

---

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Etablierung eines EGFP-Phagozytostests zur  
Beurteilung der Phagozytoseleistung und des  
Degradationsvermögens von neutrophilen  
Granulozyten und Monozyten.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Heike Bicker  
aus Berlin

Gutachter/in:           1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk  
                                  2. Prof. Dr. med. R. von Baehr  
                                  3. Prof. Dr. med. U. Sack

Datum der Promotion:    03.09.2010

---

## Kurzzusammenfassung

*Hintergrund.* Die Phagozytose von Erregern ist ein wichtiger Mechanismus in der Abwehr von Infektionen. Bisher existiert jedoch kein in-vivo-nahes Testverfahren zur Diagnose von Störungen der Aufnahme und Degradation von Erregern. *Material und Methoden.* Unter Nutzung grün fluoreszierender E. coli-Bakterien etablierten wir ein flowzytometrisches Testverfahren zur Erfassung der Aufnahme und Degradation lebender Bakterien durch Monozyten und Granulozyten im Vollblut. Anschließend verglichen wir immunsupprimierte (i) Nierentransplantat-Patienten bzw. (ii) Patienten mit post-operativer Sepsis im Stadium der Immunparalyse mit gesunden altersgleichen Probanden hinsichtlich der Phagozytoseleistung der Monozyten und Granulozyten. *Ergebnisse.* Unsere Untersuchungen ergaben, dass der Bakterienabbau sowohl in Monozyten als auch in Granulozyten mit dem Alter abnimmt. Darüber hinaus zeigten Granulozyten von Sepsis-Patienten in Immunparalyse eine verminderte Bakterienaufnahme, während sich in Monozyten von Nierentransplantat-Patienten ein verminderter Bakterienabbau nachweisen ließ. *Zusammenfassung.* Wir beschreiben einen einfachen und verlässlichen flowzytomterischen Test zur Messung von Aufnahme und Abbau lebender Bakterien durch Monozyten und Granulozyten im Vollblut. Mit Hilfe dieses Testes entdeckten wir signifikante Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseleistung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit sekundären Immundefekten, die eine Ursache für die erhöhte Infektionsrate in diesen Patienten sein könnten.

---

## Abstract

*Background.* The phagocytosis of pathogens is essential for fighting infections. However, an assay measuring both engulfment and degradation of bacteria under *in vivo* like conditions is currently not available. *Material and Methods.* Based on enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing *E.coli* we created a flow cytometric assay measuring both engulfment and degradation of living bacteria by monocytes and granulocytes in human whole blood. To determine whether the test was able to detect differences between healthy subjects and patients with secondary immunodeficiencies, we compared the phagocytosis of monocytes and granulocytes from immunosuppressed kidney transplant patients and patients with post-operative sepsis in immunoparalysis with respective age-matched healthy subjects. *Results.* Using this assay we found that bacterial degradation in monocytes and granulocytes decreases with age. Furthermore, we detected a diminished bacterial engulfment in granulocytes from septic patients and a reduced bacterial degradation in monocytes from immunosuppressed kidney transplant patients. *Conclusion.* We describe a simple and reliable flow cytometric assay to measure the engulfment and degradation of live bacteria by human blood monocytes and granulocytes. By means of this assay we detected significant differences between healthy controls and patients with secondary immunodeficiencies that may contribute to the increased incidence of infection complications seen in these patients.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
1.1	Historischer Rückblick	11
1.2	Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen	11
1.2.1	Primäre Abwehr	12
1.2.2	Sekundäre und Tertiäre Abwehr	13
1.3	Die Phagozytose	15
1.3.1	Opsonisierung	16
1.3.2	Lipopolysaccharide (LPS) und Signaltransduktion	17
1.4	Immundefizite im Phagozytose-System	19
1.4.1	Angeborene Immundefizienz	19
1.4.2	Erworbene Immundefizienz	20
1.5	Assays zur Analyse der Phagozytose der Granulozyten und Monozyten	22
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1	Materialien	25
3.1.1	Verwendeter Escherichia coli – Stamm	25
3.1.2	Kulturmedien	25
3.1.3	Geräte	26
3.1.4	Puffer, Lösungen	26
3.1.5	Antikörper	27
3.1.6	Sonstige Reagenzien	27
3.1.7	S-Monovetten – Blutentnahme – System	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Prinzip des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays	28
3.2.1.1	Herstellung der E. coli - Stammlösung	28
3.2.1.2	Rekultivierung der E. coli Bakterien	29
3.2.1.3	Vorbereitung der Proben	29
3.2.1.4	Inkubation	30
3.2.1.5	Markierung mit fluoreszenzmarkierten spezifischen monoklonalen Antikörpern	30
3.2.1.6	Lyse und Fixation	31

3.2.1.7	Messung der Fluoreszenz mittels Zytofluorometrie .....	31
3.2.1.8	Auswertung der zytofluorometrischen Meßergebnisse.....	34
3.2.1.9	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse.....	37
3.2.2	Vermehrungsfähigkeit von E. coli in Abhängigkeit vom Medium .....	37
3.2.3	Adaptierung des Orpegen <sup>®</sup> -Pharma – Phagotests <sup>®</sup> .....	39
<b>3.3</b>	<b>Probanden und Patienten.....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Probanden .....	40
3.3.2	Patienten .....	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Assay-Etablierung.....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Keimzahlbestimmung .....	43
4.1.2	Optimierung der Mediums-Bedingungen: Vermehrungsfähigkeit von E. coli in Abhängigkeit vom Medium .....	43
4.1.3	Auswahl der Messzeitpunkte.....	46
4.1.4	Einfluss der unterschiedlichen Antikoagulanzen auf die Phagozytose und Degradation .....	48
4.1.5	Abhängigkeit der Phagozytose und Degradation von der Bakterienkonzentration.....	51
4.1.6	Abhängigkeit der Phagozytose von der Phagozytenkonzentration.....	52
<b>4.2</b>	<b>Validierung des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Einfluss der Dauer der Lagerung auf die Ergebnisse des EGFP-Phagozytose- Degradation-Assays.....	54
4.2.2	Aufbewahrung messbereiter Proben.....	56
<b>4.3</b>	<b>Qualitätssicherung für den EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay .....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Ergebnisse der Intra-Assay-Variation .....	57
4.3.2	Ergebnisse der Inter-Assay-Variation .....	60
<b>4.4</b>	<b>Anwendung des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays unter Verwendung von Blutproben gesunder Normalprobanden und immundeprimierter Patienten .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Übersicht.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>GFP-Fluoreszenz .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>Fluoreszenz-Signalstärke der transformierten E. coli - Bakterien .....</b>	<b>66</b>

---

5.4 Physiologische Mediumsbedingungen.....	67
5.5 Phagozytose - Bakterienmenge und Messzeitpunkt .....	68
5.6 Auswahl des Antikoagulans .....	68
5.7 Mechanische Umwelteinflüsse .....	69
5.8 Auswahl der Antikörpermarkierung zur Zelldifferenzierung .....	70
5.9 Intra- und Inter-Assay-Variation .....	70
5.10 Auswirkungen der FITC-Markierung auf Bakterien .....	70
5.11 Erste Anwendungsergebnisse und Zukunftsperspektiven .....	71
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>84</b>

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
APC	„Antigen-presenting cell“, Antigen-präsentierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
CD	„Cluster of differentiation“, internationale Nomenklatur zellulärer Oberflächenmarker der Leukozyten
CFU-GEMM	„colony-forming-unit for granulocytes, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes“
cpm	„counts per minute“, Zähler pro Minute
CR	„complement receptor“
CrP	C-reaktives Protein
d. h.	das heißt
DIC	„disseminated intravascular coagulation“, disseminierte intravasale Gerinnung
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	und Mitarbeiter
etc.	et cetera = und so weiter
Fa.	Firma
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	„Forward scatter“ = Vorwärtsstreulicht
g	Einheit der relativen Zentrifugalkraft oder Gramm (Gewichtseinheit) → je nach Zusammenhang
GFP	„green fluorescent protein“ = grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde, Zeiteinheit
HLA	„human leukocyte antigen“, Bezeichnung für MHC



---

	beim Menschen
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton, Masseinheit
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LBP	„Lipopolysaccharid-binding-protein“ = LPS- bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien B4 = Leukotaxin
mAK	monoklonaler Antikörper
MBL	„mannan-binding lektin“
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupt- Histokompatibilitäts-Komplex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor-kappa B“
NP	Normalprobanden
nm	Nanometer
$\mu$ l	Mikroliter
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PCT	Procalcitonin
PC5	Phycoerythrin-Cyanin-5-Protein
pEGFP	„plasmid for enhanced green fluorescent protein“, EGFP-Plasmidvektor
PerCP	Peridin-Chlorophyll-A-Protein
PMN	polymorphonuclear leukocytes, neutrophile polymorphkernige Granulozyten
PRR	„pattern-recognition receptor“

---

rpm	„rounds per minute“, Drehungen in der Minute
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
s. o.	siehe oben
SSC	„Sideward scatter“ = Seitwärtsstreulicht
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
u. a.	unter anderem
VarK	Variationskoeffizient
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent

---

## 1 Einleitung

### 1.1 Historischer Rückblick

Mit der Entdeckung der Mikroorganismen durch Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) um 1670 und mit der Aufstellung der Erregertheorie der Krankheiten durch Louis Pasteur (1822-1885) wurden wichtige Fundamente für die wissenschaftliche Bakteriologie gelegt. Robert Koch (1843-1910) erbrachte im Jahre 1876 den Beweis, dass Infektionskrankheiten, wie von Pasteur vermutet, tatsächlich durch Mikroorganismen verursacht werden. Damit begann die gezielte Suche nach Schutz- bzw. Abwehrmechanismen gegen diverse Krankheitskeime. So konnte Pasteur die Impfstoffe gegen Hühnercholera, Milzbrand und Tollwut entwickeln. Wenig später, um 1890, entdeckten Emil von Behring (1854-1917) und Shibasaburo Kitasato (1852-1931) im Serum geimpfter Individuen Antikörper, die ein wichtiger Bestandteil der spezifischen, erworbenen Immunität sind. Im Jahre 1884 entdeckte der russische Immunologe Elie Metschnikoff die Endozytose und die phagozytierenden Zellen, die er Makrophagen nannte. Diese Zellen sind wichtige Bestandteile der unspezifischen, angeborenen Immunität, wobei Metschnikoff der **Phagozytose** eine zentrale Stellung in der Immunantwort einräumte (1,2).

### 1.2 Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen

Die spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems wirken nicht unabhängig voneinander, sondern verstärken und ergänzen sich gegenseitig in ihrer eliminierenden Wirkung gegenüber körperfremden Organismen oder abnormen Körperzellen. Infektiöse Pathogene kann man im Wesentlichen in intrazellulär und extrazellulär liegende Pathogene unterscheiden. Diese Unterteilung lässt sich weiter aufgliedern, z. B. in Mikroorganismen, die, wenn sie intrazellulär vorkommen, sich entweder frei im Zytoplasma oder nur in Vesikeln vermehren können. Andere, die extrazellulär vorkommen, können sich frei im Körper oder nur an der Oberfläche von Epithelien vermehren (3). Welche Abwehrmechanismen bei der Infektabwehr im Vordergrund steht, ist von der Art des mikrobiellen Organismus und vom Ort der Infektion abhängig. Alle folgenden Ausführungen konzentrieren sich vor allem

---

auf Abwehrstrategien des angeborenen, unspezifischen Immunsystems, die der menschliche Organismus gegen extrazelluläre Bakterien, wie z. B. E. coli, Streptokokken, Staphylokokken, entwickelt hat.

Allgemein lassen sich 3 Ebenen der Abwehr unterscheiden: primäre, sekundäre und tertiäre Abwehr.

### 1.2.1 Primäre Abwehr

Unser Körper ist auf vielfältige Art und Weise vor Erregern geschützt. Das erste Hindernis, das es für pathogene Keime zu überwinden gilt, ist die Haut, die wie eine Schutzhülle das Eindringen von Keimen physikochemisch verhindert. Selbst die sensibleren Schleimhäute haben wirksame Barrierefunktionen.

Insgesamt gibt es 3 unspezifische natürliche Abwehrfunktionen, über welche die Haut und Schleimhaut verfügen: mechanische, chemische und mikrobiologische.

Die mechanische Barriere wird vor allem durch die Epidermis mit ihren Zellschichten aus zum Teil verhornenden Plattenepithelzellen, die in ihren obersten Schichten bereits aus vollständig verhornten und abgestorbenen Hornzellen (Korneozyten), die ein so genanntes Stratum corneum bilden, gewährleistet. Darüber hinaus ergänzt die darunter liegende Dermis, mit ihrer dicken Bindegewebeschicht aus Kollagenfasern, die für Elastizität und Reißfestigkeit sorgen, die mechanische Barriere.

Analog dazu ist die Schleimhaut aus einer äußeren Epithelschicht und inneren Bindegewebeschicht aufgebaut. Darüber hinaus wird durch die Produktion von Schleim und Speichel sowie die Bewegung von Zilien an der Epitheloberfläche die Anheftung vieler Mikroorganismen auf der Mukosa verhindert.

Die chemische Barrierefunktion der Haut wird unter anderem durch Fettsäuren zwischen den Zellen, die gemeinsam mit den Korneozyten eine wasserabweisende Schutzschicht bilden, erreicht. Die Schleimhaut ist zur Sekretion antibakterieller Substanzen in der Lage, wie z. B. Lysozym und IgA in Speichel und Tränen und Pepsin im Darm. Im Weiteren trägt die Sekretion von Magensäure zur Abtötung der mit Nahrung aufgenommenen Bakterien bei. Eine ausgesprochen wichtige Rolle bei Aufrechterhaltung der chemischen Barriere der Haut und Schleimhäute spielen antibakterielle Peptide wie z. B. die alpha-

---

und beta- Defensine und S100-Proteine. Sie stellen endogene Antibiotika dar, die vor allem in Epithelzellen, aber auch in Granulozyten und Makrophagen, gebildet werden und z. B. durch eine membranschädigende Wirkung pathogene Keime abtöten. Darüber hinaus sichern sie z. B. durch ihre chemotaktischen Eigenschaften die Vernetzung von angeborenem und adaptivem Immunsystem indem sie entsprechende Zellen anlocken oder aktivieren (4).

Als mikrobiologische Barriere fungiert unsere physiologische, symbiotische Bakterienflora auf Haut und Schleimhaut. Die bereits physiologischerweise vorhandenen Bakterien stellen für pathogene Keime eine natürliche Konkurrenz um Ressourcen, wie Bindungsstellen, Nährstoffe etc., dar. Außerdem bilden z. B. physiologische Bakterien des Dünndarms zum Teil Colizine, eine Gruppe von Bakteriziden, die pathogene Bakterien töten. Diesen, durch natürliche Konkurrenz zwischen physiologischer Flora und pathogenen Keimen vermittelte Schutzmechanismus wird auch als "Kolonisierungsresistenz" bezeichnet.

Erst wenn es den Bakterien gelingt, die äußeren Invasionsbarrieren zu überwinden, und in das innere des Körpers eindringen, wird die sekundäre und tertiäre Abwehr wirksam.

### 1.2.2 Sekundäre und Tertiäre Abwehr

Die sekundäre Abwehr ist eine angeborene, unspezifische Immunabwehr als lokale Antwort auf pathogene Keime, nachdem diese in den Organismus eingedrungen sind. Das Komplement-System, Mastzellen und Makrophagen sind die entscheidenden Bestandteile dieser Abwehr. Die meisten Mikroorganismen, denen es gelingt, die primäre Abwehr zu überwinden, sind innerhalb kürzester Zeit von Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems entdeckt und vernichtet worden (vor allem durch aktivierte Bestandteile des Komplement-Systems und durch Phagozytose), ohne das das Eingreifen des auf klonaler Expansion antigen-spezifischer Lymphozyten beruhenden erworbenen, spezifischen Immunsystems (= der tertiären Abwehr) nötig wird.

Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems, wie Phagozytose, Komplementaktivierung und Mastzell-Aktivierung reagieren sofort auf die Anwesenheit von Mikroorganismen. Dagegen kommt die erworbene,

---

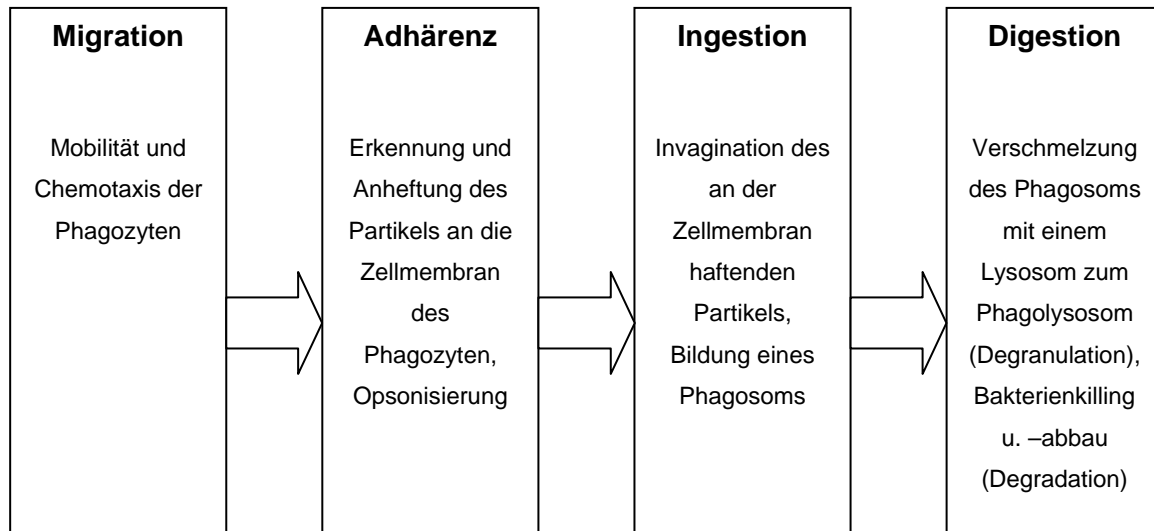
spezifische Immunantwort erst nach Tagen zum Tragen. Das ist bedingt durch die Tatsache, dass die klonale Expression und Differenzierung der Lymphozyten, z. B. zu Plasmazellen, zu zytotoxischen T-Zellen oder von naiven CD4+ T-Zellen zu T-Helfer -Zellen mehrere Tage in Anspruch nimmt (5).

Zu den zur Phagozytose befähigten Zellen gehören neben Makrophagen auch die neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) und die Monozyten, die man auch unter dem funktionell geprägten Begriff „Professionelle Phagozyten“ zusammenfasst. Monozyten und die neutrophilen Granulozyten stammen von einer gemeinsamen myeloiden Progenitorzelle (CFU-GM) ab und werden im Knochenmark gebildet. Von dort gelangen die Monozyten in den Blutstrom, wo sie für 1 bis 2 Tage als noch relativ unreife Phagozyten zirkulieren, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und sich dort zu gewebetypischen Makrophagen oder Dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Neutrophile Granulozyten sind kurzlebig und zirkulieren nach Verlassen des Knochenmarkes nur sehr kurze Zeit im Blut, d.h. etwa 6 bis 8 Stunden. Neutrophile Granulozyten reagieren sehr schnell und zahlreich auf chemotaktische Reize und sind neben Gewebemakrophagen die ersten phagozytierenden Zellen, am Infektionsort, gefolgt von Monozyten (6). Ebenso wie die Monozyten / Makrophagen sind sie in der Lage Mikroorganismen auch in Abwesenheit spezifischer Antikörper zu phagozytieren, d. h. erkennen bestimmte Zellwandkomponenten von Bakterien direkt. Das ist besonders wichtig, wenn der Körper zum ersten Mal Kontakt mit einem bestimmten Mikroorganismus hat. Monozyten/Makrophagen sind den neutrophilen Granulozyten zwar zahlenmäßig unterlegen, nehmen dafür aber an der bidirektionalen Interaktion zwischen angeborener und spezifischer Immunität teil, indem sie nicht nur direkt auf die Mikroorganismen reagieren, sondern auch die spezifische Lymphozyten-Antwort initiieren und regulieren können. Die Lymphozyten verstärken ihrerseits wiederum die antimikrobielle Funktion der Monozyten/Makrophagen. Zu den prinzipiellen Funktionen der mononukleären Phagozyten gehören: die Phagozytose, die Produktion und Sekretion von Zytokinen und die Mitwirkung bei der Induktion der spezifischen Immunantwort.

(6)

### 1.3 Die Phagozytose

Die Phagozytose ist ein komplexer Prozess zur Aufnahme großer Partikel (Durchmesser  $>0,5 \mu\text{m}$ ), wie z. B. Mikroorganismen, Gewebetrümmer, Fremdkörper in die Zelle (7).



