung stellte. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass davon auszugehen ist, dass sich unter den verwendeten Granulozyten auch eine kleine Anzahl eosinophiler Granulozyten befand (58).

### 4.2.2 Killing-Assay

Hierzu ist bekannt, dass fAd neutrophile Granulozyten bei der Phagozytose von *E. coli* inhibiert (56). Das durchgeführte Killing-Assay dieser Arbeit konnte keine Inhibition des 'Killings' durch Adiponektin feststellen. Ein Unterschied beider Arbeiten war die Verwendung von *S. aureus* sowie der MOI von 1:1 anstelle von *E. coli* und Verhältnissen von 1:40, 1:20 sowie 1:5. Bei beiden Versuchen handelte es sich um eine Stimulierung mit fAd, bezogen jedoch von unterschiedlichen Firmen. Wir verwendeten fAd, hergestellt durch Mausmyelomzellen, während das Adiponektin der anderen Arbeit durch HEK-293-Zellen hergestellt wurde. Die in dieser Arbeit verwendete Adiponektin-Konzentration von 1µg/ml kann eher nicht als Grund für das Ausbleiben eines Einflusses von Adiponektin auf das 'Killing' angesehen werden, da der Versuch mit *E. coli* bei Konzentrationen von 10 µg/ml, 1µg/ml und 0,1µg/ml stets eine Inhibierung der Phagozytose aufzeigen konnte. Gemessen wurde in dieser Arbeit anhand des 'Killings' durch quantitatives Ausplattieren von *S. aureus*, wohingegen bei der zitierten Arbeit mit dem kommerziellen Phagotest gearbeitet wurde (56). Da Phagozytose ein wesentlicher Bestandteil des 'Killings' ist (69), kann diese Arbeit das Konzept einer Inhibierung der Phagozytose durch Adiponektin nicht unterstützen.

### **4.2.3 Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit 'full-length' Adiponektin (fAd)**

Weitere antiinflammatorische Wirksamkeiten von fAd gegenüber neutrophilen Granulozyten konnten bereits gezeigt werden (70). So hat fAd einen hemmenden Einfluss auf den oxidativen Burst von Phagozyten (71). Ebenso wurde beschrieben, dass fAd die IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten inhibieren kann. Bei fAd-Konzentrationen von 1-10000ng/ml wurde die durch LPS-Stimulation ausgelöste IL-8-Sekretion bis zu 50 % unterdrückt (72). Analog zu der eben zitierten Arbeit verwendeten wir das kommerziell erwerbliche fAd von R&D Systems. Jedoch zeigte sich weder bei 500 ng/ml noch bei 1000 ng/ml ein Einfluss fAds auf die IL-8-Sekretion. Die in dieser Arbeit verwendete LPS-Konzentration betrug 1000 ng/ml verglichen mit 10 ng/ml in der Vergleichsarbeit. Ob dies jedoch der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, gilt es zu bezweifeln, da in dieser Arbeit mehrere Versuchsreihen durchgeführt wurden. Nicht nur bei Ansätzen mit LPS-Stimulation, auch bei den Ansätzen ohne weitere Stimulation sowie den Ansätzen mit *S. aureus*-Stimulation bei verschiedenen MOIs konnte kein Einfluss des fAds auf die IL-8-Sekretion neutrophiler Granulozyten gefunden werden. Auch die Anzahl der Probanden in dieser Arbeit war im Vergleich zur zitierten Vergleichsarbeit n=3 höher (72).

Auch bei anderen Zelllinien konnten bereits Einflüsse fAds auf die IL-8-Sekretion gemessen werden. So wurde im Überstand von rheumatoiden Synovialfibroblasten eine dosisabhängige Erhöhung der IL-8-Sekretion nach Zugabe von fAd festgestellt. Aus der Angabe ist nicht ersichtlich ob, das verwendete Adiponektin aus HEK-293-Zellen oder aus *E. coli* gewonnen wurde (73). Bei Endothelzellen und Osteoblasten stimulierte Adiponektin die IL-6- und die IL-8-Sekretion (74). Auch die Behandlung von Monozyten gesunder Spender mit fAd führte zu einer erhöhten IL-8-Sekretion (75).