Voraussetzung für die Phagozytose ist, dass die aufzunehmenden Partikel zuerst auf der Oberfläche der Phagozyten, in einem Prozess der Adhärenz genannt wird, an Rezeptoren gebunden werden. Interessanterweise werden nicht alle gebundenen Partikel auch phagozytiert (6). Die meisten Partikel werden von mehr als einer Rezeptorart erkannt, die miteinander „kommunizieren“ und zusammenwirken. Außerdem haben viele dieser Rezeptoren doppelte Funktionen, d.h. vermitteln nicht nur die Adhärenz sondern auch die Aufnahme der Pathogene. Phagozyten verfügen über zahlreiche Rezeptoren mit einem breiten Erkennungsspektrum. Sie orientieren sich dabei an pathogen-assoziierten molekulären Mustern, die nur von mikrobiologischen Pathogenen produziert werden, d.h. nicht auf höheren eukaryotischen Zellen zu finden sind, und für gewöhnlich für das Überleben oder die Pathogenität dieser Mikroorganismen essentiell sind. Janeway hat vorgeschlagen, diese Muster „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) und die entsprechenden phagozytären Rezeptoren „pattern-recognition receptors“ (PRRs) zu nennen (8). Bedingt durch die Lebensnotwendigkeit dieser mikrobiellen Strukturen wirkt sich die hohe Mutationsrate, die Mikroorganismen eigen ist, nicht auf diese Muster aus, so

---

dass sie meist bei allen Angehörigen einer Klasse von Pathogenen zu finden sind. Beispiele dafür sind die Peptidoglykane, die Bestandteil aller Bakterien sind, oder die bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS), deren generelle Struktur alle gramnegativen Bakterien miteinander teilen, oder die Lipoteichonsäure in grampositiven Bakterien (9, 10). Weitere für die Phagozytose wichtige Makrophagen-Rezeptoren sind die Mannose-Rezeptoren, die Calcium-abhängig sind und zur Familie der Lektine zählen, und die Scavenger Rezeptoren, die an die bakterielle Zellwand binden und ebenfalls die Phagozytose bewirken. Als nächster Schritt der Phagozytose folgt die aktive Internalisierung (Ingestion) des adhärenen Partikels. Die Phagozytose ist ein energieverbrauchender Prozess, der es erfordert, dass aktivierte Rezeptoren an das Zellinnere ein Signal aussenden, das den Makrophagen aktiviert und den Mechanismus in Gang setzt.

### 1.3.1 Opsonisierung

Die Phagozytose wird durch Beladung von Mikroorganismen mit Antikörpern und Komplementfaktoren erhöht. Diese so genannte Opsonisierung ermöglicht auch die Aufnahme von Mikroorganismen, die durch Kapseln geschützt sind, wie z. B. E. coli. Phagozyten verfügen für Opsonin-abhängige Prozesse vor allem über zwei Rezeptorgruppen: Rezeptoren, die den Fc-Teil von Immunglobulinen G (IgG) erkennen können und solche, die Komplementfaktoren binden.

Auf Phagozyten werden drei Klassen von Rezeptoren für IgG exprimiert: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) und Fc $\gamma$ RIII (CD16), wobei der Fc $\gamma$ RI die höchste Affinität zu IgG aufweist und seine Transkription durch IFN- $\gamma$  induziert werden kann.

Komplementfaktoren werden von Phagozyten über die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 gebunden. CR1 (CD35) bindet Komplementfaktor C3b, der durch Einwirken der C3-Konvertase bei Aktivierung des Komplementsystems über einen der drei möglichen Aktivierungswege (klassisch, alternativ, MBL) entsteht. Durch proteolytische Spaltung von C3b entsteht das stabile Opsonin iC3b, das an die Komplementrezeptoren CR2 (CD21), CR3 (CD11b) und CR4



---

(CD11c) bindet und eine wesentliche Rolle in der komplementvermittelten Beseitigung von Mikroorganismen spielt.

Zu den CD11 Molekülen ist anzumerken, dass diese erst zusammen mit CD18 vollständige Komplementrezeptoren ergeben. CD11 und CD18 sind Integrine, die aus Heterodimeren bestehen, wobei CD11 die  $\alpha$ - und CD 18 die  $\beta_2$ -Kette liefern.

Während Fc-Rezeptoren grundsätzlich eine Phagozytose bewirken, binden CR-Rezeptoren zwar zu phagozytierende Partikel, internalisieren sie aber nicht ohne einen zusätzlichen Stimulus, wie er z. B. von TNF- $\alpha$  oder GM-CSF geboten wird (11, 12).

### 1.3.2 Lipopolysaccharide (LPS) und Signaltransduktion

Darüber hinaus hat man Rezeptoren der Toll-Familie identifiziert, die eine große Rolle in der Induktion der Immunantwort und Entzündungsreaktion spielen. So gehört der Toll-Like Receptor 4 (TLR4), zu den Proteinen, die an der Erkennung von Lipopolysacchariden beteiligt sind (9).

Zuerst interagieren Lipopolysaccharide (LPS) mit einem Serumprotein namens Lipopolysaccharide-bindendes Protein (LBP), welches das LPS zum Rezeptor CD14 transferiert. CD14 ist ein Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und aktivierten polymorphkernigen Leukozyten exprimiert wird (13). Er bindet LPS und LBP. Während in Anwesenheit von LBP schon geringe Mengen an LPS ausreichen, um zur Induktion der Zytokinproduktion in Makrophagen zu führen, sind ohne LBP hohe Konzentrationen nötig, um eine gleichstarke Reaktion auszulösen (14). Der LPS-Erkennungs-Komplex besteht allerdings mindestens aus 3 Komponenten: CD14, TLR4 und einem Protein namens MD-2, welches konstitutiv mit TLR4 assoziiert ist (9). Die Bindung von LPS an diesen Komplex aktiviert u. a. über NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) den Signaltransduktionweg, der die Transkription von Genen der Entzündungsreaktion und Immunantwort (z. B. Synthese von Zytokinen und co-stimulierenden Molekülen) induziert. So setzt die Erkennung von PAMPs durch PRR nicht nur die Phagozytose in Gang. Sie bewirkt gleichzeitig, dass die aktivierten Makrophagen Mediatoren (Zytokine

---

und Chemokine) ausschütten und dadurch weitere phagozytierende Zellen aktivieren und rekrutieren (15).

Interessanterweise wurde in elektronenmikroskopischen Studien beobachtet, dass verschiedene Phagozytoserezeptoren verschiedene Ingestionsmechanismen in Gang setzen (16, 17).  $Fc\gamma$ -Rezeptoren z. B. bewirken, dass sich Pseudopodien seitlich um das membrangebundene Partikel schieben, während sich gleichzeitig die Plasmamembran im Zentrum nach innen stülpt. Dadurch vergrößert sich laufend die Kontaktfläche zwischen Membranrezeptoren und Liganden auf dem Mikroorganismus, so dass der Impuls für den Phagozytosevorgang ständig wächst. Ist der Mikroorganismus vollständig von Zytoplasma umschlossen, verschmelzen die Pseudopodienspitzen miteinander, wodurch sich das phagozytierte Partikel in einem Membran-ausgekleideten Phagosom befindet. Dieser Mechanismus wird als das klassische Reißverschluss-Modell bezeichnet (15, 7). Komplement-opsonisierte Partikel scheinen hingegen einfach in die Zelle zu sinken, wobei nur kleine oder gar keine Pseudopodien beobachtet werden können (16, 17). Die Membranbewegungen werden durch kontraktile Aktin- und Myosin-Mikrofilamente innerhalb des Zytoplasmas ausgeführt. In mononukleären Phagozyten fusionieren Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen die Degradation des aufgenommenen Materials erfolgt. In den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten verschmelzen die Phagosomen mit Vesikeln, die als Granula und der Verschmelzungsprozeß als Degranulation bezeichnet wird. Im Wesentlichen handelt es sich aber um ähnliche Prozesse. Die Granula bzw. Lysosomen enthalten eine große Bandbreite an hydrolytischen Enzymen - wobei die meisten von ihnen ihr Optimum um pH 5,0 haben. Es sind Phospholipasen, Lysozyme, Peroxidasen, saure Hydrolasen, deren antimikrobieller Effekt durch das Myeloperoxidase-System (MPO) deutlich verstärkt wird. Des Weiteren beinhalten die Granula auch neutrale Proteasen, wie Elastasen und Kollagenasen, Cathepsine, Plasminogenaktivatoren (t-PA, u-PA), Laktoferrine und antimikrobiell wirksame Substanzen, wie die antibakteriellen Peptide, die humanen alpha-Defensine, die etwa 30% des Inhalts ausmachen. Darüber hinaus werden zur Abtötung Wasserstoffperoxid, Superoxidanion und das Stickstoffoxid in die Granula

---

freigesetzt. Der Vorgang, bei dem diese Substanzen gebildet werden heißt respiratory burst und ist sauerstoffabhängig. In diesem Zusammenhang hat man bereits 1932 die Beobachtung gemacht, dass während der Phagozytose der Sauerstoffverbrauch eines Granulozyten auf das 50 bis 100fache ansteigt (18).

#### **1.4 Immundefizite im Phagozytose-System**

Professionelle Phagozyten spielen bei der Verhütung und Bekämpfung bakterieller Infektionen eine entscheidene Rolle. Eine Funktionsminderung einzelner Komponenten dieses System kann zu einer lebensbedrohlichen Schwächung der Immunabwehr führen. Man kann Phagozytenfunktionsstörungen in primäre, d.h. angeborene oder sekundäre, d.h. erworbene einteilen. Außerdem können sie einen oder mehrere Teilschritte der Phagozytose betreffen und von permanenter oder temporärer Natur sein. Das klinische Bild von Erkrankungen mit gestörter Phagozytenfunktion reicht von milden bakteriellen Hautinfektionen bis hin zu schweren, nicht beherrschbaren systemischen hauptsächlich bakteriellen, seltener fughalen Infektionen.

##### **1.4.1 Angeborene Immundefizienz**

Die angeborenen Defekte der Phagozytose sind selten und treten meist als Granulozytenfunktionsstörung, die mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht, in Erscheinung. Betroffen sind dann meist Säuglinge und Kleinkinder, deren Defekt erblich bedingt ist. Deshalb können Familienuntersuchungen helfen, Befunde zu stützen. Es gibt aber auch Fälle, in denen sich Granulozytenfunktionsstörungen erst im Erwachsenenalter manifestieren, z. B. wenn noch Restfunktionen vorhanden sind. (Tab. 1: Primäre Granulozytendefekte)

Tab. 1: Primäre Granulozytendefekte (19)

<b>Granulozyten-Funktionsstörungen (n. L. Thomas)</b>
<b>primäre Granulozytendefekte</b>
<b>Chemotaxisdefekte*</b>
Leukocyte Adhesion deficiency syndrom (LAD)
• LAD I (SC18/CD11 Defekt)
• LAD II (CD15 Defekt)
Lazy-leukocyte-syndrom
• Ursache unbekannt
Aktin-Dysfunktion
• Defekt der Aktinpolymerisation?
Trigger Defekte
Rezeptordefekte, Defekte der Signalübertragung
<b>Störung der Bakterizidie</b>
Chronische Granulomatose
• Defekt der Sauerstoffradikalproduktion:
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Defizienz
Cytochrom-b-Defekt, NADPH-Oxidase-Defekte
Myeloperoxidase-Mangel (führt nur in seltenen Fällen zu einer
Störung der Infektabwehr)

#### 1.4.2 Erworbene Immundefizienz

Polytraumata (20), ausgedehnte Verbrennungen (21) und chirurgische Eingriffe (22) können zu einer vorübergehenden Defizienz verschiedener immunologischer Abwehrmechanismen führen (23). So wurde bei Patienten mit Verbrennungen z. B. eine verminderte Phagozytosefähigkeit, und bei Traumapatienten eine veränderte Chemotaxis und Adhärenz neutrophiler Granulozyten beobachtet (23, 24). Solche Defekte bewirken eine gesteigerte Anfälligkeit der Patienten gegenüber Pathogenen und klinische Studien haben gezeigt, dass septische Komplikationen bei Patienten mit Traumen oder Verbrennungen mit der Schwere ihrer Verletzung korrelieren (23). Aber auch metabolische Störungen wie Diabetes mellitus führen zu einer sekundären

---

Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten (25, 26, 27), die durch eine adäquate Insulintherapie wieder an Funktionalität gewinnen (28). Unter medikamentös immunsupprimierten Patienten, wie z. B. Transplantatempfängern, findet man ebenfalls eine erhöhte Sepsis-Inzidenz. (29), (Tab. 2: Sekundäre Granulozytendefekte).

Um septische Komplikationen zu verhindern oder bereits septische Patienten erfolgreich zu behandeln, reicht es nicht aus, Antibiotika/Antimykotika prophylaktisch oder therapeutisch einzusetzen. Es ist notwendig, eine entsprechend an den Zustand des individuellen Patienten angepasste Immuntherapie durchzuführen. Unkontrollierte Immunstimulation kann den Zustand weiter problematisieren (30), da einige Immunmodulatoren, wie z. B. TNF- $\alpha$  (31) und IL-1 (32) in die Pathogenese septischen Geschehens einbezogen sind. Es ist also von großer Bedeutung, den Funktionszustand des Immunsystems von Patienten objektiv einschätzen zu können, sowohl um gezielt therapieren zu können als auch um besser vorhersagen zu können, welche Patienten besonders gefährdet sind. Die Einschätzung des Zustandes septischer Patienten erfolgt im wesentlichen nach Scoresystemen, die typische klinische Symptome (Hyperthermie bzw. Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotonie) erfassen (33) und nach Laborparametern (Blutbildveränderungen, Leukozytose bzw. Leukopenie, Linksverschiebung/Auftreten unreifer Granulozyten, Gerinnungsstörungen, Procalcitonin, HLA-DR-Expression).

Besonders die Einführung der zytofluorometrischen Bestimmung der HLA-DR-Expression auf Blutmonozyten zur Einschätzung des „Immunstatus“, durch die Arbeitsgruppe Volk, hat geholfen, neue Strategien für die Sepsistherapie zu entwickeln und deren Effizienz labormedizinisch zu verfolgen (34).

Die Bedeutung der Blutmonozyten ist aber nicht auf ihre Antigen-präsentierenden Fähigkeiten zu reduzieren. Andere spezifische Parameter, die die zelluläre Aktivierung beschreiben, wie z. B. die Sauerstoffradikalproduktion, die lysosomale Proteaseaktivität, die zelluläre Phagozytoseaktivität und die Synthese von Zytokinen können potentiell sehr hilfreich sein um den Immunstatus der Patienten exakt widerzuspiegeln (35).

Tab. 2: Sekundäre Granulozytendefekte (19).

<b>Granulozyten-Funktionsstörungen (n. L. Thomas)</b>
<b>Granulozyten-Funktionsstörungen bei anderen Grunderkrankungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chediak-Higashi-Syndrom</li> <li>• Glykogenose Typ Ib</li> <li>• Down-Syndrom</li> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Mannosidose</li> <li>• Hypergammaglobulinämie E (Job-Syndrom)</li> <li>• Schwachmann-Diamond-Syndrom</li> <li>• Goltz-Görlin-Syndrom</li> </ul>
<b>Sekundäre passagere Granulozytendefekte als Folge von</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infektionen, z.B. Influenza A, HIV</li> <li>• Immunsuppressiver Therapie</li> <li>• Antibiotika-Therapie</li> <li>• Traumata, Verbrennungen</li> <li>• Unterernährung, Vitamin-C-Defekt</li> <li>• Alkoholintoxikation</li> <li>• Tumoren</li> </ul>
<b>Reduzierte Granulozytenfunktion bei</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neugeborenen (bis ca. 6 Monaten)</li> <li>• Alten Menschen (&gt; 80 Jahre)</li> </ul>

### 1.5 Assays zur Analyse der Phagozytose der Granulozyten und Monozyten

Eine präzise Einschätzbarkeit der Phagozytoseleistung und des Degradationsvermögens könnte möglicherweise dazu beitragen, temporäre partielle Immundefizite frühzeitig zu erfassen oder eine immunstimulatorische Therapie fein abzustufen. Vor allem die Arbeitsgruppe um Bjerknes und Basso (Universität zu Bergen, Norwegen) hat sich in den achtziger Jahren intensiv mit der Entwicklung durchflußzytometrischer Methoden zur Phagozytosemessung

---

befasst. Diese bieten im Vergleich zu den mikroskopischen Methoden den Vorteil der schnellen Erfassung großer Zellzahlen in kleinen Blutproben. Inzwischen bietet die Firma Orpegen<sup>®</sup> (Heidelberg) einen kommerziellen Testkit namens Phagotest<sup>®</sup> zur quantitativen Analyse der Phagozytose der Granulozyten und Monozyten im Vollblut an. Der Orpegen<sup>®</sup>-Pharma-Phagotest<sup>®</sup> ist ein heparinhaltiger Vollbluttest zur Untersuchung der Phagozytose-Funktion von Granulozyten und Monozyten. Der Phagotest<sup>®</sup> quantifiziert die Ingestion von FITC-markierten opsonierten E. coli Bakterien und misst den Prozentsatz an Phagozyten, die sich an der Ingestion beteiligten und deren Aktivität (die mittlere Fluoreszenz-Intensität entspricht der Zahl der Bakterien pro Zelle). Die Analyse der Proben erfolgt in der Regel mittels Durchflußzytometrie (36). Eine breitere klinische Validierung der verschiedenen vorhandenen Phagozytose-Assays steht jedoch noch weitgehend aus (35).

---

## 2 Zielstellung

Phagozytose und Degradation aufgenommener Erreger gehören zu den wichtigsten Mechanismen des menschlichen Organismus in der Abwehr von Mikroorganismen. Eine Minderung der Phagozytose- und/oder Degradationsleistung spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entstehung und Ausbreitung von Infektionen in immunsupprimierten Patienten. Die Charakterisierung von Phagozytose- und Degradationsleistung durch das Immunsystem ist bisher jedoch nur unzureichend möglich. So arbeiten derzeit erhältliche Tests (z. B. Phagotest<sup>®</sup> von Orpegen<sup>®</sup>-Pharma) mit abgetöteten und FITC-markierten, d.h. in ihrer Oberflächenstruktur veränderten Bakterien. Diese Tests erfassen jedoch nur gravierende (meist angeborene) Funktionsstörungen der Phagozytose und erlauben keine Aussage über die Degradationsleistung der Zellen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines Testverfahrens, das unter möglichst physiologischen Reaktionsbedingungen auch gering gradigere Funktionsstörungen der Phagozytose erfasst und Aussagen zur Degradationsleistung erlaubt. Dazu sollten lebende, teilungsfähige, und in ihrer Oberflächenstruktur nicht veränderte Bakterien (*E. coli*) zum Einsatz kommen. Um die Bakterien dennoch zytofluorometrisch nachweisen zu können, sollten sie durch Transformation befähigt werden, ein fluoreszierendes Protein zu synthetisieren, das nur intrazellulär exprimiert wird.

Im Rahmen der Testentwicklung sollten verschiedene Kultur-Bedingungen, Messzeitpunkte, Antikoagulanzen, Bakterienkonzentrationen und Phagozytenkonzentrationen ausgetestet werden. Die Validierung des neuen Testverfahrens sollte über die Bestimmung der Intra- und Interassay-Variationen erfolgen. Abschließend sollten die Testergebnisse von Normalprobanden und immunsupprimierten Patienten mit einander verglichen werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verwendeter Escherichia coli – Stamm

In allen Versuchen wurde der apathogene Escherichia coli Stamm JM109(DE3) (Fa. Promega, Mannheim) verwendet. Durch Transformation mit dem Plasmid-Vektor pEGFP der Firma Clontech Laboratories, Heidelberg (Catalog # 6077-1), wurden die Bakterien so verändert, dass sie ein durchflußzytometrisch-nachweisbares, grün-fluoreszierendes Protein (GFP) produzieren und als Selektionsmerkmal eine Resistenz gegen Ampicillin besitzen.

GFP wurde in Leucht-Quallen (*Aequorea victoria*) entdeckt, die zur Biolumineszenz befähigt sind. Es besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa. Der eigentliche Fluorophor des GFP wird offenbar aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 innerhalb der 238 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette gebildet.

EGFP ist eine durch Mutation entstandene Variante des natürlichen GFP (wt GFP). Dies hat zur Folge, dass die Wellenlänge für die maximale Anregung (excitation) von EGFP zu 488 nm verschoben ist. EGFP fluoresziert 35-mal intensiver als wt GFP, wenn es mit 488 nm angeregt wurde. Das Emissionsmaximum von EGFP liegt bei 509 nm.

##### 3.1.2 Kulturmedien

Tab. 3: **Kulturmedien**

Name	Zusammensetzung	Herkunft
Luria-Bertani-Medium	1 Liter Aqua dest. 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl	im Molekularbiologischen Institut der Charité hergestellt
Select Agar		Fa. Gibco BRL, Eggenstein
Heparin-Kulturmedium	437,5 ml VLE-RPMI 1640 mit:	Fa. Biochrom, Berlin

	50 ml hitzeinaktiviertes FKS, 5,5 ml L-Glutamin, 1,25 ml Heparin (6250,0 I.E. Heparin), 6,25 ml Streptomycin / Penicillin Lösung (1000 IU/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	
--	---	--

### 3.1.3 Geräte

Tab. 4: **Geräte**

Bezeichnung	Herkunft / Firma
Schüttelinkubator	Gallenkamp, Loughborough, UK
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, New York, USA
4053 Kinetics Spectrophotometer	LKB Biochrom Ultrospec K, Cambridge, England
Thermomixer comfort 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Franz Skorczewski KG; Laborgeräte, Berlin
Zentrifuge CR 422 Jouan	Cotech GmbH, Berlin
Centrifuge 5410	Eppendorf, Hamburg
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.1.4 Puffer, Lösungen

Tab. 5: **Puffer, Lösungen**

Name	Zusammensetzung	Herkunft
Isotonischer Phosphatpuffer (PBS)	10 mM Natriumphosphat pH 7,2 140 mM NaCl low endotoxin	Fa. Gibco BRL, Eggenstein

FACS – Puffer	PBS mit: 0,1 % Natriumazid 2,0 % hitzeinaktiviertes FKS	
Lyse – Lösung	10 % FACS Lysing Solution in Aqua dest.	

### 3.1.5 Antikörper

Tab. 6: **Antikörper**

Name	Ig Subklasse / Fluoreszenzfarbstoff	Herkunft / Firma
CD 14	IgG2a PC5 (Maus-anti-Mensch)	Immunotech, Beckman Coulter, Krefeld
CD 33	IgG1 PC5 (Maus-anti-Mensch)	Immunotech, Beckman Coulter, Krefeld
CD 45	IgG1 PerCP (Maus-anti-Mensch)	Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.1.6 Sonstige Reagenzien

Tab. 7: **Sonstige Reagenzien**

Name	Herkunft
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.7 S-Monovetten – Blutentnahme – System

Tab. 8: **S-Monovetten-Blutentnahme-System** der Firma Sarstedt, Nümbrecht

Bezeichnung	Inhalt
5,5 ml LH	Lithium-Heparin, 15 I.E. Heparin / ml Blut
9 ml AH	Ammonium-Heparin, 15 I.E. Heparin / ml Blut
10 ml 9NC	1,0 ml Natrium-Citrat-Lösung, 0,106

	molare Lösung, 1 Teil Natrium-Citratlösung + 9 Teile Blut
2,7 ml KE	Kalium-EDTA, 1,6 mg EDTA / ml Blut
4,5 ml Z	Granulat / Gerinnungsaktivator

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Prinzip des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays

Das Hauptziel meiner Promotion war es, einen EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay zu etablieren. Dafür haben wir zahlreiche, mögliche Parameter variiert (z. B. die Zahl der Bakterien, die Messzeitpunkte, das Kulturmedium etc.).

Die hier dargestellte Methodenbeschreibung schildert nur die Endvariante des Assays.

#### 3.2.1.1 Herstellung der *E. coli* - Stammlösung

Die transformierten *E. coli* (siehe Kapitel 3.1.1) wurden unter Zugabe von 0,1 mol / l IPTG (=Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) (Fa. Roth, Karlsruhe) und 0,1 g / ml Ampicillin (Fa. Boehringer, Mannheim) aus Selektionsgründen, für 4 Stunden bei 37°C und 220 rpm (Schüttelinkubator), in Luria-Bertani-Medium kultiviert. IPTG wird verwendet, um den lacZ-Promoter zu aktivieren. Der lacZ-Promoter induziert dann die EGFP-Expression. Parallel dazu wurde die gleiche Anzahl nicht-transformierter *E. coli*, die in den Versuchen als Kontrollbakterien bezüglich ihres Fluoreszenzverhaltens dienten, unter gleichen Bedingungen, aber ohne IPTG und Ampicillin, kultiviert. Sowohl transformierte wie nicht-transformierte *E. coli* Bakterien wurden anschließend durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenz getestet. Es wurden von beiden Bakteriensuspensionen Aliquots (2-ml-Reaktionsgefäße der Fa. Eppendorf, Hamburg) mit sterilem Glycerin (15%) versetzt und bei -70°C eingefroren.

---

### 3.2.1.2 *Rekultivierung der E. coli Bakterien*

Für jede Messung werden jeweils ein Aliquot mit EGFP-transformierten *E. coli* und ein Aliquot mit nicht-transformierten *E. coli* (Kontrollbakterien) aufgetaut und gründlich resuspendiert. Danach werden 200 µl den aufgetauten Aliquots entnommen und jeweils in ein eigenes Eppendorfgefäß, das bereits 1 ml Luria-Bertani-Medium enthält, überführt. Dem Gefäß, das die EGFP produzierenden *E. coli* enthält, werden aus Selektionsgründen noch 5 µl Ampicillin (0,1 g/ml) hinzugefügt. Nach erneutem resuspendieren werden dann beide Gefäße für 1 Stunde bei 37°C und 600 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Die so rekultivierten Bakterien werden für die Beimpfung verwendet.

### 3.2.1.3 *Vorbereitung der Proben*

Mittels Monovettensystem (5,5 ml S-Monovette LH) wurde peripheres venöses Blut gewonnen, das anschließend 1:5 in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Heparin-Kulturmedium verdünnt wurde (100 µl Vollblut auf 400 µl Heparin-Kulturmedium). Da der Assay einfach und schnell durchführbar sein soll, wurde er als Vollbluttest entwickelt. Darüber hinaus hat der Verzicht auf den Einsatz von Separationstechniken den Vorteil, dass die Entstehung von Artefakten, die auf die Separation zurückzuführen wäre, vermieden wird. Für jeden Messzeitpunkt werden vier 2-ml-Eppendorf-Gefäße auf diese Weise vorpipettiert.

Anschließend werden jeweils zwei Proben mit jeweils 6 µl (=  $3 \times 10^6$ ) Kontroll-*E. coli* und die zwei anderen mit jeweils 10 µl (=  $3 \times 10^6$ ) EGFP-*E. coli* „beimpft“. Sehr wichtig, ist dabei das sorgfältige Resuspendieren der Bakterien vor dem Pipettieren.

In den Versuchen, die in direktem Vergleich mit dem Orpegen®-Phagotest® liefen, wurden die Proben vor Hinzufügung der *E. coli* gemäss dem Orpegen-Protokoll zunächst 15 Minuten auf Eis gestellt.

---

#### 3.2.1.4 Inkubation

Die Proben werden danach sofort in den auf 37°C vorgeheizten Thermomixer comfort 2,0 ml gestellt und bei 600 rpm bis zum Erreichen des ersten Messzeitpunktes, der bei 15 Minuten lag, rotiert. Zu diesem Zeitpunkt werden die ersten beiden Proben jedes Probanden / Patienten, d. h. eine Probe mit EGFP-Bakterien und eine mit Kontroll-Bakterien, aus dem Thermomixer entnommen, für 10 Minuten auf Eis gestellt, um Phagozytose und Degradation abzustoppen, dann mit jeweils 1 ml +4°C kaltem PBS resuspendiert und bei +4°C mit 200 g über 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, während 100 µl resuspendiertes Pellet in 1,2 ml Röhrchen (Micronic-Systems, Lelystad, Niederlande) überführt werden. Die zwei restlichen Proben jedes Probanden / Patienten, werden bei 37°C und 0 rpm bis zum zweiten Messzeitpunkt, der bei 4 Stunden lag, weiter inkubiert.

#### 3.2.1.5 Markierung mit fluoreszenzmarkierten spezifischen monoklonalen Antikörpern

Die in 3.2.1.4 beschriebenen 100 µl resuspendierten Pellets werden zusammen mit jeweils 10 µl von den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 20 min bei +4°C inkubiert. Bei unseren Untersuchungen wurden folgende Antikörper verwendet:

- 1) CD45 PerCP (Becton Dickinson)
- 2) CD33 PC5 (Immunotech)
- 3) CD14 PC5 (Immunotech)

**CD33** ist ein monomeres, transmembranes Glykoprotein mit unklarer Funktion, auch bezeichnet als gp67 (37), daß im Knochenmark auf der Oberfläche von myeloischer Stammzellen (CFU-GEMM), Vorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten (CFU-GM) und frühen erythroiden Vorläuferzellen (CFU-E) exprimiert wird. Im peripheren Blut wird das Molekül auf zirkulierenden Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gefunden. Darüber hinaus exprimieren Langerhans-Zellen und Mastzellen CD33 (38, 39). Im Verlauf der Reifung von Monozyten zu Makrophagen nimmt die Expression von CD33 zu.

---

IL-10 führt in vitro zu einer verminderten CD33-Expression (40). Bei der Färbung von Blutimmunzellen mit anti-CD33 im peripheren Blut, werden die Zellen myeloiden Ursprungs: Monozyten / Makrophagen stark und Granulozyten schwach, gefärbt. Es werden weder reife Lymphozyten, noch lymphozytäre Vorläuferzellen markiert (41).

**CD14** ist ein einkettiges Oberflächenmembranglykoprotein (55 kDa) und dient als Rezeptor für LPS. Die Expression von CD14 ist auf Monozyten und Makrophagen stark, auf neutrophilen Granulozyten, Langerhans-Zellen, folliculären dendritischen Zellen und Histiozyten schwach (13).

**CD45** ist ein einkettiges integrales Membranprotein, das auf allen menschlichen Leukozyten (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) und deren Vorläuferzellen vorhanden ist. Es existieren mindestens 5 Isoformen, von 180 bis 220 kDa, denen allen eine extrazelluläre Sequenz gemein ist, so dass einige CD45-Antikörper mit diesem Teil reagieren und in der Lage sind alle CD45-Isoformen zu erkennen (42).

#### 3.2.1.6 Lyse und Fixation

Um die bei der zytofluorometrischen Messung störenden Erythrozyten zu entfernen, wird 1 ml Lyse-Lösung auf die Proben gegeben. Die Proben werden anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Lyse-Lösung führt, bei Erhalt der Leukozyten, unter leicht hypotonen Bedingungen zur Lyse der Erythrozyten. Danach wird die Probe bei +4°C mit 200 g über 5 min zentrifugiert. Abschließend wird die Probe mit FACS-Puffer gewaschen (200 g, 5 min, +4°C). Bis zur Messung werden die Proben bei +4°C gelagert.

#### 3.2.1.7 Messung der Fluoreszenz mittels Zytofluorometrie

Die zytofluorometrischen Messungen erfolgten mit dem FACSCalibur (Software: CellQuest, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg).

Die Zytofluorometrie bzw. Durchflußzytometrie ist ein optisches Messverfahren, das Streulicht – und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom

---

fokussierter Partikel analysiert. Es können Zellen jeder Herkunft analysiert werden, sofern sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen.

Bei der Messung werden Zellen, eine nach der anderen, durch einen fokussierten Lichtstrahl geleitet. Das optische Detektionssystem misst die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle. Als Lichtquelle kann z. B. ein luftgekühlter Argonlaser mit Emission bei 488 nm dienen. Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung verstanden. Fluorochrome absorbieren Lichtenergie für einen jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich. Den Frequenzbereich, der eine fluoreszierende Verbindung anregen kann, nennt man Anregungs- bzw. Exzitationsspektrum. Bei der Rückkehr zum Grundniveau geht ein Teil der Energie in Form von Wärme verloren, so dass das gebildete Licht (Emissionsspektrum) energieärmer und damit langwelliger als das Ausgangslicht ist.

Zellen kann man zum Fluoreszieren bringen, in dem man auf diesen fluorochromkonjugierte Antikörper anbringt, Zellmembranen direkt einfärbt oder Zellen mit intrazellulären Chromophor verwendet (z. B. EGFP). Bei Mehrfarbenfluoreszenzanalysen mit nur einem Laser werden Fluoreszenzfarbstoffe gewählt, die sich in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, aber deren Fluoreszenz mit derselben Wellenlänge anregbar ist.

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Größe, Form, Oberfläche und Granularität Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC), erlaubt Aussagen über die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC), das in einem 90 Grad Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird, ist das Resultat von Lichtbrechung und Reflexion durch die inneren Strukturen der Zellen (Granularität). Mittels beider Lichtstreuparameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen unterscheiden. Die Monozyten und Granulozyten stellen sich beispielsweise im Vergleich zu den Lymphozyten größer und stärker granuliert dar.

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in einer korrelierten Zweiparameterdarstellung (dot plot). Sie zeigt die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander an (siehe dazu Abb. 1 und Abb. 2). Bei



---

der Datenauswertung der zytofluorometrischen Messungen werden die für die Untersuchung interessanten Zellen eingegrenzt, d. h. es wird ein Fenster bzw. „gate“ gesetzt. Bei der weiteren Analyse finden solche Ereignisse Berücksichtigung, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches liegen.

Ein Nachteil dieser Darstellungsweise ist die schwierige visuelle Abschätzung der Quantität der Populationen in den einzelnen Punktwolken. Zur Auswertung stehen daher zusätzliche numerische Daten, wie Anzahl der Ereignisse in verschiedenen Auswertefenstern und deren prozentuale Aufteilung, Mittelwert, Median und Modus der Signalintensität zur Verfügung (43).

In unseren Untersuchungen konnten die Monozyten- und Granulozytenpopulationen auf Grund ihres Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtsignales von der Lymphozytenpopulation abgegrenzt werden. Um die Monozyten und Granulozyten noch genauer abgrenzen zu können, wurden diese mit immunfluoreszierenden monoklonalen Antikörpern gegen CD14 PC5 (FL3) und CD33 PC5 (FL3) gefärbt. Da Monozyten/Makrophagen stark CD14 und CD33 und Granulozyten beide nur schwach binden, war es so möglich, mittels Seitwärtsstreulicht und in unserem Falle der 3. Fluoreszenz diese beiden Populationen voneinander abzugrenzen. Anschließend wurden Fluoreszenzhistogramme für Monozyten (ca. 3000) und Granulozyten (ca. 45000) erstellt. Bei der Messung wurde ein Live-Gate im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht auf Monozyten und Granulozyten gelegt. Die Messung wurde beendet, wenn 55000 Events innerhalb dieses Gates aquiriert wurden.

### 3.2.1.8 Auswertung der zytofluorometrischen Meßergebnisse

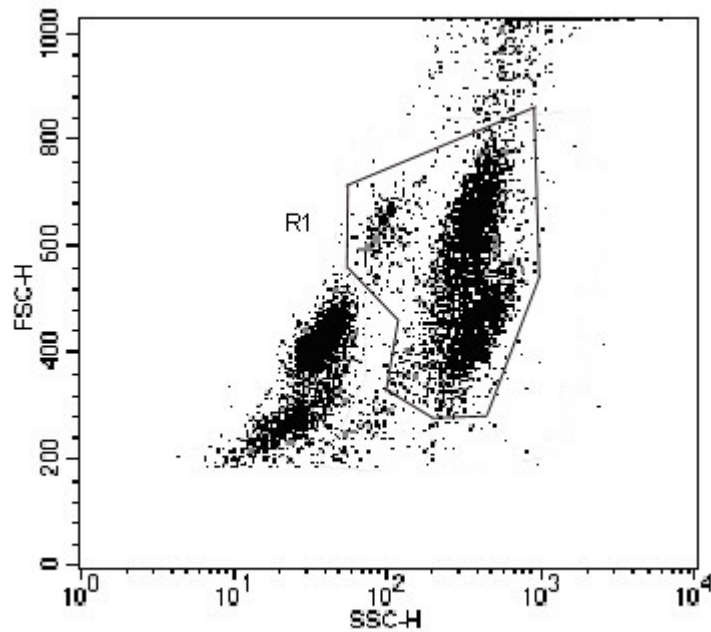


Abb. 1: In diesem **DotPlot (SSC-H versus FSC-H)** ist die Gesamtheit der Zellen im Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht erfasst. R1 bezeichnet das Gate, in dem die Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Leukozyten lokalisiert sind.

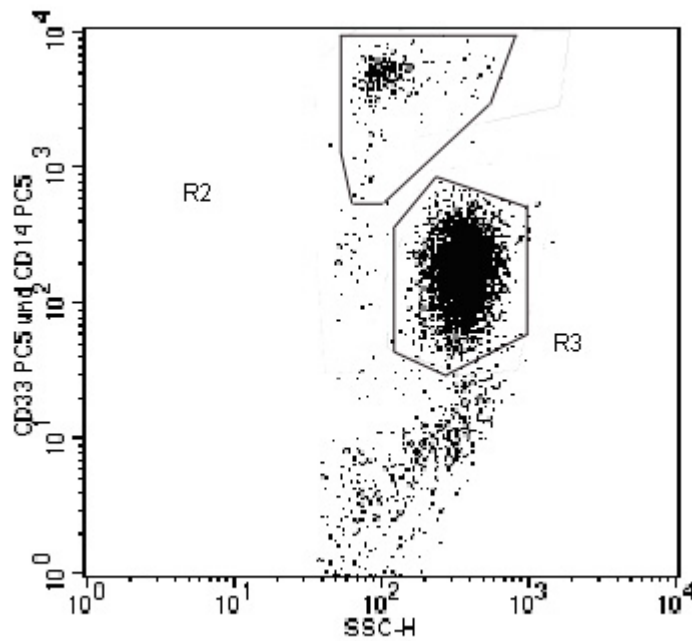


Abb. 2: **Dot Plot SSC-H versus CD33-PC5 und CD14-PC5.** Hier sind die Zellen aus dem Gate R1 nach ihren Eigenschaften im Seitwärtsstreulicht und der 3. Fluoreszenz abgebildet. Gate R2 bezeichnet die Monozyten, während Gate R3 die Population der Granulozyten umfasst.

In Abb. 1 ist die Gesamtheit der erfassten Zellen in einem Dot-Plot (Vorwärtsstreulicht versus Seitwärtsstreulicht) dargestellt. In solchem Dot-Plot wird „großzügig“ das Gate 1 auf Monozyten und Granulozyten gelegt. In Abb. 2 sind nur Zellen aus dem Gate 1 in einem weiterem Dot-Plot (Seitwärtsstreulicht versus die 3. Fluoreszenz) dargestellt. Darüber hinaus sind in der Abb. 2 Monozyten und Granulozyten durch die 3. Fluoreszenz in einzelne Zellpopulationen aufgeteilt, so dass nun Gate R2 die Monozyten und Gate R3 die neutrophilen Granulozyten umfasst. In den Abbildungen 1 und 2 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur 10 % der gemessenen Zellen dargestellt. Die so selektierten Phagozyten werden anschließend mittels Histogrammen bezüglich der Intensivität ihrer „Grün-Fluoreszenz“ (FL1) ausgewertet.

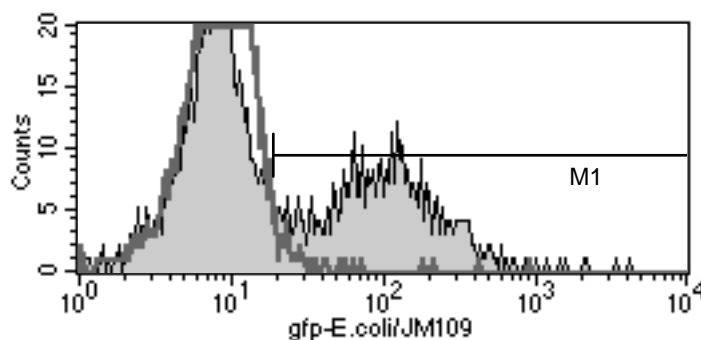


Abb. 3: **Histogramm.** Entlang der Abszisse ist die Intensivität der Fluoreszenz und entlang der Ordinate die Anzahl der durchflußzytometrisch gemessenen phagozytierenden Zellen abgetragen. Je nachdem, ob auf Gate R2 oder R3 zurückgegriffen wird, können die Messwerte für Monozyten oder Granulozyten abgerufen werden.

In der Abb. 3 sind in einem Histogramm zwei Kurven zu erkennen. Die ausgefüllte Kurve spiegelt die Monozyten aus dem Vollblut wieder, das mit EGFP-markierten E. coli inkubiert wurde. Die nicht-ausgefüllte Kurve spiegelt

die Monozyten aus der Kontroll-Vollblutprobe wieder. Diese wurde mit nicht-transformierten E. coli inkubiert und ist somit EGFP-negativ, verfügt jedoch über eine durchflußzytometrisch schwache Eigenfluoreszenz.

Bei der Auswertung wurde ein Marker M1 gesetzt, der maximal 1,5 % Kontroll-Zellen (die nicht-ausgefüllte Kurve) enthält und somit eine prozentuale Betrachtung der EGFP-positiven Zellen (die ausgefüllte Kurve) erlaubt. So konnten wir uns bei der Validierung des Phagozytose-Degradation-Assay einen Überblick über die Anzahl der sich an Phagozytose und Degradation beteiligenden phagozytierenden Zellen verschaffen.