### **4.2.4 Einfluss von globulärem Adiponektin auf die IL-8-Sekretion neutrophiler Granulozyten**

Gegenstand der Forschung ist neben fAd auch globuläres Adiponektin (gAd). Im Gegensatz zu fAd hat gAd einen verstärkenden Einfluss auf den oxidativen Burst von Phagozyten (71).

GAd induziert die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- und IL-6 durch Makrophagen (76). Weitere proinflammatorische Effekte von gAd konnten durch die Ausschüttung von TNF- und IL-6 durch humane Plazenta und Fettgewebe gezeigt werden (77). In dieser Studie wurde eine Variante von gAd verwendet, welche sich durch 14 zusätzliche Aminosäuren von gAd unterscheidet. Dies gilt es in den Ergebnissen zu berücksichtigen.

Diese Studie konnte einen positiven Effekt von gAd auf die IL-8-Ausschüttung neutrophiler Granulozyten messen. In den Versuchsreihen der Ansätze mit keiner weiteren Stimulierung (neg) und bei gleichzeitiger Stimulierung mit *S. aureus* MOI 1:1 konnte hinsichtlich der IL-8-Sekretion der neutrophilen Granulozyten eine signifikante Steigerung gemessen werden.

Es stellt sich somit die Frage, weswegen gAd und fAd unterschiedliche Wirkungen zeigen. In einer anderen Studie mit epithelialen kanzerösen Zellen des Kolons wurden im Hinblick auf die IL-8-Sekretion nach Adiponektin-Stimulation ähnliche Resultate erzielt. Dabei erhöhte gAd ebenfalls die IL-8-Sekretion und fAd hatte keine Auswirkungen auf die IL-8-Ausschüttung (78).

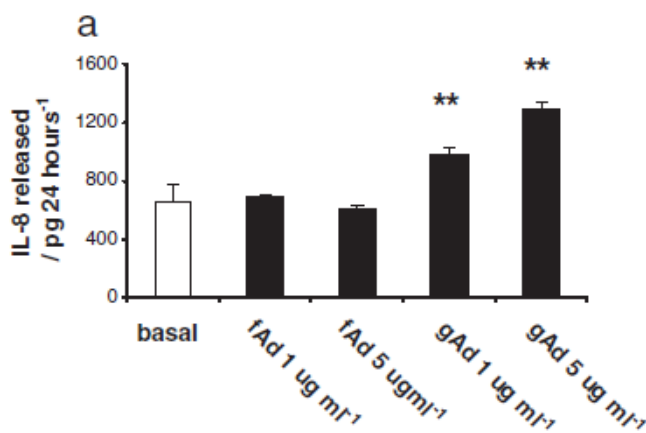


Abbildung 12 aus (78)

Wie in der Graphik der Vergleichsarbeit sichtbar, konnten selbst bei einer Konzentration von 5 µg/ml fAd keine Auswirkungen auf die IL-8-Sekretion beobachtet werden. Dies unterstreicht, dass die in dieser Arbeit gewählte Adiponektin-Konzentration von 1µg/ml Sinn macht und eine höher gewählte Adiponektin-Konzentration wohl keine weiteren Erkenntnisse liefern würde. Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass sowohl fAd als auch gAd von den gleichen Herstellern wie in dieser Arbeit bezogen wurden (78).

Die auffallenden Ergebnisse von gAd sollten mit Vorsicht genossen werden, vor allem aufgrund der im folgenden Abschnitt dieser Arbeit diskutierten LPS-Kontamination von kommerziellem gAd.