Ein kompletter EGFP-Phagozytose-Degradations-Test für eine Person besteht, wie oben erwähnt, aus zwei Messzeitpunkten und somit insgesamt 4 Messproben: 2 EGFP-Proben und 2 Kontroll-Proben. Diese vier Messproben werden jeweils für Monozyten und Granulozyten ausgewertet. Für die rechnerische Auswertung der EGFP-Fluoreszenz haben wir nach zahlreichen Versuchen entschieden, die MEAN-Werte der phagozytierenden Zellen aus den Histogrammen zu verwenden. Vom gemessenen MEAN der z. B. Monozyten der EGFP-Probe wird jeweils der gemessene MEAN der Monozyten der nicht-transformierten E. coli Probe abgezogen. Diesen Wert bezeichnen wir als den spezifischen MEAN. So ergeben sich aus den oben genannten Proben und deren Messdaten folgende Werte:

a) für die Phagozytose (Proben vom Zeitpunkt 1):

$\text{MEAN der GFP-Probe} - \text{MEAN der Kontroll-Probe} = \text{spezifischer MEAN}$
---

Der spezifische MEAN entspricht der Phagozytose-Leistung.

b) für die Degradation:

$\frac{\text{Spezifischer MEAN (Proben vom Zeitpunkt 2)}}{\text{Spezifischer MEAN (Proben vom Zeitpunkt 1)}} \times 100 \% = \text{Degradationsleistung (in Prozent)}$
--

---

Nach dem gleichen Rechenprinzip wurde bei dem adaptierten Orpegen<sup>®</sup>-Phagotest<sup>®</sup> vorgegangen. Dort treten anstelle der EGFP-Proben die mit FITC-markierten E. coli inkubierten Proben und anstelle der nicht-transformierten JM109 E. coli treten die auf Eis gestellten FITC-markierten E. coli Proben.

### 3.2.1.9 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die computergestützte Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen erfolgte mit der CellQuest Software (Becton Dickinson). Als Datenbank wurde Microsoft Excel verwendet. Statistische Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel. Grafische Darstellungen wurden mit Hilfe von Excel und Powerpoint erstellt.

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten in Gruppen zusammengefasst, aus denen Mittelwerte berechnet wurden. Zusätzlich zu den Mittelwerten wurden Standard Error of the Mean (SEM) für die *in vitro* - Versuche und die Standardabweichungen (SD) für die Patienten-Daten errechnet und ggf. dargestellt.

Für die Signifikanzprüfung wurde der U-Test nach MANN und WHITNEY für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben verwendet.

### 3.2.2 Vermehrungsfähigkeit von E. coli in Abhängigkeit vom Medium

Die Vermehrungsfähigkeit wurde über die optische Dichte per Spectrophotometer bei 600 nm bestimmt. Je größer die Absorption in einer Küvette wird, desto größer die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien im enthaltenen Medium. Pro Medium wurden 3 Küvetten angesetzt:

- ein Leerwert, d.h. ohne E. coli als Referenz
- ein Mediumansatz mit nicht-transformierten E. coli
- ein Mediumansatz mit EGFP-transformierten E. coli.

Jede Küvette enthielt 1 ml Medium, ohne bzw. mit 50 µl Bakteriensuspension. Die Küvetten wurden mit Parafilm (Laboratory Film, Chicago, USA) gedeckelt und bei 37° und 220 rpm (Gallencamp-Inkubator) bis zum jeweiligen

Messzeitpunkt inkubiert. Vor jeder Messung wurden die Küvetten sorgfältig resuspendiert.

Medium-Versuch Nr. 1 (n = 6)

<b>Bakterien (nicht-transformierte, transformierte)</b>	<b>Medium</b>
E. coli	Heparin-Kulturmedium ohne Antibiotika
E. coli	LB-Medium

Medien-Versuch Nr. 2 (n = 3)

<b>Bakterien (nicht-transformierte, transformierte)</b>	<b>Medium</b>
E. coli	Heparin-Kulturmedium ohne Antibiotika
E. coli	Heparin-Kulturmedium mit 12,5 IU/ml Penicillin / 125 µg/ml Streptomycin
E. coli	Heparin-Kulturmedium mit 0,5 µg / ml Tetracyclin

Medium-Versuch Nr. 3 (n = 3)

<b>Bakterien (nicht-transformierte, transformierte)</b>	<b>Medium</b>
E. coli	Serum
E. coli	hitzeinaktiviertes Serum

Die Seruminaktivierung wurde im Wasserbad bei 56°C für 30 min durchgeführt.

## Medium-Versuch Nr. 4 (n = 6)

<b>Bakterien (nicht-transformierte, transformierte)</b>	<b>Medium</b>
E. coli	Heparin-Kulturmedium ohne Antibiotika
E. coli	Heparin-Kulturmedium mit heparinisertem Plasma (1:1) ohne Penicillin/Streptomycin
E. coli	Heparin-Kulturmedium mit heparinisertem Plasma (1:1) mit 12,5 IU/ml Penicillin / 125 µg/ml Streptomycin

3.2.3 Adaptierung des Orpegen<sup>®</sup>-Pharma – Phagotests<sup>®</sup>

Beim Orpegen<sup>®</sup>-Pharma-Phagotest<sup>®</sup> wird das heparinisierte Vollblut mit opsonierten, abgetöteten, FITC-markierten E. coli für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Kontrollprobe wird auf Eis inkubiert. Die Phagozytose in der ersten Probe wird gestoppt, indem diese Proben auf Eis gestellt werden. Dann werden die Signale der nicht-phagozytierten, FITC-markierten Bakterien mit Quenching Solution (Orpegen Pharma, Heidelberg) gequencht. Es folgen zwei Waschschriffe, ein Lyseschriff und eine DNA-Färbung mit DNA-Staining Solution und die anschließende zytofluorometriesche Messung (36). Um am Ende vergleichbare Ergebnisse aus dem neu entwickelten EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay und dem Orpegen<sup>®</sup>-Phagotest<sup>®</sup> zu erhalten, musste der Orpegen<sup>®</sup>-Phagotest<sup>®</sup> etwas modifiziert werden: Bakterienmenge (von 2,0 x 10<sup>7</sup> auf 3,0 x 10<sup>6</sup>) und Volumina (von 20 µl auf 9 µl) wurden angeglichen, die Inkubationszeit wurde von 10 min auf 15 min verlängert, ein zweiter Messzeitpunkt wurde eingeführt (t<sub>2</sub>= 4 Stunden) und es wurde nicht die DNA-Staining Solution, sondern die monoklonalen Antikörper gegen CD14 PC5 (FL3) und CD33 PC5 (FL3) verwendet.

---

### 3.3 Probanden und Patienten

#### 3.3.1 Probanden

Für alle Versuche, die der Optimierung der Versuchsbedingungen und Qualitätssicherung dienten, wurde nur das Blut von gesunden Normalprobanden eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war bei keinem Spender eine Infektion- oder sonstige Immunkrankheit bekannt. Im Weiteren wurden für die vergleichenden Untersuchungen, zwischen gesunden Normalprobanden und Patienten, zwei Normalprobandengruppen verwendet:

- eine Kontrollgruppe zur NTX-Patienten-Gruppe, bestehend aus 4 Männern und 3 Frauen (Alter i. M.:  $44,0 \pm 13,9$ ) und
- eine Kontrollgruppe zu den Sepsis-Patienten, bestehend aus 5 Männern und 2 Frauen (Alter i. M.:  $57,9 \pm 3,4$ ).

#### 3.3.2 Patienten

Es wurde das Blut von 7 NTX-Patienten, 4 männlichen und 3 weiblichen, im Phagozytose-Assay getestet. Diese Patienten waren im Mittel  $45,9 \pm 9,9$  Jahre. Als generelle Ausschlusskriterien galten:

- aktive CMV-Infektion,
- akute Transplantat-Rejektion,
- jünger als 20 Jahre,
- Nierentransplantation vor weniger als 1 Jahr.

Alle NTX-Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme in der NTX-Ambulanz im Virchow-Klinikum unter Betreuung.

In der Sepsis-Patienten-Gruppe waren ebenfalls 7 Patienten, 5 männliche und 2 weibliche, die i.M.  $56,9 \pm 12,2$  Jahre waren. Als generelle Einschlusskriterien galten:

- $\text{HLA-DR} \leq 15000$  (monoklonale Antikörper / Zelle), d.h. Immunparalyse oder Grenzbereich zur Immunparalyse,
- Untersuchungstag 2.-5. postoperative Tag,



- 
- andere systemische Entzündungszeichen, wie Leukozytose, Linksverschiebung im Differential-Blutbild, hohes Procalcitonin (PCT).

Die in die Untersuchungen einbezogenen Patienten wurden zum Zeitpunkt der Messung auf der Intensivstation ITS 5 (Klinik für Abdominal- und Allgemeinchirurgie) der Charité versorgt. Für den Assay wurde ausschließlich Restblut nach Routine-Labordiagnostik verwendet. Zusätzliche Blutentnahmen zu Forschungszwecken waren nicht erforderlich. Für einen Ansatz werden pro Patient lediglich 400 µl Vollblut benötigt.

---

## 4 Ergebnisse

Zur Beginn meiner Promotionsarbeit haben wir überlegt, wie ein Phagozytose-Degradation-Assay, der unter physiologischen Bedingungen funktioniert, aussehen soll. Dabei kam uns als Erstes die Idee, dass wir dazu EGFP nutzen können, um damit unsere Bakterien durchflußzytometrisch messbar zu markieren. Die zweite Idee war, dass wir mehrere Messzeitpunkte haben müssen, um nicht nur eine Aussage über die Phagozytosefähigkeit (Aufnahmefähigkeit), sondern auch über die Degradationsfähigkeit der Phagozyten (Abbau der Bakterien) gewinnen zu können. Bei dem ersten, früheren Zeitpunkt wird die Phagozytosefähigkeit der Phagozyten bestimmt. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt eine zweite Messung. Der Vergleich des ersten und zweiten Wertes dient der Charakterisierung der Degradationsfähigkeit dieser Zellen.

Die Umsetzung dieses Vorhabens begann mit der Schaffung der technischen Voraussetzungen, um mit gentechnisch-veränderten Organismen (hier die EGFP-transformierten E. coli Bakterien) arbeiten zu dürfen. Unsere EGFP-transformierten Bakterien stellen keine Gefahr für Mensch und Umwelt dar. Trotzdem ist eine Verschleppung dieser Organismen aus dem Labor in jedem Fall zu verhindern, so dass spezielle Kennzeichnungen, Abfallbehälter und Verhaltensweisen erforderlich sind.

### 4.1 Assay-Etablierung

Die Aussage zur Degradationsfähigkeit der phagozytierenden Zellen ist aber nur dann korrekt, wenn nach der ersten Messung keine weitere oder nur eine minimale Phagozytose statt findet (keine Überlagerung des Abbaus). Die Ausschaltung/Hemmung der Phagozytose könnte man z. B. durch chemische Inhibitoren erreichen, wobei wir uns in dieser Arbeit von unserem Ziel, einen Assay unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu etablieren, entfernt hätten. Uns scheint deshalb die Reduzierung/Minimierung der Zahl der Bakterien ein sinnvollerer Weg. Um das zu erreichen haben wir versucht, entsprechende Medium Bedingungen zu etablieren.

---

#### 4.1.1 Keimzahlbestimmung

Eine exakte Keimzahlbestimmung war eine der Voraussetzung zur Identifizierung der optimalen Zahl der Bakterien für den Start des Assays, zur Optimierung der Kulturbedingungen und zur exakten Durchführung des Assays. Die Keimzahlbestimmung wurde mittels Photometer bei 550 nm die Bakterienkonzentration der Aliquots bestimmt. Zusätzlich wurden Ausplattierungen der Bakteriensuspensionen auf Luria-Bertani-Agar-Platten vorgenommen und nach 13 Stunden bei 37°C per Hand ausgezählt. Die Platten, auf denen die EGFP-transformierten E. coli ausplattiert wurden, enthielten 0,1 g / ml LB-Agar Ampicillin. Die Keimzahl in den tiefgefrorenen Aliquots betrug für nicht-transformierte  $1,5 \times 10^8$  / 1000  $\mu$ l und für die EGFP-transformierten E. coli  $1,2 \times 10^8$  / 1000  $\mu$ l.

Anschließend wurde die Bakterienzahl bestimmt, die sich in den Aliquots befindet, wenn man die tiefgefrorenen Proben auftaut, 1 : 5 mit LB-Medium verdünnt und für 1 Stunde bei 37°C und 600 rpm (Thermomixer comfort 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg) rekultiviert. Die Bakterienzahl betrug bei den nicht-transformierten  $3,75 \times 10^8$  / 1000  $\mu$ l und bei den transformierten  $3,0 \times 10^8$  / 1000  $\mu$ l. Solche frisch rekultivierten Bakterien wurden für den EGFP-Phagozytostest eingesetzt.

#### 4.1.2 Optimierung der Mediums-Bedingungen: Vermehrungsfähigkeit von E. coli in Abhängigkeit vom Medium

Als erstes wollten wir klären, in welchem für unseren Assay in Frage kommenden Medium sich die Bakterien nicht vermehren. Eine fehlende Vermehrung der Bakterien ist notwendig zur Minimierung der Phagozytose nach der ersten Zeitmessung und damit für die sichere Beurteilung der Degradationsfähigkeit der Phagozyten. Wir kultivierten E. coli - Proben über 6 Stunden in verschiedenen Medien und bestimmten, zu den im Diagramm erkennbaren Zeitpunkten, die Bakterienkonzentrationen durch Messung der optischen Dichte. Sowohl in der normalen Bakteriennährlösung LB als auch im Heparin-Medium vermehrten sich die Bakterien sehr gut.

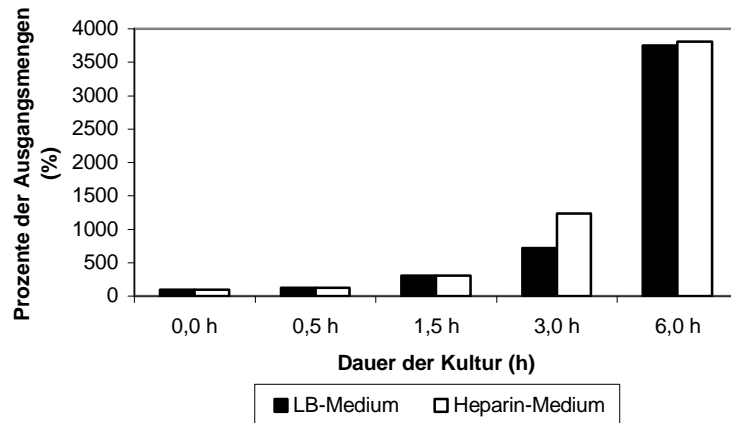


Abb. 4: **Vermehrungsfähigkeit der E. coli in Abhängigkeit vom Kulturmedium.** Diese Abbildung zeigt die Vermehrungsfähigkeit von E. coli in LB-Medium und in Heparin-Medium. Der Versuch erstreckte sich über 6 Stunden. Es sind die Mittelwerte aus 6 von einander unabhängigen Versuchen dargestellt.

Ein weiterer Versuch sollte uns zeigen, ob das Plasma bzw. Serum der Spender ebenfalls einen nachweisbaren Einfluss auf Vermehrungs- und Überlebensfähigkeit der Bakterien ausübt. Also kultivierten wir Bakterien nur in Serum (kein Heparin, kein Medium) und parallel dazu nur in hitze-inaktiviertem Serum. Eine antibakterielle Wirkung des aktiven Serums wurde sichtbar.

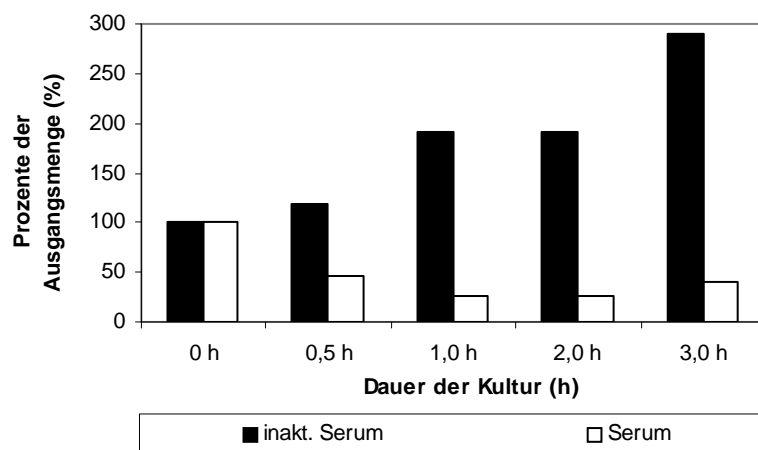


Abb. 5: **Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der E. coli in inaktiviertem Serum und in nicht-inaktiviertem Serum.** Es sind die Mittelwerte aus 3 von einander unabhängigen Versuchen dargestellt.

Es konnte eindrucksvoll die Wirkung der Komplementkaskade, die in der Bildung von Membranangriffskomplexen resultiert, beobachtet werden (Abb. 5). Danach prüften wir, ob eine Vermehrung der Bakterien in dem Antibiotikumhaltigen Heparin-Medium, ohne Gegenwart von Plasma oder zellulären Bestandteilen, ausgeschlossen werden kann. Wir überprüften es, weil eine Vermehrung der Bakterien ausgeschlossen sein sollte, da wir auch das Blut immuninkompetenter Spender untersuchen wollten. Deshalb wurde im nächsten Versuch untersucht, welchen Einfluss der Zusatz von Antibiotika (Penicillin/Streptomycin oder Tetracyclin) auf die Vermehrung der E. coli - Bakterien ausübt.

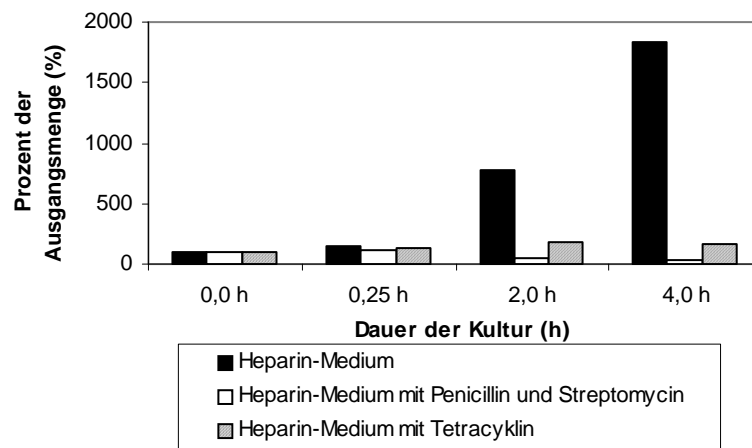


Abb. 6: **Einfluß von Antibiotika auf die Vermehrungsfähigkeit von E. coli.** Vergleich des Heparin-Kulturmediums ohne Antibiotikum-Zusatz, mit Zusatz von Penicillin / Streptomycin, mit Zusatz von Tetracyclin. Den Ansätzen wurden zum Zeitpunkt 0 h jeweils die gleiche Menge E. coli hinzugefügt. Es sind die Mittelwerte aus 3 von einander unabhängigen Versuchen dargestellt.

Wie man in der Abbildung sieht, hemmen die Antibiotika-Zusätze die E. coli - Vermehrung.

Anschliessend prüften wir die Wirkung von Heparin-Plasma mit dem Antibiotika-Zusatz Penicillin / Streptomycin. Auch unter diesen Bedingungen war während der 6 Stunden keine Vermehrung der E. coli nachweisbar.

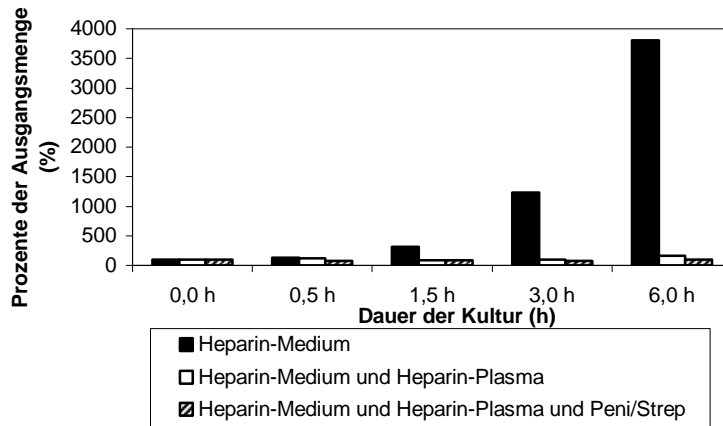


Abb. 7: **Vermehrungsfähigkeit von E. coli in verschiedenen Medien.** Es sind die Mittelwerte aus von einander unabhängigen 6 Versuchen dargestellt.

Auf Grund der Ergebnisse all dieser Versuche haben wir uns für Verwendung von 20% Vollblut, Heparin-Medium mit dem Antibiotika-Zusatz Penicillin / Streptomycin entschieden.

#### 4.1.3 Auswahl der Messzeitpunkte

Der nächste Schritt bei der Etablierung des Assays sollte die Festlegung der Messzeitpunkte sein. Dazu führten wir eine kinetische Studie durch, in welcher wir zu verschiedenen Zeitpunkten die Bakterienmenge in den Phagozyten bestimmten. Insgesamt wurde nach 6 verschiedenen Inkubationszeiten gemessen: nach 15 Minuten, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, und 6 h.

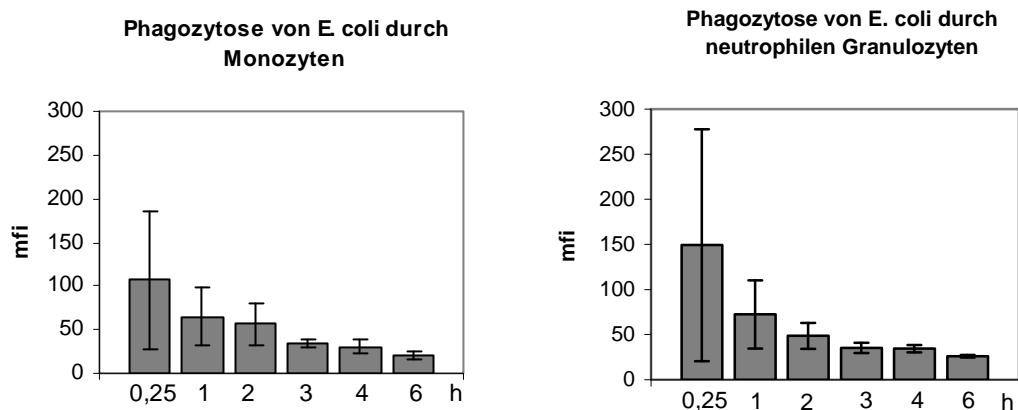


Abb. 8: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt.** Es wurde zu 6 verschiedenen Zeitpunkten gemessen, wie viele E. coli in den Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten nachweisbar sind. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Bei dem ersten Zeitpunkt (15 Minuten) ist die Menge der E. coli in Phagozyten am höchsten. Dieser Zeitpunkt wurde als Messpunkt für die Phagozytosefähigkeit der Zellen ausgewählt. In Abb. 9 ist die zeitliche Abnahme dieses Wertes (Abbau) dargestellt:

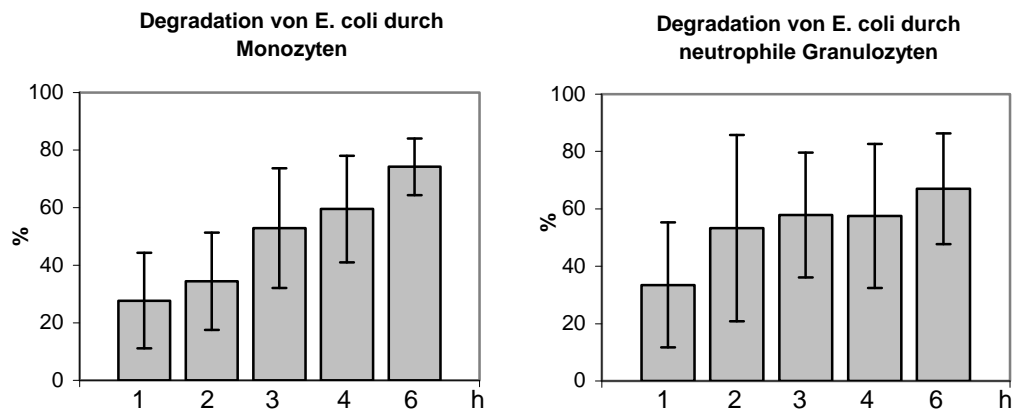


Abb. 9: **Degradation der phagozytierten E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt.** Für jeden Zeitpunkt ist der prozentuale Abbau bezogen auf den 15 Minuten-Phagozytose-Wert gerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Bei Monozyten steigt der Abbau kontinuierlich bis 6 h, bei Granulozyten ist er nach 2-3 h unverändert. Basierend auf diesen Daten und dem Wunsch, dass der Assay an einem Tag durchführbar sein soll, wurde der 4 h Wert als zweiter Zeitpunkt ausgewählt.

#### 4.1.4 Einfluss der unterschiedlichen Antikoagulanzen auf die Phagozytose und Degradation

Der vorgeschlagene Assay verwendet venöses Blut, so dass es notwendig ist, dass eine Gerinnung verhindert wird.

Die standardmäßig angebotenen Blutabnahmesysteme bieten verschiedene Möglichkeiten der Antikoagulation entnommener Vollblutproben. Sie greifen an unterschiedlichen Stellen in die Gerinnungskaskade ein und verhindern so die Koagulation.

Es wurde untersucht, welche messbaren Auswirkungen die verschiedenen Antikoagulanzen auf Phagozytose und Degradation haben. Dazu wurden jeweils einer Versuchsperson drei Röhrchen Blut abgenommen, wobei jedes ein anderes Antikoagulanz enthielt: 1) Citrat, 2) EDTA, 3) Lithium-Heparin.

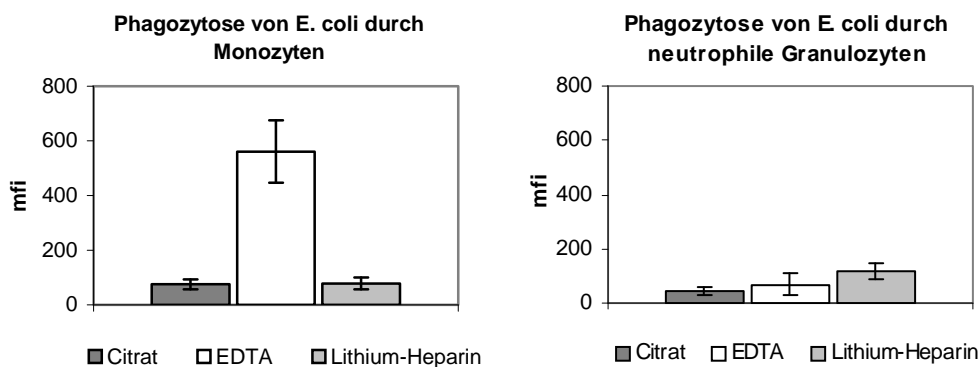
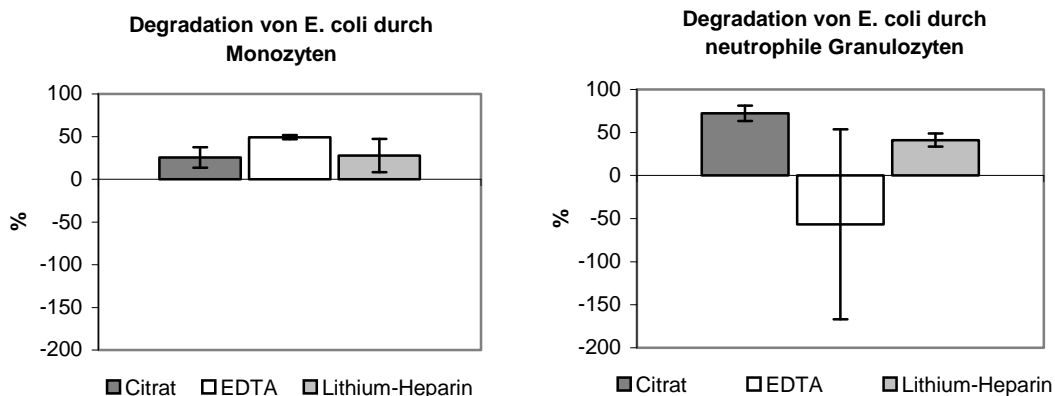


Abb. 10: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulant.** An der Y-Achse ist die mittlere Immunfluoreszenz der Proben aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.





---

Abb. 11: **Degradation von phagozytierten E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulanz.** Es wird gezeigt, wie viel Prozent der in Abb. 10 aufgenommenen E. coli - Menge innerhalb von 4 Stunden Inkubation von den Monozyten und neutrophilen Granulozyten abgebaut wurden. Die negativen Prozent-Sätze für die EDTA-Blutproben deuten daraufhin, dass hier im Verlauf von 4 Stunden die Fluoreszenz in den Proben noch weiter angestiegen ist. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In der Literatur sind Einflüsse von Citrat und EDTA auf die Phagozytose und Degradation, wie z. B. durch die Bindung von Calcium oder die Behinderung der Komplementopsonierung, beschrieben worden. Auch für Heparin werden in der Literatur Interaktionen mit den Phagozyten, die die Phagozytose- und Degradationsleistung beeinflussen könnten, postuliert worden. Dennoch wird bislang Heparin als Standardantikoagulanz für Phagozytoseversuche empfohlen. Unsere Versuche (Abb. 10 und Abb. 11) zeigen, dass EDTA sich für unsere Fragestellung auf Grund der fehlenden Degradationleistung der Granulozyten nicht eignet. Wir beobachteten nur mäßige Unterschiede zwischen mit Citrat oder mit Lithium-Heparin anti-koagulierten Proben, dennoch auf Grund der Empfehlung in der Literatur, haben wir uns entschieden, Heparin als Antikoagulanz zu verwenden.

Eine weitere Versuchsreihe sah den Vergleich von Lithium (Li)-Heparin mit Ammonium (NH<sub>4</sub>)-Heparin vor. Es sollte geklärt werden, ob theoretisch beide Heparin-Formen gleichermaßen verwendet werden könnten. Wie wir in Abb. 12 und Abb. 13 demonstrieren, eignet sich Lithium-Heparin besser (geringeres SEM), deshalb wurde in allen weiteren Versuchen auf Li-Heparin zurückgegriffen.

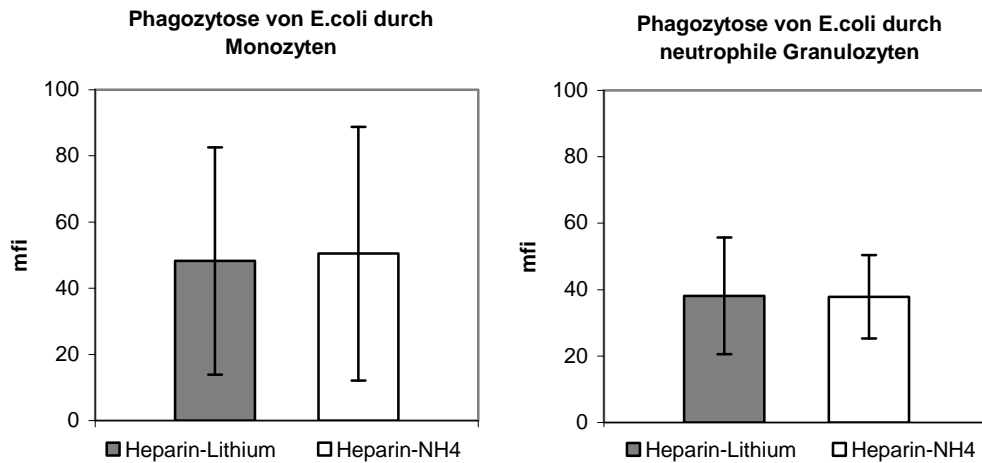


Abb. 12: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Heparin-Antikoagulanz.** Auf der Y-Achse ist die mittlere Fluoreszenz der Proben abgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

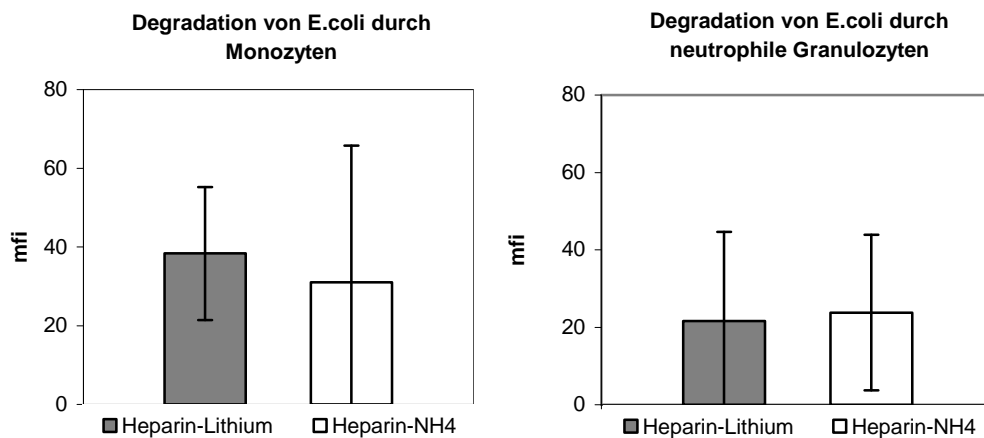


Abb. 13: **Degradation von phagozytierten E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Heparin-Antikoagulanz.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

#### 4.1.5 Abhängigkeit der Phagozytose und Degradation von der Bakterienkonzentration

In dem weiteren Abschnitt meiner Promotionsarbeit stellten wir uns die Frage, wie sich die Phagozytoseleistung, der Bakterien-Uptake der Phagozyten und ihre Degradationsfähigkeit verändert, wenn man zu einer bestimmten Anzahl von phagozytierenden Zellen jeweils das gleiche Volumen, aber unterschiedliche Anzahl der Bakterien hinzufügt.

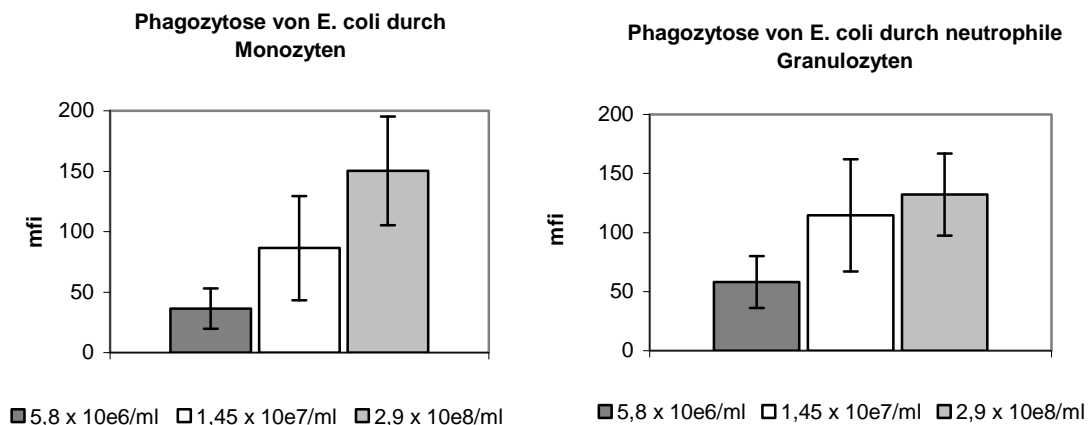
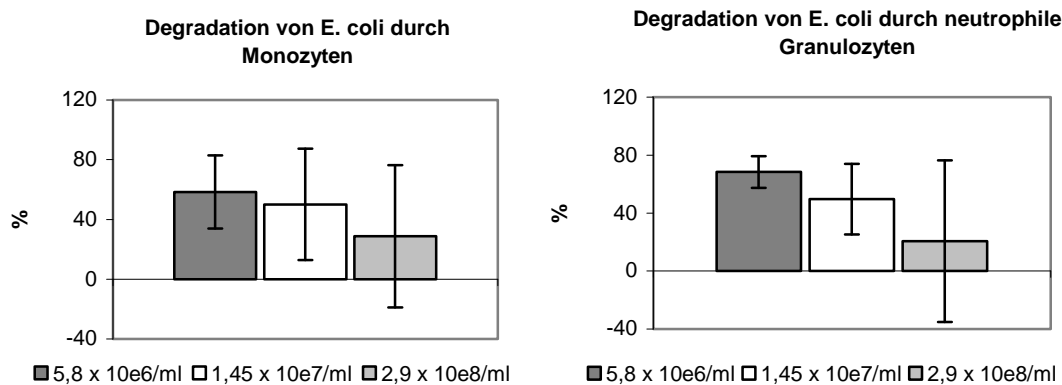


Abb. 14: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Bakterien-Anzahl.** In diesem Versuch wurde zu drei identischen Vollblutproben jeweils ein anders konzentriertes, aber gleichgroßes Volumen, Bakteriensuspension hinzugefügt. Die Gesamtkonzentration an E. coli, die anschließend in den Proben enthalten war, entsprach, auf den ml umgerechnet, a) 5,8 x 10<sup>6</sup>, b) 1,45 x 10<sup>7</sup>, c) 2,9 x 10<sup>8</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.



---

Abb. 15: **Degradation von phagozytierten E.coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Bakterien-Anzahl.** Es wurde zu drei identischen Vollblutproben jeweils ein anders konzentriertes, aber gleichgroßes Volumen Bakteriensuspension hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Die Degradationsleistung war bei der geringsten Anzahl der Bakterien am höchsten. Der SEM in diesem Test war für die geringste der drei getesteten Bakterienkonzentrationen am niedrigsten. Aus diesem Grunde wurde für die Etablierung des Assays eine Endkonzentration von  $5,8 \times 10^6$  / ml verwendet.

#### 4.1.6 Abhängigkeit der Phagozytose von der Phagozytenkonzentration

Im Vollblut gesunder Menschen befinden sich in etwa vergleichbare Mengen phagozytischer Zellen: z. B. 170 – 350 Monozyten /  $\mu$ l Blut (44).

Doch im Blut kranker oder immunsupprimierter Menschen können die tatsächlichen Zellzahlen stark von den Referenzwerten abweichen. Dies betrifft auch die neutrophilen Granulozyten. Bei Patienten mit z. B. einer Infektion kann die Zellzahl auf ein Vielfaches des Normwertes ansteigen. Bei solchen Patientengruppen sollte jedoch unser Assay in Zukunft Anwendung finden. Um die Frage zu beantworten, ob vor der Durchführung des Phagozytose-Degradation-Tests zwangsläufig erst eine Zellzählung durchgeführt werden muss, weil die unterschiedlichen Mengen an phagozytischen Zellen die Testergebnisse beeinflussen könnten, wurde folgender Versuch durchgeführt.

Es wurde das Blut gesunder Probanden verwendet, das mit Plasma so verdünnt wurde, dass drei Proben gleichen Volumens, aber mit unterschiedlicher Zellkonzentration entstanden. Zu allen drei Proben wurde die gleiche Konzentration und Volumen der Bakteriensuspension hinzugefügt.

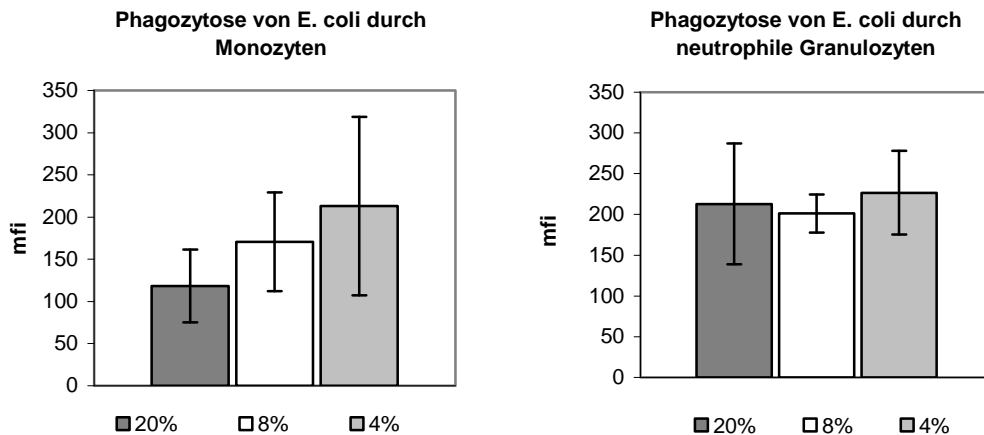


Abb. 16: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Phagozytenkonzentration.** Verwendete Vollblutverdünnungen a) 20 %, d.h. Standardansatz, b) 8 %, c) 4 %. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

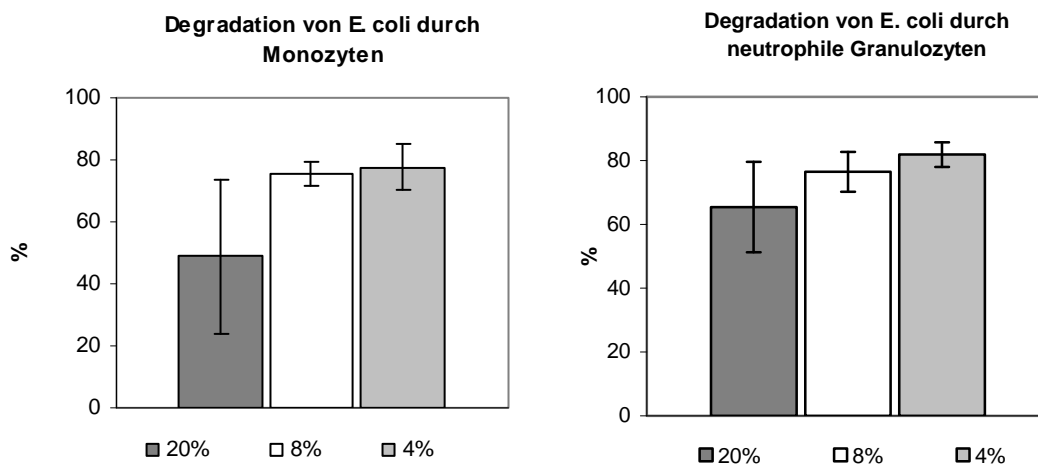


Abb. 17: **Degradation von phagozytierten E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Phagozytenkonzentration.** Verwendete Vollblutverdünnungen a) 20 %, d.h. Standardansatz, b) 8 %, c) 4 %. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Es wäre zu vermuten gewesen, dass die höchste gemessene Phagozytoseleistung in den Proben, mit den höchsten

---

Phagozytenkonzentrationen nachzuweisen sein wird. Die Versuchsergebnisse belegen jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen Phagozytoseleistung und Phagozytenkonzentration. Die Degradationsleistung zeigt keine wesentlichen Unterschiede im Verhältnis zur Phagozytenkonzentration. Die Proben mit niedriger Phagozytenkonzentration, die relativ betrachtet eine Leukopenie simulieren, sind gegenüber den anderen Proben, was ihre Phagozytose- und Degradationsfähigkeit angeht, nicht benachteiligt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass keine Zellzählung vor Testdurchführung erforderlich ist.