### **4.3 LPS-Verunreinigung von kommerziellem globulärem Adiponektin (gAd)**

Um die proinflammatorischen Handlungen von Adiponektin herrscht eine Kontroverse. Zu diesem Durcheinander tragen verschiedene Sachverhalte bei, wie zum Beispiel die verschiedenen Quellen des verwendeten Adiponektins in in-vitro-Experimenten. Auch mag der Gebrauch von unterschiedlichen Molekulargewichtformen Adiponektins oder von verkürzten Adiponektinformen seinen Teil zu den Diskrepanzen beitragen. Ein Hauptthema der Kontroverse ist die Bindung von Adiponektin an LPS. Daher könnte ein Teil der beschriebenen proinflammatorischen Ergebnisse auf eine Kontamination mit LPS zurückzuführen sein. Proinflammatorische Resultate, die mit durch *E. coli* produziertem Adiponektin gewonnen wurden, erscheinen hierbei besonders suspekt (60). Das in dieser Arbeit verwendete gAd von PeproTech wird durch *E. coli* hergestellt. Um eine mögliche Kontamination mit LPS herauszufinden, wurde ein LPS-Assay durchgeführt. Es konnte eine deutliche LPS-Kontamination des verwendeten gAds nachgewiesen werden. Somit sollten die erhöhten IL-8-Werte nach gAd-Stimulierung sehr kritisch bewertet werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die vermehrte IL-8-Ausschüttung durch LPS ausgelöst wurde.

In einer anderen Arbeit wurde die IL-6- und IL-8-Ausschüttung von gingivalen Fibroblasten und Parodontalligament-Fibroblasten nach Zugabe von gAd gemessen. Es wurde zum einem aus *E. coli* gewonnenes gAd als auch aus Mausmyelomzellen gewonnenes gAd verwendet. Bei den Versuchen mit aus *E. coli* gewonnenem gAd zeigten sich erhöhte IL-6- und IL-8-Werte, bei den Versuchen mit gAd aus Mausmyelomzellen jedoch nicht. Die Analyse des gAd aus *E. coli* durch limulus amebocyte lysate assay zeigte eine Kontamination mit LPS. Das gAd aus Mausmyelomzellen enthielt weniger LPS. Desweiteren wurde mit Polymyxin B, einem LPS-Inhibitor, getestet. Dieser Inhibitor blockierte nicht nur die IL-6- und IL-8-Produktion welche durch LPS ausgelöst wurde, sondern auch jene, die durch Induktion mit gAd aus *E. coli* ausgelöst wurde. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass gAd

keinen Einfluss auf die IL-6- und IL-8-Produktion von gingivalen Fibroblasten und Parodontalligament-Fibroblasten hat (79).

Da das in dieser Arbeit verwendete fAd durch Mausmyelomzellen hergestellt wird und sich auch keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Ergebnisse ergaben, wurde in dieser Arbeit auf eine Testung bezüglich möglicher LPS-Kontamination verzichtet. Für das in dieser Arbeit verwendete fAd von R&D Systems wurde jedoch auch bereits eine LPS-Kontamination beschrieben, welche mit der Schätzung des Herstellers übereinstimmte (80). Es lässt sich die Vermutung aufstellen, dass es je nach Menge des kontaminierten LPS zu einer vermehrten IL-8-Sekretion der neutrophilen Granulozyten kommt.

#### **4.4 Proinflammatorisch ó Antiinflammatorisch: Wie passt das zusammen?**

Bezüglich der kontroversen proinflammatorischen Beschreibungen von Adiponektin im Allgemeinen sind auch weitere Ideen zu diskutieren. Der Kontakt mit Adiponektin könnte in einer initialen Entzündung resultieren, an welche sich dann eine Desensibilisierung der Zellen gegenüber darauffolgende inflammatorische Stimulanzen anschließt (60). Diese Theorie vertritt auch Cheng et al. bei der Beschreibung der Induktion proinflammatorischer Funktionen in isolierten Makrophagen und T-Zellen durch Adiponektin. Die induzierte proinflammatorische Aktivierung der Makrophagen würde helfen, Toleranz gegenüber künftigen proinflammatorischen Stimuli zu vermitteln (54). Es stellt sich also die Frage, ob die im Kontext von Adiponektin beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften durch einen vorher induzierten inflammatorischen Erinnerungseffekt reguliert werden (60). Vertreten wird diese Idee von Park et. al, die in ihrer Arbeit zeigten, dass es durch Adiponektin-Stimulation bei Makrophagen zu TNF- Produktion kommt. Dies führte wiederum zu einer erhöhten IL-10-Expression, was schließlich zu einem Abdämpfen LPS-induzierter Zytokinausschüttung von Makrophagen führt (81). Weitere abmildernde und inhibierende Einflüsse Adiponektins auf die LPS-induzierte TNF- -Produktion und die TNF- -mRNA-Expression bei Makrophagen sind beschrieben (51,82).