Nachdem nun die wichtigsten Versuchsbedingungen, wie z. B. Mediums-Zusammensetzung, Messzeitpunkte, Antikoagulanzen, Bakterien- und Phagozytenkonzentrationen, variiert wurden und die für eine optimale Assay-Durchführung günstigsten Bedingungen ausgesucht wurden, haben wir weitere mögliche externe Einflussgrößen auf die Testergebnisse bzw. deren Reproduzierbarkeit untersucht.

## **4.2 Validierung des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays**

### **4.2.1 Einfluss der Dauer der Lagerung auf die Ergebnisse des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays**

Blutproben, die zu Untersuchungszwecken entnommen werden, können in der täglichen Praxis nur selten sofort bzw. kurze Zeit (Minuten) nach Entnahme bearbeitet werden. Oft sind es Transportzeiten oder Wartezeiten im Labor, die diese Verzögerungen bedingen. Daher untersuchten wir die Frage, ob die Zeit zwischen Blutentnahme und Beginn der Untersuchung des Blutes einen Einfluss auf die Testergebnisse hat.

Hierzu wurde dem gleichen Probanden an einem Tag zu zwei Zeitpunkten Blut entnommen. Einmal 4 Stunden vor Assaybeginn und ein zweites Mal direkt vor Assaybeginn, so dass für den Phagozytose-Degradation-Assay 4 Stunden altes Blut und ganz frisch entnommenes Blut zur Verfügung stand.

Es wäre auch möglich gewesen, nur einmal Blut zu entnehmen, sofort mit der Bearbeitung der ersten Proben zu beginnen und 4 Stunden später erneut

Proben aus dem bereits vor 4 Stunden alten Blut anzufertigen. Dazu hätten wir zweimal statt nur einmal Bakterien ansetzen müssen und somit eine Fehlerquelle durch unterschiedliche Bakteriensuspensionen nicht ausschließen können.

Da wir mit lebenden, teilungsfähigen Bakterien arbeiten, ist es notwendig mit Präzision und möglichst konstantem Arbeitstempo die Bakteriensuspension zu verarbeiten. Der Fehler ist bei der einzeitigen Methodik geringer und deshalb haben wir diese Variante gewählt.

Frage des Versuchs war, ob eine Lagerung des Blutes Auswirkungen auf die Phagozytose- und Degradationsfähigkeit der Zellen hat.

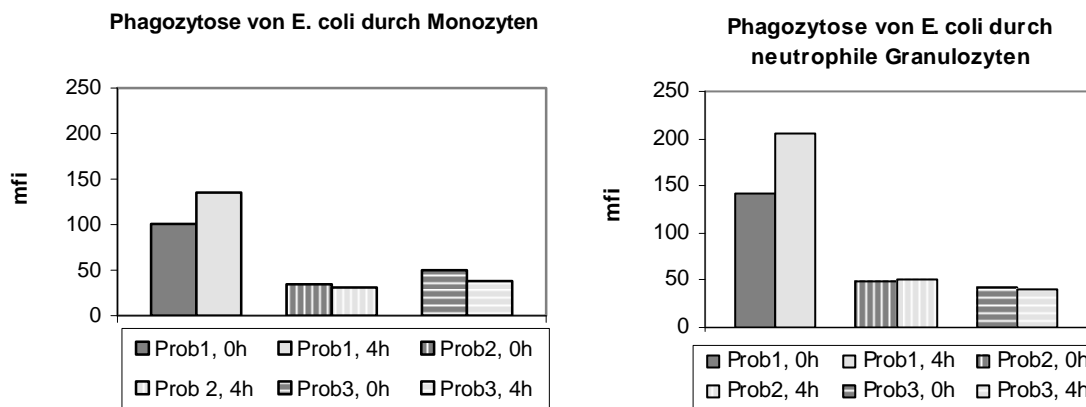


Abb. 18: **Phagozytose von E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung der Blutproben.** Jedes der drei Säulenpaare entspricht den Daten eines Probanden (Proband 1, 2, 3). Die erste und jeweils dunklere Säule eines Säulenpaares ist Ergebnis des frisch entnommenen und sofort verarbeiteten Blutes (0 Stunden gelagert vor Verwendung). Die zweite, hellere Säule repräsentiert das 4 Stunden vor Verarbeitung gelagerte Blut.

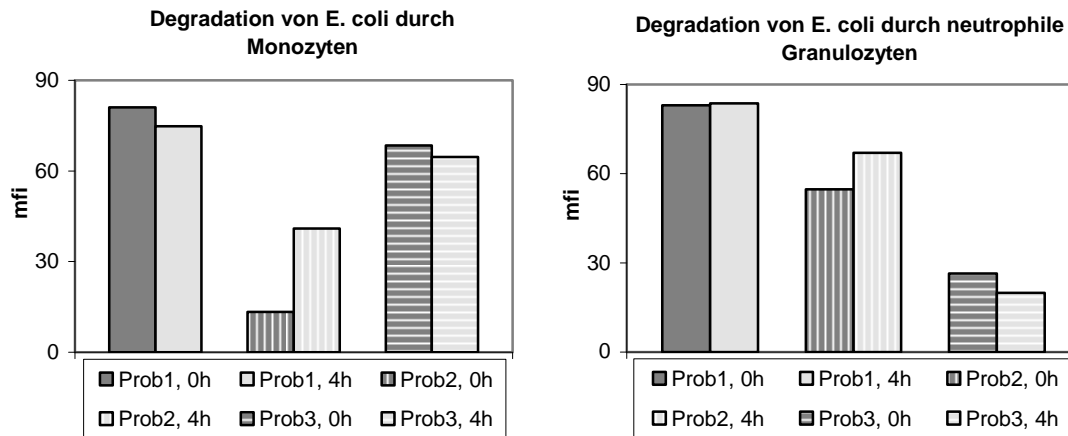


Abb. 19: **Degradation von phagozytierten E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung der Blutproben.** Jedes der drei Säulenpaare entspricht den Daten eines Probanden (Proband 1, 2, 3). Die erste und jeweils dunklere Säule eines Säulenpaares ist Ergebnis des frisch entnommenen und sofort verarbeiteten Blutes (0 Stunden gelagert vor Verwendung). Die zweite, hellere Säule repräsentiert das 4 Stunden vor Verarbeitung gelagerte Blut.

Wie die Abb. 18 und Abb. 19 zeigen, bewirkt die Lagerung der Blutproben vor Untersuchungsbeginn gegenüber den frisch entnommenen und gleich verarbeiteten Blutproben keine Abnahme der Phagozytose- oder Degradationsleistung. Das ist für die Anwendbarkeit des Tests im Praxisalltag eine sehr wichtige Eigenschaft, in dem sich zumindest Transportzeiten von Station ins Labor nicht verhindern lassen.

In jedem Falle empfiehlt sich, für eine Testreihe, in der die Daten untereinander vergleichbar sein sollen, immer vergleichbar altes Blut zu verwenden. Im Idealfall heißt das, dass relativ frisch entnommenes Blut für die Versuche verwendet wird. Darauf wurde bei den Versuchen für diese Arbeit auch geachtet.

#### 4.2.2 Aufbewahrung messbereiter Proben

Im weiteren Teil meiner Arbeit wollten wir klären, ob es möglich ist, die messbereiten Proben aufzubewahren und erst zu einem späteren Zeitpunkt zu messen? Um diese Frage zu klären wurden drei Messungen durchgeführt 1) sofort nach Fertigstellung der Proben, 2) nach 1 Stunde, 3) nach 2 Stunden.



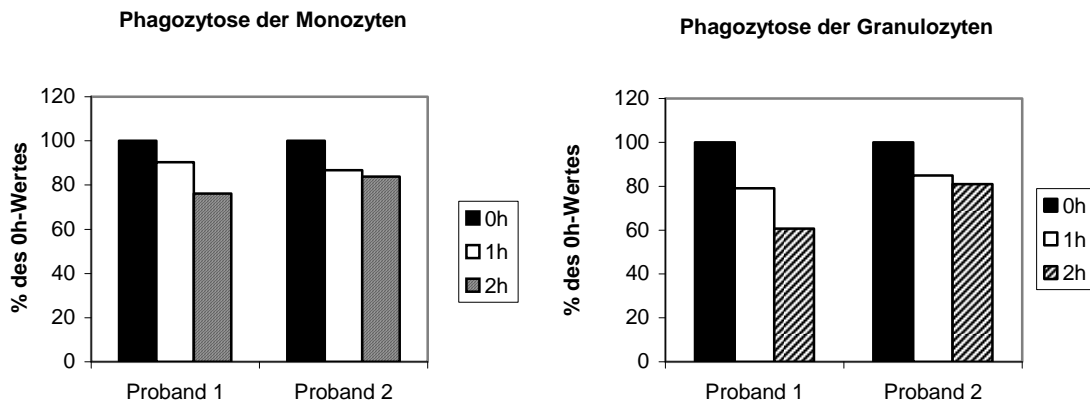


Abb. 20: **Phagozytose von *E. coli* durch Monozyten und neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der messbereiten Proben.** Die Phagozytose ist in Prozent angegeben, die sich auf den Wert sofort nach Fertigstellung der Proben (= 100 %) bezieht. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchs.

Wie in der Abb. 20 dargestellt, nimmt die Fluoreszenzintensität der Proben mit der Zeit kontinuierlich ab. Deshalb wurden in allen weiteren durchgeführten Tests die Proben unverzüglich nach Fertigstellung gemessen.

### 4.3 Qualitätssicherung für den EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay

#### 4.3.1 Ergebnisse der Intra-Assay-Variation

Mittels der Intra-Assay-Variation wird die Testpräzision und Reproduzierbarkeit des Assays anhand von Mehrfachbestimmungen innerhalb einer Messreihe und anschließender Betrachtung des entsprechenden Variationskoeffizienten (VarK) geprüft. Stark gestreute Daten haben einen hohen VarK.

Hierzu wurden pro Normalproband 5 identische Proben angesetzt.

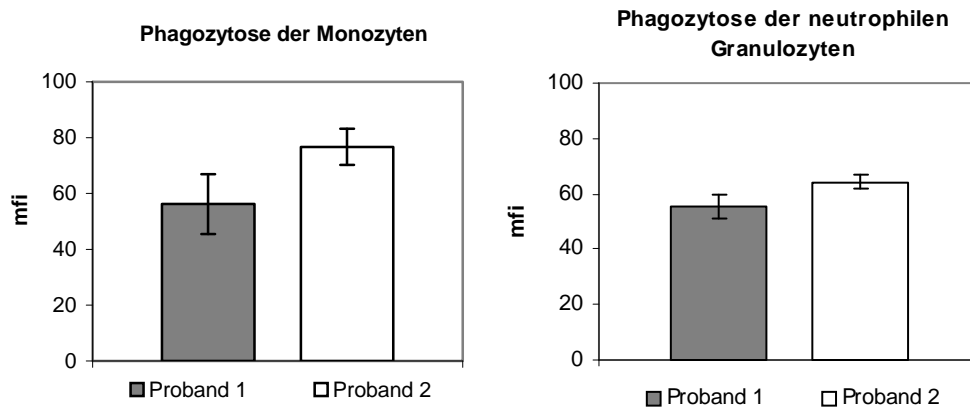


Abb. 21: **Phagozytoseleistung der Monozyten und neutrophilen Granulozyten zweier gesunder Probanden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 5 unabhängig voneinander durchgeführten Assays.

Der Prozentsatz EGFP-positiver Monozyten bzw. neutrophiler Granulozyten nach einer Phagozytosezeit von 15 Minuten und die mittlere Fluoreszenzintensität (=MFI) als Maß für die Phagozytose wurden jeweils für Monozyten und neutrophile Granulozyten ermittelt und der Variationskoeffizient bestimmt:

Tab. 9: **Bestimmung der Intra-Assay-Varianz der Phagozytoseleistung. (MFI)** Jeweils 5 parallel behandelte Proben eines gesunden Probanden wurden ausgewertet.

	Monozyten		Neutrophile Granulozyten	
MFI (EGFP)	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
- Mittelwert	56,23	76,66	55,42	64,29
- Standardabweichung (SD)	10,71	6,49	4,53	2,75
- Variationskoeffizient (%)	19,05	8,47	8,17	4,28

Tab. 10: **Bestimmung der Intra-Assay-Varianz der Phagozytoseleistung. (%)** Jeweils 5 parallel behandelte Proben eines gesunden Probanden wurden ausgewertet.

	Monozyten		Neutrophile Granulozyten	
% phag. Zellen (EGFP-positiv)	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
- Mittelwert	38,65	47,42	46,85	58,46
- Standardabweichung (SD)	1,78	1,47	1,79	1,31
- Variationskoeffizient (VarK in %)	4,61	3,10	3,83	2,24

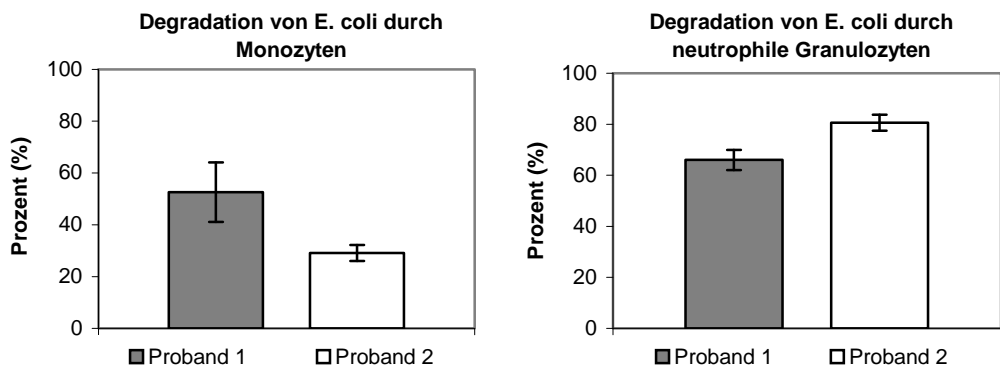


Abb. 22: **Degradationsleistung der Monozyten und neutrophilen Granulozyten zweier gesunder Probanden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 5 unabhängig voneinander durchgeführten Assays.

Tab. 11: **Bestimmung der Intra-Assay-Varianz der Degradationsleistung. (%)** Jeweils 5 parallel behandelte Proben eines gesunden Probanden wurden ausgewertet.

	Monozyten		Neutrophile Granulozyten	
Degradationsleistung (%)	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
- Mittelwert	52,57	29,16	66,01	80,57
- Standardabweichung (SD)	11,45	3,08	3,94	1,28
- Variationskoeffizient (%)	21,78	10,56	5,97	1,59

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Phagozytose- und Degradationsleistung der phagozytierenden Zellen des Probanden 1 im Vergleich zu Proband 2 eine größere Intra-Assay-Varianz aufwies, die Intra-Assay-Varianzen aber mit einer Ausnahme immer unterhalb eines für biologische Testverfahren als ausreichend angenommenen maximalen Variationskoeffizienten von 20% lagen. Die Ausnahme betraf den Variationskoeffizienten der Degradationsleistung von Proband 1 und lag nur wenig oberhalb der 20%-Marke (21,78%, siehe Tabelle 5).

#### 4.3.2 Ergebnisse der Inter-Assay-Variation

Mittels der Inter-Assay-Variation wurde die Präzision und Reproduzierbarkeit des Assays anhand von Messungen an verschiedenen Untersuchungstagen geprüft.

Dazu wurde an drei Tagen der Woche zwei Normalprobanden Blut entnommen und der Phagozytose-Degradation-Assay angefertigt. Dabei wurden sowohl der EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay als auch der Orpegen<sup>®</sup>-Phagotest<sup>®</sup> parallel durchgeführt.

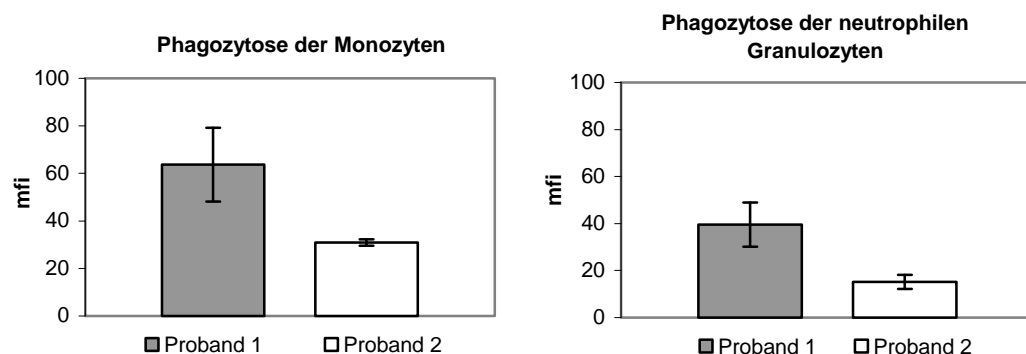


Abb. 23: **Phagozytose von EGFP-haltigen E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten zweier gesunder Probanden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Tab. 12: **Bestimmung der Inter-Assay-Varianz der Phagozytoseleistung. (MFI)** Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 3 unabhängigen Messungen.

	Monozyten		Neutrophile Granulozyten	
MFI	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
- Mittelwert	63,69	30,93	39,59	15,19
- Standardabweichung (SD)	15,52	1,33	9,39	3,01
- Variationskoeffizient (%)	24,37	4,30	23,75	19,82

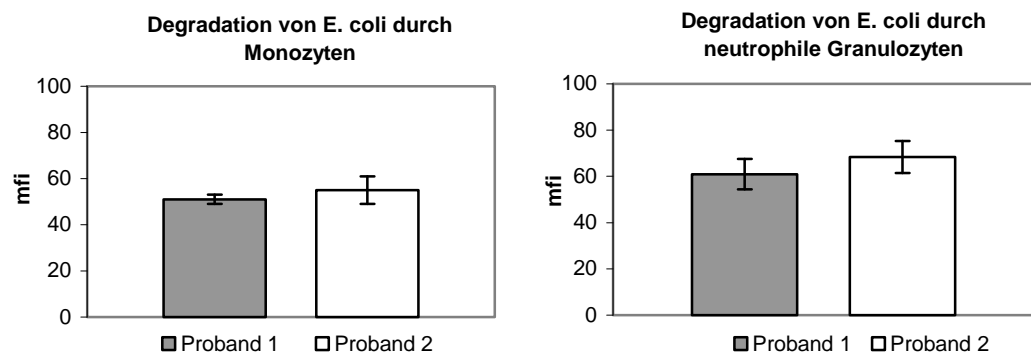


Abb. 24: Degradation von EGFP-haltigen E. coli durch Monozyten und neutrophile Granulozyten aus dem Vollblut zweier Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Tab. 13: Bestimmung der Inter-Assay-Varianz der Degradationsleistung. (%) Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 3 unabhängigen Messungen.

	Monozyten		Neutrophile Granulozyten	
Degradationsleistung (%)	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
- Mittelwert	51,04	54,98	60,94	68,40
- Standardabweichung (SD)	2,50	6,87	6,57	6,97
- Variationskoeffizient (%)	4,90	12,50	10,78	10,19

#### 4.4 Anwendung des EGFP-Phagozytose-Degradation-Assays unter Verwendung von Blutproben gesunder Normalprobanden und immundeprimierter Patienten

Es wurden zwei Patientenkollektive stichprobenartig untersucht: 1) Patienten, die postoperativ in eine Immunparalyse gegliitten sind, 2) Patienten, die nach einer Nierentransplantation, unter einer Langzeit-Immundepressions-Therapie standen. Jede Patientengruppe hat eine eigene, der Alters- und Geschlechtsverteilung entsprechende, Normalprobandengruppe, die ihr im Versuch gegenübergestellt wurde.

Außerdem wurden sowohl der EGFP-Phagozytose-Degradation-Assay also auch der Orpegen-Phagotest<sup>®</sup> parallel durchgeführt.

#### Monozyten

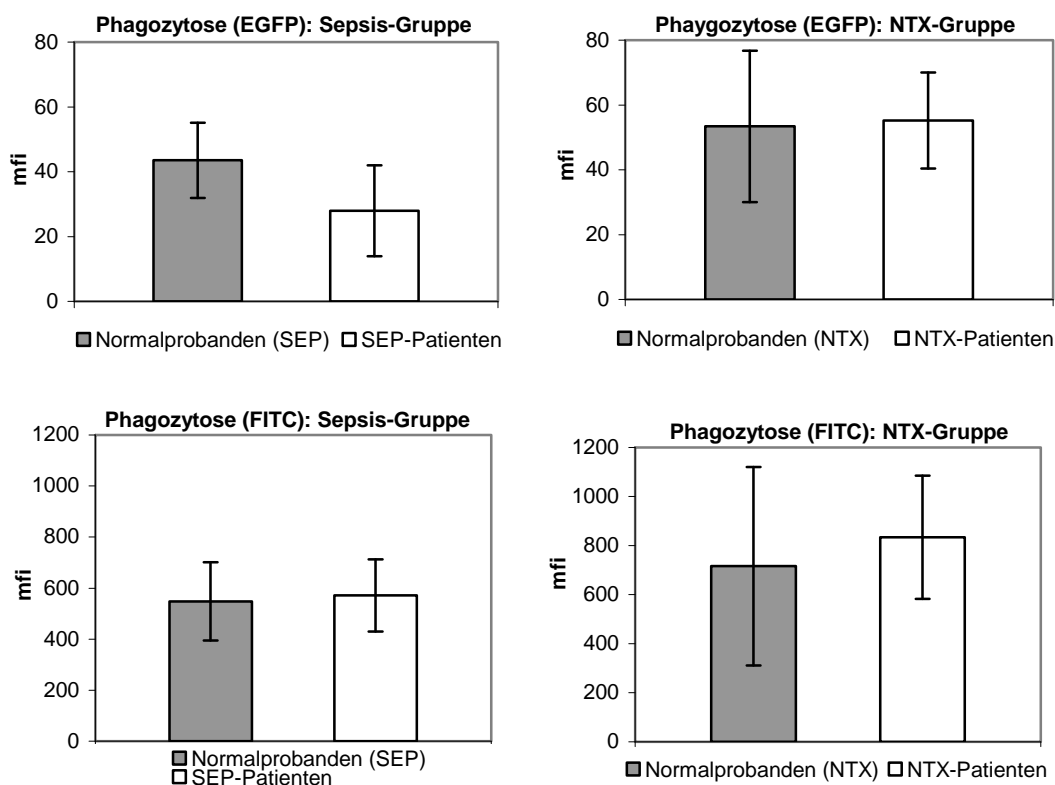


Abb. 25: Vergleich der Phagozytose von EGFP- bzw. FITC-markierten E. coli durch Monozyten von Sepsis- bzw. NTX-Patienten und gesunden Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils n=7.

## Neutrophile Granulozyten

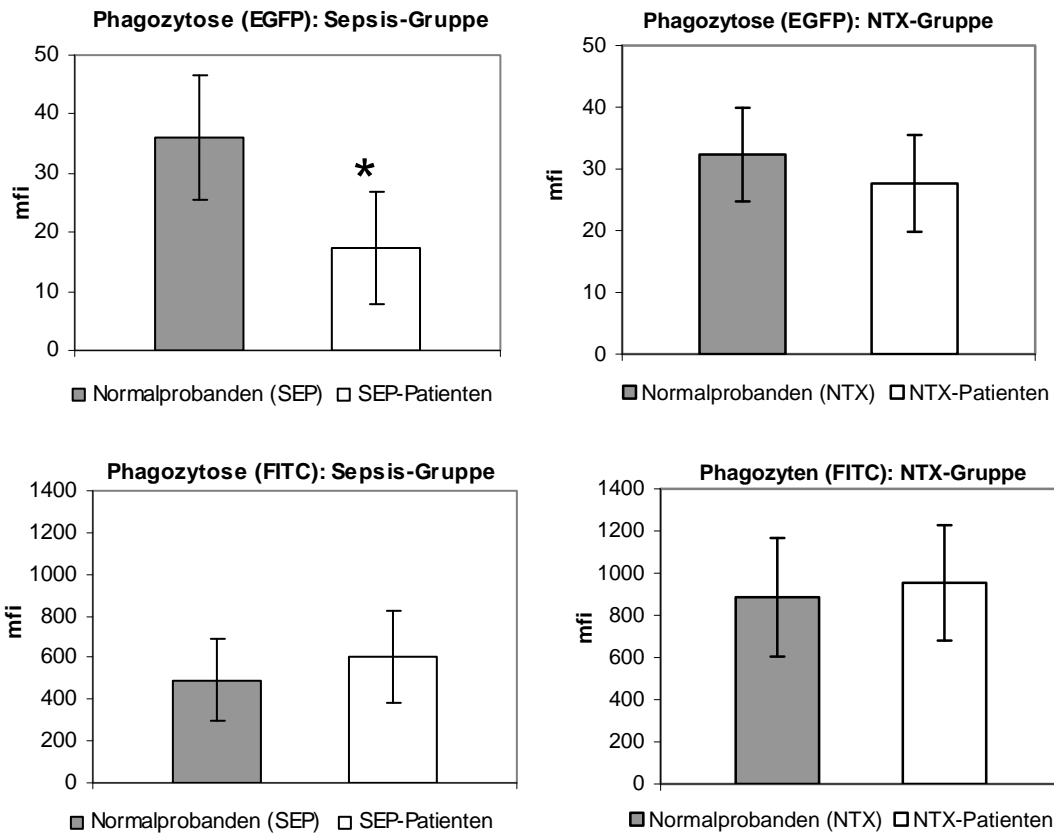
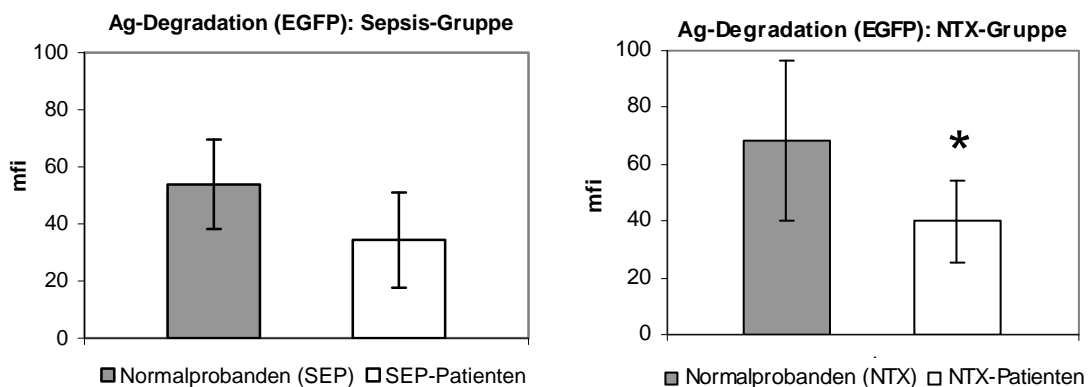


Abb. 26: Vergleich der Phagozytose von EGFP- bzw. FITC-markierten *E. coli* durch neutrophile Granulozyten von Sepsis- bzw. NTX-Patienten und gesunden Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils  $n=7$ . (\*  $p < 0,02$ ; Mann-Whitney-U-Test).

## Monozyten



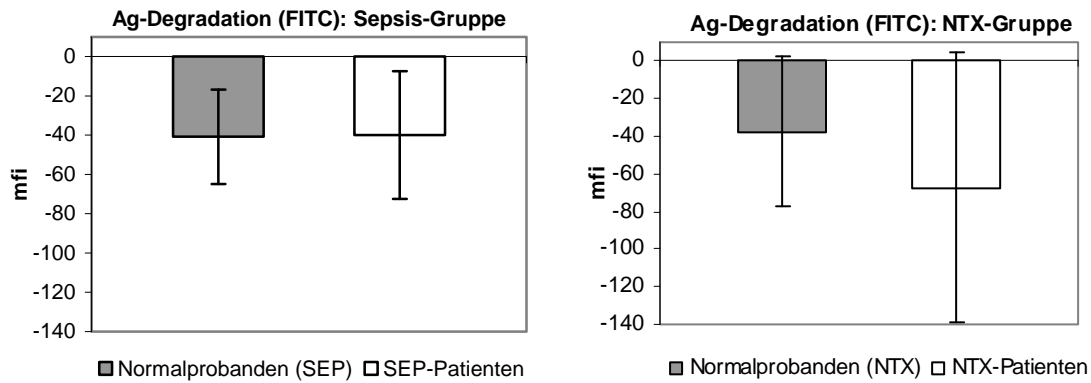


Abb. 27: Vergleich der Degradation von EGFP- bzw. FITC-markierten *E. coli* durch Monozyten von Sepsis- bzw. NTX-Patienten und gesunden Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils  $n=7$ . (\*  $p<0,05$ ; Mann-Whitney-U-Test)

### Neutrophile Granulozyten

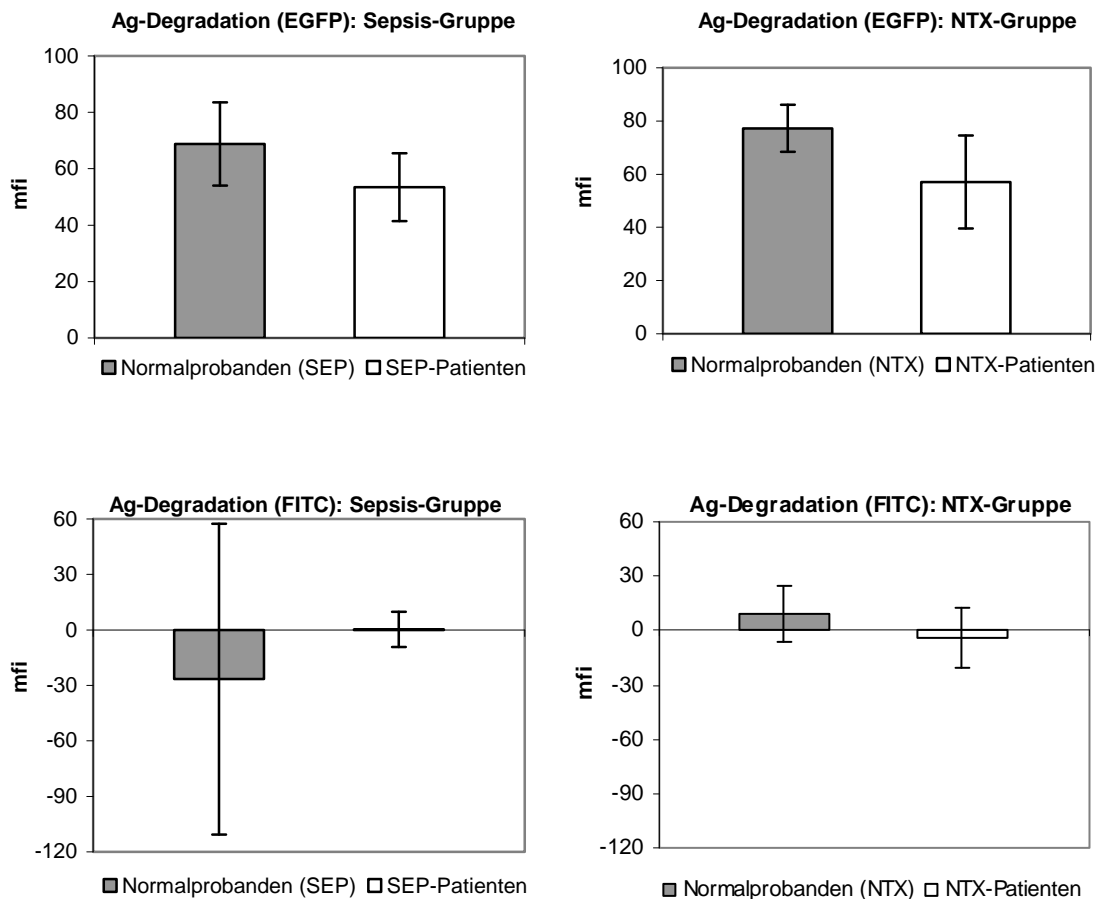


Abb. 28: Vergleich der Degradation von EGFP- bzw. FITC-markierten *E. coli* durch Monozyten von Sepsis- bzw. NTX-Patienten und gesunden Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils  $n=7$ .



---

## 5 Diskussion

### 5.1 Übersicht

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Validierung eines neuen *in vitro* Phagozytose-Funktionstests, der neben der Quantifizierung der Phagozytoseleistung Informationen über die Degradation des phagozytierten Materials liefert.

Der durch uns entworfene Assay bediente sich lebender, fluoreszierender *E. coli* - Bakterien. Zu 2 aufeinander folgenden Meßzeitpunkten wurden die Fluoreszenzintensitäten der Monozyten und neutrophilen Granulozyten ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten zum Messzeitpunkt 1 charakterisierten die Phagozytoseleistung der Zellen. Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten zu den Messzeitpunkten 1 und 2 erlaubte die Beurteilung des Degradationsvermögens der Phagozyten.

### 5.2 GFP-Fluoreszenz

GFP ist ein fluoreszierendes Protein, das in den sechziger Jahren in der Quallenart *Aequorea victoria* entdeckt wurde. Anfang der neunziger Jahre gelang es, GFP mittels Vektoren in das genetische Material anderer Organismen einzufügen. Außerdem wurden durch Punktmutationen GFP-Alloformen geschaffen, die eine stärkere Leuchtkraft als das Wildtyp-GFP und seine bekannten Isoformen aufweisen. Seitdem hat es vielfältige Anwendungen von GFP in der biomedizinischen Forschung gegeben, so z. B. als Marker für die Expression oder Lokalisation eines Gens bzw. Genprodukts (45, 46, 47, 48, 49), als Indikator für den intrazellulären pH-Wert oder als Marker apoptotischer bzw. nekrotischer Prozesse (50, 51, 52).

Das von uns verwendete EGFP fluoresziert 4-35fach stärker als das Wildtyp-GFP, sein Absorptionsmaximum liegt bei 395 nm, sein Emmissionsmaximum bei 490 nm. (53) EGFP ist pH- und temperatursensitiv. Seine Fluoreszenz ist zwischen pH-Werten von 7,0 und 11,5 stabil und fällt bei pH-Werten ausserhalb dieses Bereichs steil ab (50). *E. coli* Bakterien sind bei pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0 (+/- 1 pH unit) lebensfähig (54). Die phagozytierten Bakterien werden in Phagolysosomen enzymatisch und parallel dazu durch reaktive

---

Sauerstoffverbindungen, die kurzfristig während des Phagozytoseprozesses gebildet werden (Oxidativer Burst), abgetötet (Bakterienkilling). Dies geschieht in einem Milieu, das sich um einen pH-Wert von 5,0 bewegt. Mit dem Abbau der EGFP-transformierten Bakterien erfolgt ebenfalls die Degradation von EGFP und damit die Abnahme des Fluoreszenzsignals als Maß für den stattgehabten Proteinabbau. Physiologischerweise ist der Blut-pH-Wert im menschlichen Organismus um 7,4 eingestellt. Bei diesem pH-Wert sind die E. coli lebensfähig und die EGFP-Fluoreszenz ist stabil. Werden die E. coli phagozytiert und den reaktiven Sauerstoffverbindungen in den Phagolysosomen ausgesetzt, kommt es zu einem Abfall des pH auf Werte zwischen 4 bis 5. Die Bakterien sind dann nicht länger lebensfähig, werden zusammen mit dem EGFP abgebaut, und EGFP verliert seine Fähigkeit zur Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität von FITC ist ebenfalls pH-abhängig (55) und nimmt bei einem pH<7,0 ab (maximale Fluoreszenz um pH 9,5). Allerdings kann FITC nicht wie EGFP abgebaut werden, so dass zwar das Floreszenzniveau ph-bedingt abnimmt, aber über die Zeit hinweg konstant bleibt. Die FITC-Daten machen einen tatsächlichen Abbau von EGFP als Ursache der Fluoreszenzabnahme wahrscheinlich, stellen aber keinen Beweis dar. Eine Möglichkeit, die uns zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten nicht zur Verfügung stand, wäre die Messung des intrazellulären EGFP-Gehalts mit einem monoklonalen Antikörper gegen EGFP.

Bei einer Temperatur von 37°C, die der menschlichen Körpertemperatur entspricht, vermehren sich E. coli-Bakterien ideal. Obwohl EGFP eine hohe Thermostabilität aufweist, beeinflusst neben dem pH-Wert auch die Temperatur die Stärke der Fluoreszenz. Bei einer Temperatur von 15°C ist die Fluoreszenzintensität von EGFP am stärksten (56, 57), während sie bei 37°C bereits um 25% reduziert ist. Das EGFP-Fluoreszenz-Signal, das wir nach der Inkubation bei 37°C erzielten, war für die FACS-Messungen stark genug, so dass wir keine die Vitalität von Phagozyten und Bakterien beeinflussende Temperaturreduktion vornehmen mussten.

### 5.3 Fluoreszenz-Signalstärke der transformierten E. coli - Bakterien

Zunächst erfolgte die genetische Transformation der E. coli Bakterien mittels Plasmid-Vektor, welcher sie zur EGFP-Expression befähigt. Es schlossen sich

---

Messungen zur Bakterienfluoreszenz an, in denen die nicht-transformierten den transformierten Bakterien vergleichend gegenübergestellt wurden. Die nicht-transformierten *E. coli* dienen im Phagozytose-Funktionstest als Negativkontrolle. Anfänglich war für uns überraschend, dass die EGFP-*E. coli* in der Stammlösung (Versuchsvorrat), die aliquotiert und sachgemäß eingefroren wurde, eine wesentlich stärkere Fluoreszenz aufwies als die nach dem Einfrieren und Auftauen eine Stunde rekultivierten Bakterien. Weil die Stärke der EGFP-Signale der rekultivierten Bakterien eindeutig ausreichend war, um FACS-Messungen zu erzielen, wurde darauf verzichtet die Fluoreszenz nach der Rekultivierung wieder zu steigern. Wir haben im Laufe der Etablierung die *E. coli* Fluoreszenz nach der Rekultivierung regelmäßig gemessen. Die gemessene EGFP - *E. coli* Fluoreszenz wies einen Variationskoeffizienten von 10,11 % auf, was die Reproduzierbarkeit des ersten Teils unseres Assays belegt.

#### **5.4 Physiologische Mediumsbedingungen**

Danach galt es, das günstigste Kulturmedium für den Phagozytose-Degradation-Funktionstest herauszufinden. Da in diesem Assay lebende, also teilungsfähige Bakterien eingesetzt werden, war es zuerst notwendig sicher zu stellen, dass (i) während der Inkubationszeit keine Vermehrung von Bakterien stattfindet und (ii) nach Abschluss für die Phagozytose vorgesehenen Inkubationszeit keine weitere Aufnahme von Bakterien möglich ist. Darüber hinaus war es unser Ziel, das Kulturmedium möglichst den physiologischen Bedingungen anzugleichen. Wir haben unser Ziel durch Verwendung eines bestimmten Gemisches aus Antibiotika und Benutzung einer relativ geringen Zahl an Bakterien erreicht. Interessanterweise zeigen unsere Versuche, dass sowohl zellfreies Normalprobanden-Plasma die *E. coli* - Vermehrung verhindert als auch der alleinige Zusatz von Antibiotika. Um so nah wie möglich an den *in-vivo*-Bedingungen der zu untersuchenden Patienten zu bleiben und gleichzeitig möglicherweise vorliegenden Plasma-Defekten vorzubeugen, haben wir uns daher entschlossen, das Plasma nicht von den Blutzellen zu separieren und mit antibiotikahaltigem Kulturmedium zu versetzen.

---

## 5.5 Phagozytose - Bakterienmenge und Messzeitpunkt

Anschließend, in den kinetischen Studien und den Versuchen zur Auswahl des Kulturmediums wurde ermittelt, dass nach 15 Minuten ein Maximum der Fluoreszenzintensität erreicht ist. Deshalb haben wir diesen Zeitpunkt als Messzeitpunkt 1 des Assays ausgewählt. Im Weiterem wählten wir für unseren Assay eine möglichst geringe Bakterienmenge ( $3,0 \times 10^6$  E. coli) (4.1.5). Die bereits beschriebene Herstellung eines Kulturmediums (heparinhaltiges Kulturmedium mit Penicillin- und Streptomycinzusatz), das eine Vermehrung der Bakterien und Überleben über 15 Minuten hinaus ausschließt (siehe Abb. 4 bis Abb. 7) und die geringe Zahl der verwendeten Bakterien tragen dazu bei, dass nach der für die Phagozytose vorgesehenen Inkubationszeit keine weitere Aufnahme von Bakterien stattfindet. Dieses ist deshalb so wichtig, weil die Proben für Messzeitpunkt 2 im Inkubator verbleiben und erst nach 4 Stunden der FACS-Messung zugeführt werden. Würde über ca. 15 Minuten hinaus Phagozytose stattfinden, würde vermutlich eine zu niedrige Degradationsleistung gemessen werden.

Eine andere denkbare Herangehensweise wäre, mittels einer chemischen Substanz die Phagozytose nach einer bestimmten Zeit abzustoppen. Allerdings wären grundlegende Nachteile einer chemischen Abstopfung, wie z. B. die Beeinflussung des Degradationsprozesses unter Umständen in Kauf zu nehmen.

## 5.6 Auswahl des Antikoagulans

Eine andere wichtige Frage, die es zu klären galt, war die nach dem zu verwendenden Antikoagulanzen. Zur Auswahl standen die Antikoagulanzen EDTA, Citrat und Heparin. EDTA und Citrat, die aktive Komplexbildner sind und über die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Blutgerinnung verhindern, beeinflussen die Phagozytose ungünstig. Schon 1975 konnte Ryder et al. beobachten, dass ein zu niedriger Serum-Calciumspiegel die Phagozytosefähigkeit von hepatischen Kupffer Sternzellen beeinträchtigt (58). Berger et al. und Segura et al. entdeckten, dass EDTA die Komplementopsonisierung (59) und die Phagozytose (60) der neutrophilen Granulozyten behindert. Yuan et al.