## **4.5 Einfluss von globulärem Adiponektin (gAd) auf die IL-8-Sekretion von Monozyten**

In dieser Studie konnte kein signifikanter Einfluss von gAd auf die IL-8-Sekretion von Monozyten gezeigt werden. Bei den *S. aureus*-Ansätzen (MOI 1:10) konnte jedoch ein Trend zu einer vermehrten IL-8-Sekretion unter Stimulierung mit 1 µg/ml gAd beobachtet werden. Passend zu diesem Trend wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass gAd die IL-8-Sekretion sowohl von Makrophagen der THP-1-Zelllinie als auch von primären humanen Monozyten/Makrozyten (isoliert aus peripherem Blut) induziert (83).

Eine erhöhte Ausschüttung von IL-8 würde zu der Theorie passen, Adiponektin führe initial zu einer Entzündung und erzeuge seine antiinflammatorischen Eigenschaften durch einen Erinnerungseffekt (60). Jedoch entstammen die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten aus venösem Blut, sodass man aufgrund der physiologischen Menge an Adiponektin im menschlichen Blut nicht von einem Erstkontakt mit Adiponektin sprechen kann. Diese Interpretation könnte auch für die erhöhte IL-8-Sekretion der neutrophilen Granulozyten nach gAd-Stimulation diskutiert werden, aufgrund der Chronologie der Diskussion wurde darauf allerdings verzichtet.

Es ist allerdings davon auszugehen, dass der Trend zur vermehrten IL-8-Sekretion durch eine LPS-Kontamination bedingt ist. Wie auch im Fall der erhöhten IL-8-Ausschüttung von Granulozyten bei Stimulation mit gAd, wurde durch *E. coli* gewonnenes gAd verwendet. Auch die bereits erwähnten, im LPS-Assay gemessenen Werte der LPS-Kontamination des verwendeten gAds, passen in dieses Bild.

## **4.6 Darstellung von Adiponektin-Rezeptoren**

Da die Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in der Literatur sowohl für Granulozyten (55,56) als auch für Monozyten (59) beschrieben sind, entstand die Planung für diese Studie. Aufgrund der Ergebnisse, welche bis auf die erhöhten IL-8-Werte bei Stimulierung mit gAd unauffällig blieben, sollte die Existenz der Rezeptoren überprüft werden. Dies konnte lediglich für Monozyten bestätigt werden. Bei den untersuchten neutrophilen Granulozyten fehlten Adiponektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche fast

vollständig. Der Nachweis geschah mittels Durchflusszytometrie und eines kommerziellen Kitsystems. Da Monozyten und Granulozyten weitgehend gleich behandelt wurden (bis auf einen zusätzlichen Isolationsschritt für Monozyten, siehe Material und Methoden 2.2.1 sowie 2.2.8), ist davon auszugehen, dass sich zumindest mit dieser Methode des kommerziellen Kitsystems keine Adiponektin-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten nachweisen lassen. Der fehlende Nachweis von Adiponektin-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten ist gut vereinbar mit den Ergebnissen der funktionellen Granulozytenversuche. So ließ sich ein Einfluss von fAd auf neutrophile Granulozyten weder bei Killing-Assays noch bei der IL-8-Ausschüttung zeigen. Dies wirft die Frage auf, wie und ob Adiponektin tatsächlich eine Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausübt.

#### **4.7 Fazit und Ausblick**

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte diese Arbeit zeigen, dass durch *E. coli* gewonnenes gAd eine erhöhte IL-8-Sekretion von neutrophilen Granulozyten hervorrufen kann. Es konnte eine LPS-Kontamination von gAd (PeproTech) nachgewiesen werden. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die LPS-Kontamination und nicht gAd der Grund für die erhöhte IL-8-Sekretion ist. Einen Einfluss von fAd, welches durch Mausmyelomzellen produziert wird, auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit *S. aureus*, konnte nicht festgestellt werden. Der Nachweis von Adiponektin-Rezeptoren gelang für Monozyten, während sie auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten fast vollständig fehlten. Für die Zukunft bedarf es weiterer experimenteller Forschung, um den Einfluss von Adiponektin auf das angeborene Immunsystem im Rahmen von akuten bakteriellen Infektionen zu klären.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neutrophile Granulozyten von gesunden, humanen Spendern isoliert, um einen Einfluss von Adiponektin (Ad) auf das 'Killing'-Verhalten von neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. Es konnte hierbei allerdings kein Einfluss von Adiponektin beobachtet werden. Ebenso wurde der Einfluss Adiponektins auf die IL-8-Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS und *S. aureus* untersucht. Eine erhöhte IL-8-Ausschüttung ergab sich lediglich bei Ansätzen, in denen globuläres Ad verwendet wurde. Versuche, in denen 'full-length' Ad verwendet wurde, konnten keinen Einfluss von Adiponektin messen. Bei Monozyten von gesunden, humanen Spendern konnte durch gAd-Stimulation ein Trend zu einer vermehrten IL-8-Sekretion beobachtet werden.

Das in dieser Arbeit verwendete gAd wird durch *E. coli* hergestellt. In einem LPS-Assay zeigte sich daher eine Kontamination mit LPS, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die gemessenen, erhöhten IL-8 Werte eher durch eine LPS-Kontamination zu Stande gekommen sind, als durch eine Interaktion zwischen Adiponektin und Granulozyten.

Auf der Suche nach dem Grund für den fehlenden Einfluss von Adiponektin auf neutrophile Granulozyten wurde überprüft, ob sich tatsächlich, wie bisher in der Literatur beschrieben, Adiponektin-Rezeptoren auf den untersuchten Zellen befinden. Dies konnte lediglich für Monozyten bestätigt werden. Bei den untersuchten neutrophilen Granulozyten fehlten Adiponektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche fast vollständig. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen, dass Adiponektin (im speziellen 'full-length' Ad) keinen Einfluss auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit *S. aureus* hat.

Es bedarf daher weiterer Forschung um den Einfluss von Adiponektin auf das angeborene Immunsystem im Rahmen von akuten bakteriellen Infektionen zu klären.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gatermann S. Staphylokokken. In: Suerbaum S, Hahn H, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin [u.a.]: Springer; 2012. ISBN: 9783642241666.
2. Becker K, Peters G. *Staphylococcus aureus*. In: Darai G, editor. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, Erreger Symptome Diagnose Therapie und Prophylaxe. Berlin [u.a.]: Springer; 2012. ISBN: 978-3-642-17158-1.
3. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998;339(8):520632.
4. Thomas C; Grimm I, editors. Atlas der Infektionskrankheiten, [Pathologie Mikrobiologie Klinik Therapie]. Stuttgart: Schattauer; 2010. IX, 546 S. (Pathologie). ISBN: 3-7945-2762-3.
5. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TL, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med 2007;13(12):151064.
6. Backx M, Healy B. Serious staphylococcal infections. Clinical Medicine 2008;8(5):53568.
7. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001;32 Suppl 2:S114-32.
8. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006;5:2.
9. Jacobsson G, Dashti S, Wahlberg T, Andersson R. The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden. Scand J Infect Dis 2007;39(1):6613.
10. Boyce JM. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: Crossley KB, editor. The staphylococci in human disease. New York [u.a.]: Churchill Livingstone; 1997. ISBN: 0-443-07644-8.

11. Willams RE. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 1963;27:56671.
12. Casewell MW, Hill RL. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1986;18 Suppl A:1612.
13. Tuazon CU, Sheagren JN. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *J Infect Dis* 1974;129(6):72567.
14. Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11(11):98569.
15. Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *JAMA* 1975;231(12):1272.
16. Breen JD, Karchmer AW. *Staphylococcus aureus* infections in diabetic patients. *Infect Dis Clin North Am* 1995;9(1):11624.
17. Carey AJ, Long SS. *Staphylococcus aureus*: A Continuously Evolving and Formidable Pathogen in the Neonatal Intensive Care Unit. *Clinics in Perinatology* 2010;37(3):535646.
18. Fry DE, Barie PS. The Changing Face of *Staphylococcus aureus*: A Continuing Surgical Challenge. *Surgical Infections* 2011;12(3):1916203.
19. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 2012;34(2):237659.
20. Otto M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64(1):143662.
21. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111(9):1265673.
22. Hoth M, Wischmeyer E. Immunsystem. In: Behrends JC, editor. *Physiologie, 93 Tabellen*. Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe). ISBN: 978-3-13-153162-9.
23. Dengler J, Dreger P. Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen, Granulozytäres System. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Grundlagen - Therapie - Methodik*. Berlin [u.a.]: Springer; 2010. ISBN: 978-3-642-12765-6.

24. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):56568.
25. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions [As quimiocinas e os seus receptores: características e funcoes fisiologicas]. *Acta Med Port* 2011;24 Suppl 4:967676.
26. Waugh DJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2008;14(21):6735641.
27. Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(3):22068.
28. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2009;23(1):17634.
29. Schmeling DJ, Peterson PK, Hammerschmidt DE, Kim Y, Verhoef J, Wilkinson BJ, Quie PG. Chemotaxis by cell surface components of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1979;26(1):57663.
30. Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, Daniel D, Kim Y, Wallace EF, Larrick JW, Raffin TA. Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J Cell Physiol* 1993;154(3):478685.
31. Yao L, Lowy FD, Berman JW. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 1996;64(8):340769.
32. Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, Klein JP. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect Immun* 1995;63(4):138066.
33. Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, VanOtteren GM, Strieter RM. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* 1994;62(1):119625.
34. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000;165(10):539266.
35. Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Widomska S. Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008;8(1):7646.

36. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003;278(11):9073685.
37. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(45):2674669.
38. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54(1):117621.
39. Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randeve HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 2006;49(6):12926302.
40. Fayad R, Pini M, Sennello JA, Cabay RJ, Chan L, Xu A, Fantuzzi G. Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation. *Gastroenterology* 2007;132(2):601614.
41. Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 2005;579(23):516369.
42. Viengchareun S, Zennaro M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett* 2002;532(3):345650.
43. Katsiogiannis S, Kapsogeorgou EK, Manoussakis MN, Skopouli FN. Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin. *Arthritis Rheum* 2006;54(7):229569.
44. Delaigle AM, Jonas J, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 2004;145(12):5589697.
45. Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(3):28269.

46. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6(10):772-683.
47. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005;146(2):790-66.
48. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(7):861-68.
49. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423(6941):762-69.
50. Hug C, Lodish HF. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2005;5(2):129-634.
51. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96(5):1723-632.
52. Sun Y, Xun K, Wang C, Zhao H, Bi H, Chen X, Wang Y. Adiponectin, an Unlocking Adipocytokine. *Cardiovascular Therapeutics* 2009 [cited 2013 Mar 6];27(1):59-675.
53. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11(2):85-97.
54. Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. Adiponectin Induces Pro-inflammatory Programs in Human Macrophages and CD4+ T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(44):36896-904.
55. Crawford, Lisa J A, Peake R, Price S, Morris, Treen C M, Irvine AE. Adiponectin is produced by lymphocytes and is a negative regulator of granulopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(4):807-611.

56. Rossi A, Lord J. Adiponectin inhibits neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by inhibition of PKB and ERK 1/2 MAPK signalling and Mac-1 activation. PLoS ONE 2013;8(7):e69108.
57. Hanses F, Kopp A, Bala M, Buechler C, Falk W, Salzberger B, Schaffler A. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in adipocyte-like differentiated 3T3-L1 cells is glucose dependent and alters cytokine, chemokine, and adipokine secretion. Endocrinology 2011;152(11):4148657.
58. Nauseef WM. Isolation of human neutrophils from venous blood. Methods Mol Biol 2014;1124:1368.
59. Pang TT, Narendran P. The Distribution of Adiponectin Receptors on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Annals of the New York Academy of Sciences 2008;(1):14365.
60. Esmaili S, Xu A, George J. The multifaceted and controversial immunometabolic actions of adiponectin. Trends Endocrinol. Metab. 2014.
61. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. Circulation 2003;107(5):67164.
62. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. Nat Med 2002;8(7):73167.
63. Krakoff J, Funahashi T, Stehouwer, Coen D A, Schalkwijk CG, Tanaka S, Matsuzawa Y, Kobes S, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC, Lindsay RS. Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. Diabetes Care 2003;26(6):1745651.
64. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 2002;106(22):2767670.

65. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(2):630-65.
66. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004;109(17):2046-69.
67. Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, Kihara S, Walsh K. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest* 2007;117(2):375-686.
68. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:197-223.
69. van Kessel, Kok P. M., Bestebroer J, van Strijp, Jos A. G. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* 2014;5.
70. Rossi A, Lord JM. Adiponectin inhibits neutrophil apoptosis via activation of AMP kinase, PKB and ERK 1/2 MAP kinase. *Apoptosis* 2013;18(12):1469-80.
71. Chedid P, Hurtado-Nedelec M, Marion-Gaber B, Bournier O, Hayem G, Gougerot-Pocidallo M, Frystyk J, Flyvbjerg A, El Benna J, Marie J. Adiponectin and Its Globular Fragment Differentially Modulate the Oxidative Burst of Primary Human Phagocytes. *The American Journal of Pathology* 2012;180(2):682-692.
72. Trellakis S, Rydleuskaya A, Fischer C, Canbay A, Tagay S, Scherag A, Bruderek K, Schuler PJ, Brandau S. Low adiponectin, high levels of apoptosis and increased peripheral blood neutrophil activity in healthy obese subjects. *Obes Facts* 2012;5(3):305-18.
73. Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;378(2):218-23.
74. Lee Y, Ji H, Lee S, Hong S, Yang H, Chul Yoo M, Kim KS. The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints. *Exp. Mol. Med.* 2014;46:e72.
75. Rovin BH, Song H. Chemokine induction by the adipocyte-derived cytokine adiponectin. *Clin Immunol* 2006;120(1):99-105.

76. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(4):1254-63.
77. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology* 2005;146(8):3334-42.
78. Ogunwobi OO, Beales ILP. Adiponectin stimulates proliferation and cytokine secretion in colonic epithelial cells. *Regul Pept* 2006;134(2-3):105-13.
79. Park HG, Bak EJ, Kim JH, Lee Y, Choi S, Cha J, Yoo Y. Effect of globular adiponectin on interleukin-6 and interleukin-8 expression in periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci* 2011;41(3):149-56.
80. Turner, J J O, Smolinska MJ, Sacre SM, Foxwell, B M J. Induction of TLR tolerance in human macrophages by adiponectin: does LPS play a role? *Scand. J. Immunol.* 2009;69(4):329-36.
81. Park P, McMullen MR, Huang H, Thakur V, Nagy LE. Short-term treatment of RAW264.7 macrophages with adiponectin increases tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression via ERK1/2 activation and Egr-1 expression: role of TNF-alpha in adiponectin-stimulated interleukin-10 production. *J. Biol. Chem.* 2007;282(30):21695-703.
82. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(3):924-9.
83. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. Peripheral factors in the metabolic syndrome: the pivotal role of adiponectin. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1083:185-95.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Felix Peter Sponagl

Geburtsdatum: 20.02.1988

Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

09/1994 ó 07/1998 Hans-Adlhoch-Schule, Augsburg

09/1998 ó 06/2007 Holbein-Gymnasium, Augsburg

08/2004 ó 06/2005 Auslandsjahr an einer High School in Rogers, Arkansas, USA

### **Universitäre Bildung**

10/2007 ó 06/2014 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 01/2015 ó Assistenzarzt in der Inneren Medizin, Spital Altstätten (Schweiz)

## **Danksagung**

Ich danke allen, die mich beim Anfertigen dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Dr. Frank Hanses, der mir als Betreuer diese Doktorarbeit ermöglichte. Er führte mich an die experimentelle Forschung heran und machte mich mit Theorie und Methoden vertraut.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger, der als Doktorvater die Erstellung des Erstgutachtens übernahm.

Vielen Dank auch an alle Personen, die mit ihrer Blutspende das Projekt überhaupt erst ermöglichten.

Danke sagen möchte ich auch meinen Laborkollegen Irina Fink, Sara Wennige, Benedikt Grandel, Sven Breitschwerdt und Franziska Winter für die angenehme und humorvolle Atmosphäre in unserer infektiologischen Abteilung.

Speziell der technischen Assistentin Frau Irina Fink danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Sie erklärte mir Arbeitsabläufe und konnte mir bei allen kleineren und größeren Problemen im Labor helfen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir stets mit viel Verständnis und aufmunternden Worten zur Seite stand.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.