---

beobachteten, dass extrazelluläres EDTA die Phagozytose von Hefepartikeln (*Dictyostelium discoideum*) hemmt, und diese Hemmung durch Zugabe von Calcium aufgehoben werden kann, während die Pinozytose von EDTA nicht beeinflusst wurde (61). Aufgrund dieser Daten bliebe nur Heparin als Antikoagulant für unsere Phagozytoseversuche, auch wenn für Heparin einzelne Berichte vorliegen, die von einer Hemmung der Phagozytose sprechen (62). So berichten Freischlag et al. (63), Labrousse et al. (64) und Salih et al. (65) dass Heparin in neutrophilen Granulozyten die Fähigkeit zu Chemotaxis, Phagozytose und oxidativem Burst signifikant hemmt. Daher empfahl Salih, auch den Einsatz von Heparin in immunologischen Untersuchungen kritisch zu überdenken (65). Um uns selber ein Bild zu machen, haben wir unseren EGFP-Phagozytose-Degradations-Assay mit EDTA-, Citrat- und Heparin-Blut durchgeführt. Phagozytose- und Degradationsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten waren in Heparin-Blut am größten, was die Empfehlung, Heparin als Antikoagulant für Funktionsteste in Vollblut zu verwenden, bestätigt. Interessanterweise erzielten Monozyten in EDTA die höchsten Phagozytoseergebnisse (Citrat- und Heparin-Blut unterschieden sich nicht). Diese Daten stimmen mit Ergebnissen von Grunwald et al. überein, die zeigen, dass Monozyten in Anwesenheit von EDTA auf einen CD14-abhängigen Phagozytosemechanismus zurückgreifen können (66).

## 5.7 Mechanische Umwelteinflüsse

Zur Inkubation der Proben wird ein Thermomixer verwendet. Mit den Rüttelbewegungen des Thermomixers, so die Idee, soll die Blutzirkulation im Gefäßsystem simuliert werden und bis zu Messzeitpunkt 1 für einen ausreichenden Kontakt zwischen Phagozyten und Bakterien sorgen. Interessanterweise scheint die über Stunden anhaltende Rüttelbewegung im Eppendorfgefäß zu einer Lebensverkürzung der Zellen zu führen. In den Vorversuchen, in denen alle Proben bis zu Messzeitpunkt 2, d.h. über 4 Stunden, mit 600 rpm inkubiert wurden, wurde eine Abnahme des Verhältnisses von lebenden und toten Zellen beobachtet. Daher begrenzten wir die Inkubation mit Rüttelbewegungen auf die Phagozytosephase.

---

## 5.8 Auswahl der Antikörpermarkierung zur Zelldifferenzierung

Im Weiteren haben wir verschiedene Kombinationen von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (CD45-PerCP, CD33-PC5 und CD14-PC5) getestet, um die Bedingungen für eine optimale Differenzierung zwischen Monozyten und Granulozyten zu identifizieren. Dabei haben wir festgestellt, dass sich eine Kombination aus CD14-PC5, CD33-PC5 und Seitwärtsstreulicht (SSC) für die Differenzierung der phagozytierenden Zellen in Monozyten (CD33+/CD14+/SSC+) und Granulozyten (CD33-/CD14+/SSC+++), als am günstigsten erwies.

## 5.9 Intra- und Inter-Assay-Variation

Anschließend ermittelten wir die Intra- und Inter-Assay-Variation des Testes. Sowohl die Intra- als auch die Inter-Assay-Varianzen lagen unterhalb oder leicht oberhalb eines für biologische Testverfahren als ausreichend angenommenen maximalen Variationskoeffizienten von 20 % (67) und (i) belegen damit die Validität einmalig erhobener Testdaten und (ii) weisen zumindest bezogen auf Tag-zu-Tag-Veränderungen auf einen stabilen Biorhythmus von Phagozytose und Degradation durch Monozyten und Granulozyten hin.

## 5.10 Auswirkungen der FITC-Markierung auf Bakterien

Die Messung der Degradation phagozytierten Materials war bisher durchflußzytometrisch nicht möglich. Bisher wurden die Oberflächen von Partikeln, die man für Phagozytoseversuche vorgesehen hatte, mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen wie z. B. im kommerziellen Testkit der Firma Orpegen® die FITC-gelabelten E. coli - Bakterien.

Über den FITC-Farbstoff ist bekannt, dass er pH- und lichtempfindlich, aber unempfindlich gegenüber Proteasen ist (68,69). Somit wäre in unserem Assay keine Degradation der FITC-Moleküle zu erwarten, und während die FITC-markierten Bakterien dem lysosomalen Degradationsprozess unterliegen, bliebe die FITC-Fluoreszenz erhalten. Passend dazu sahen wir über den gesamten Beobachtungszeitraum im Gegensatz zum EGFP-Fluoreszenzsignal keine Abnahme des FITC-Signals.

---

Wie die Arbeitsgruppe um Weingart et al. zeigte, kann die FITC-Markierung über kovalente Bindungen an Proteine der Bakterien auch deren Eigenschaften verändern: das ebenfalls gramnegative Bakterium *Bordetella pertussiv* wurde unabhängig vom Opsonierungsgrad im FITC-markierten Zustand deutlich stärker phagozytiert als unmarkiert (70). Desweiteren wurde beobachtet, dass die Aktivität des Adenylatzyklasetoxins, welches einer der Virulenzfaktoren dieses Bakteriums ist, in den FITC-markierten Bakterien um den Faktor 5 reduziert war (70).

Zusammenfassend stellt die EGFP-Markierung durch genetische Transformation eine praktikable und physiologischere Alternative zur FITC-Markierung dar, da sie die äußere Hülle der Bakterien unbeeinflusst lässt und mit den „anderen“ bakteriellen Proteinen abbaubar ist.

### **5.11 Erste Anwendungsergebnisse und Zukunftsperspektiven**

Erste Anwendungsversuche unseres Testes ergaben, dass die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten von Sepsis-Patienten im Stadium der Immunparalyse (Sepsis-Patienten, siehe 3.3.2) signifikant geringer als die von Normalprobanden war. Passend dazu zeigten Mitzner et al. und Ono et al., dass neutrophile Granulozyten von Patienten in Immunparalyse eine verminderte Expression von CD16, einem für die Opsonisierung und damit für die Phagozytose relevanten Protein, aufwiesen (71, 72). Die Untersuchung nierentransplantierte Patienten unter immunsuppressiver Therapie (Glukokortikoid, Ciclosporin A und Azathioprin) zeigte dagegen keine Einschränkung der Phagozytosefähigkeit, während die Degradationsfähigkeit der Monozyten gegenüber Normalprobanden signifikant reduziert war. Wir vermuten, dass für diesen Effekt vor allem die iatrogene Glukokortikoid-Gabe verantwortlich ist. Neben ihren immunsuppressiven und antiinflammatorischen Eigenschaften schützen Glukokortikoide die Integrität der Zell- und Plasmamembran und stabilisieren lysosomale Membranen, wodurch die Freisetzung lysosomaler Enzyme für die Degradationsvorgänge verhindert wird (73, 74), was unsere Beobachtung erklären könnte.

---

Die verminderte Phagozytoseleistung der Granulozyten bzw. die verminderte Degradationsleistung der Monozyten in Patienten mit erworbener Immunsuppression trägt sehr wahrscheinlich zu der erhöhten Infektionsanfälligkeit dieser Patienten bei.

Im Parallelversuch mit FITC-markierten Bakterien (Orpegen-Phagotest<sup>®</sup>) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden und Patienten hinsichtlich der Phagozyten-Leistung feststellbar. Das heißt, der EGFP-Assay weist Unterschiede in der Phagozytoseleistung deutlich sensitiver nach als der Orpegen-Phagotest<sup>®</sup>. Darüber hinaus wies der Orpegen-Phagotest<sup>®</sup> eine deutlich höhere Intra- und Interassay-Varianz als der EGFP-Assay auf.



## 6 Zusammenfassung

Funktionsstörungen phagozytierender Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Ausbreitung einer Infektion. Mit bereits vorhandenen Testverfahren können bislang jedoch nur gravierende, d.h. zumeist angeborene Funktionsstörungen der Phagozytose und keine Degradationsstörungen erfasst werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Phagozytose-Degradations-Assays, der mit Hilfe lebender Bakterien bereits weniger gravierende Funktionsstörungen der Phagozytose und zusätzlich Störungen der Degradation nachweisen kann.

Bisherige Testverfahren arbeiten z.B. mit abgetöteten Bakterien, deren Oberflächenstruktur durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff verändert wurde. Mit dem Ziel, lebende und in ihrer Oberflächenstruktur unveränderte Bakterien zu generieren, wurden *E. coli*-Bakterien mit dem fluoreszierenden Protein EGFP transformiert. Diese gentechnisch veränderten und dadurch EGFP-produzierenden Bakterien wurden in dem neuen Assay verwendet. Es wurden die für den Test optimalen Versuchsbedingungen hinsichtlich Kulturmedium, Messzeitpunkten, Antikoagulanzen sowie Bakterien- und Phagozytenkonzentration ermittelt. Anschließend wurden im Rahmen der Qualitätssicherung Testreihen zur Intra- und Interassay-Varianz durchgeführt, die mit Variationskoeffizienten kleiner bzw. lediglich leicht über 20% eine gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse und bezogen auf Tag-zu-Tag-Veränderungen einen stabilen Biorhythmus des Phagozytoseprozesses belegten. Nach abgeschlossener Testoptimierung untersuchten wir, ob mit diesem Assay Veränderungen in der Phagozytose und/oder Degradation der Bakterien in Patienten mit iatrogenen immunsuppressiver Therapie (NTX-Patienten) oder Immunparalyse (Patienten mit post-operativer Sepsis) messbar sind. Die Ergebnisse dieser ersten Anwendungsversuche ergaben eine signifikant verminderte Phagozytoseleistung in neutrophilen Granulozyten der Patienten mit Immunparalyse. In nierentransplantierten Patienten mit iatrogenen Immunsuppression zeigte sich eine signifikant verminderte

---

Degradationsleistung der Monozyten. Diese Veränderungen waren mit einem kommerziell erhältlichen Test nicht nachweisbar.

Zusammenfassend haben wir einen schnell und einfach zu handhabenden Funktionstest etabliert, der die Charakterisierung der Phagozytose- und Degradations-Leistung der Monozyten und neutrophilen Granulozyten unter *in-vivo*-nahen Bedingungen erlaubt und deutlich sensitiver als ein kommerziell erhältlicher Test Phagozytose-Leistungsunterschiede nachweist. Damit stellen wir für die Forschung und klinische Diagnostik einen neuen, viel versprechenden Funktionstest zu Verfügung.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- 01 - Metchnikoff E. Immunity in Infective Diseases. Cambridge, London, Glasgow, Cambridge Univ. Press, 1905.
- 02 - Eckart WU. Geschichte der Medizin. 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1998.
- 03 - Gibbons RJ. How microorganisms cause disease. 1st ed., Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow, 1992.
- 04 - Wehkamp J, Bals R, Kreft B, Schröder JM, Stange EF. Angeborene Immunabwehr. Deutsches Ärzteblatt, 2007 Feb., 104(5) A257-262.
- 05 - Janeway Jr. ChA, Travers P, Walport M: Host defense against infection. Immunobiology - The immune system in health and disease. 4th edition London, New York, Garland, 1999, ISBN 0-8153-3217-3.
- 06 - Abbas AK, Lichtman A, Pober JS. Cells and tissues of the immune system. Hrsg.: A.K. Abbas. Cellular and molecular immunology. 4th edition, USA, W.B. Saunders Company, 2000, ISBN 0-7216-8233-2.
- 07 - Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol.. 1999; 17: 593-623.
- 08 - Janeway Jr. ChA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol. Today. 1992; 13: 11-16.
- 09 - Medzhitov R, Janeway Jr. Ch. Innate Immunity: Band The New England Journal of Medicine. 2000; 5: 338-344.
- 10 - Medzhitov R, Janeway Jr. Ch. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. Cell, 1997; 91: 295-298.
- 11 - Pommier CG, Inada S, Fries LF, Takahashi T, Frank MM, Brown EJ. Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. J. Exp. Med., 1983; 157: 1844-1854.

---

12 - Wright SD, Craigmyle LS, Silverstein SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J. Exp. Med.*, 1983; 158: 1338-1343.

13 - Ziegler-Heitrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today*. 1993; 14: 121-125.

14 - Martin TR, Mathison JC, Tobias PS et al. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J. Clin. Invest.*, 1992; 90: 2209-2219.

15 - Kaufmann SHE. Mononukleäre Phagozyten und Antigen-präsentierende Zellen. H. Hahn, D. Falke, P. Klein, *Medizinische Mikrobiologie*, 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 1994; S. 195-203, ISBN 3-540-57674-6.

16 - Allen LAH, Anderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 627-637.

17 - Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.*, 1977; 6: 797-807.

18 - Baldrige CW, Gerhard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.*, 1932; 103: 235-236.

19 - Stahl D, Hänsch GM. Granulozyten-Funktionsprüfung. Lothar Thomas, *Labor und Diagnose*, 5. erweiterte Auflage, Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft, 2000; S. 804-811.

20 - Abraham E. Host defense abnormalities after hemorrhage and trauma. *Crit. Care Med.*, 1989; 17: 934-937.

21 - Ninnemann JL, Ozkan AN. Definition of a burn injury-induced immunosuppressive serum component. *J. Trauma*, 1985; 25: 113-117.

---

22 - Alexander J, Stinnett J, Ogle CK, Ogle JD, Morris MJ. A comparison of immunologic profiles and their influence on bactericemia in surgical patients with a high risk of infection. *Surgery*, 1979; 86: 94-148.

23 - Ninnemann JL. The immune consequences of trauma: An overview. Faist E, Ninnemann J, Green D, *Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 1989; S. 3-8.

24 - Christou NV, Meakins JL. Phagocytic and bactericidal functions of polymorphonuclear neutrophils from anergic surgical patients. *Can. J. Surg.*, 1982; 25: 444-448.

25 - Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. *J Oral Pathol Med*, 1993; 22(4): 168-174.

26 - Yu Y, Liang J. Study on phagocytosis of human neutrophils in diabetics. *Hua Xi Yi Ka De Xue Xue Bao*, 1994; 25(2): 134-137.

27 - Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999; 26(3-4): 259-265.

28 - Rassias AJ, Marrin CA, Arruda J, Whalen PK, Beach M, Yeager MP. Insulin infusion improves neutrophil function in diabetes cardiac surgery patients. *Anesth Analg*, 1999; 88(5): 1011-1016.

29 - Reinke P, David H, Scholz D, Ditscherlein G. An analysis of autopsies cases in renal transplant recipients. *Z. Urol. Nephrol.*, 1988; 81: 43-49.

30 - Volk HD, Thieme M, Heym S et al. Alterations in function and phenotype from patients with septic disease - predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst. Mitt.*, 1991; 88: 208-215.

31 - Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF - a primary mediator of the host response. *Ann. Rev. Immunol.*, 1989; 7: 625-656.

---

32 - Wakabayashi Y, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *FASEB J.*, 1991; 5: 338-343.

33 - Schuster HP. Sepsis als Ursache des Multiorganversagens. *Anästh. Intensivther. Notfallmed.*, 1989; 24: 206-211.

34 - Döcke WD, Kox WJ, Müller JM et al. HLA-DR-Expression auf Monozyten bei Peritonitis und Sepsis - Möglichkeiten eines therapeutischen Ansatzes. *Chir Gastroenterol*, 1995; 11(suppl. 2): 34-41.

35 - Rothe G, Valet G, Schmitz G. Durchflußzytometrische Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Zellen. G. Schmitz, G. Rothe, *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. 1. Auflage, Stuttgart, New York. Schattauer Verlag, 1994; 327-330.

36 - Operators Manual. Orpegen PharmaPhagotest Version 7/96. 1996: 1-8.

37 - Peiper SC, Leboeuf RD, Hughes CB, Prasthofer EF. Report on the CD33 cluster workshop: Biochemical and genetic characterization of gp67. Knapp et al., *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, 1989; 814-816.

38 - Mackensen A, Herbst B, Lindemann A. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood*, 1995; 86(7): 2699-2707.

39 - Peiper SC, Andrews RG. CD33 cluster workshop report. Schlossman SF et al. *Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, 1995; 837-840.

40 - Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J Inflamm*, 1996; 46(2): 78-85.

- 
- 41 - Favaloro EJ, Bradstock KF, Kabral A, Grimsley P, Berndt MC. Characterization of monoclonal antibodies to the human myeloid-differentiation antigen, 'gp67' (CD33). *Dis Markers*, 1987; 5(4): 215-225.
- 42 - Cobbold S, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 Family, and Leucocyte Common Antigens: New and Previously Defined Clusters. McMichael AJ, *Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, New York, Oxford University Press, 1987; 788-803.
- 43 - Rothe G, Valet G, Schmitz G: Durchflußzytometrische Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Zellen. G. Schmitz, G. Rothe, *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. 1. Auflage Stuttgart, New York: Schattauer Verlag, 1994: 3-48.
- 44 - Ammer M, Bach GL, Blaha L: *Medizinische Tabellen*, Germany, Demeter Verlag, 1997.
- 45 - Dhandayuthapani S, Via LE, Thomas CA, Horowitz PM, Deretic D, Deretic V. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Mol Microbiol*, 1995; 17(5): 901-912.
- 46 - Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994; 263(5148): 802-805.
- 47 - Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL. Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(15): 7036-7040.
- 48 - Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron*, 1995; 14(2): 211-215.
- 49 - Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, Murgia M, Pozzan T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol*, 1995; 5(6): 635-642.

---

50 - Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J*, 1998; 74(3): 1591-1599.

51 - Takahashi A, Zhang Y, Centonze E, Herman B. Measurement of mitochondrial pH in situ. *Biotechniques*, 2001; 30(4): 810-812.

52 - Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*, 2001; 43(2): 126-133.

53 - Cormack BP, Valdivia R, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein. *Gene*, 1996; 173: 33-38.

54 - Moselio Schaechter. *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 2, 1992; Academic Press, Inc.

55 - Pichler J, Hesse F, Wieser M, Kunert R, Galosy SS, Mott J, Borth N. A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay. *J Biotechnology.*, 2009 Apr, 141(1-2): 80-83.

56 - Lim CR, Kimata Y, Oka M, Nomaguchi K, Kohno K. Thermosensitivity of green destabilized protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin Nsp1. *J Biochem*, 1995; 118: 13-17.

57 - Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 12501-12504.

58 - Ryder KW Jr., Kaplan JE, Saba TM. Serum calcium and hepatic Kupffer cell phagocytosis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1975; 149(1): 163-167.

59 - Berger M, Birx DL, Wetzler EM, O'Shea JJ, Brown EJ, Cross AS. Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol*, 1985; 135(2): 1342-1348.



---

60 - Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod*, 1997; 23(4): 205-208.

61 Yuan A, Siu CH, Chia CP. Calcium requirement for efficient phagocytosis by *Dictyostelium discoideum*. *Cell Calcium*, 2001; 29(4): 229-238.

62 - Ducusin RJ, Sarashina T, Uzuka Y, Tanabe S, Ohtani M. Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants in vitro. *Can J Vet Res*, 2001; 65(1): 38-44.

63 - Freischlag JA, Colburn MD, Quinones-Baldrich WJ, Moore WS. Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril. *J Surg Res*, 1992; 52(5): 523-529.

64 - Labrousche S, Freyburger G, Belloc F, Boisseau MR. Influence of selected heparins on human neutrophil functions in vitro. *Thromb Haemost*, 1992; 68(5): 556-562.

65 - Salih H, Husfeld L, Adam D. Inhibitory effect of heparin on neutrophil phagocytosis and burst production using a new whole-blood cytofluometric method of determination. *Eur J Med Res*, 1997; 2(12): 507-513.

66 - Grunwald U, Fan X, Jack RS et al. Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J Immunol*, 1996; 157(9): 4119-4125.

67 – ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 6 November 1996.

68 - Senkpiel K, Klagge E, Kortin HJ. Inhibition of fading in FITC-labelled coverslip preparations. *Acta Histochem.*, 1985; 77(2): 30-34.

69 - Twining SS. Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. *Anal. Biochem.*, 1984; 143: 159-164.

---

70 - Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Pepler M, Weiss AA. Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun*, 1999; 67(8): 4264-4267.

71 - Mitzner SR, Freytag J, Sauer M et al. Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune support: introduction of a concept. *Ther. Apher.*, 2001 Oct; 5(5): 150-156.

72 - Ono S, Tsujimoto H, Matsumoto A, Ikuta S, Kinoshita M, Mochizuki H. Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. *Am. J. Surg.*, 2004 Aug; 188(4): 229-237.

73 - Heiman AS, Lee HJ. Stabilization of rat liver lysosomes by new anti-inflammatory steroids in vitro. *Steroids*, 1981 Oct; 38(4): 365-373.

74 - Hinz B, Hirschelmann R. Dexamethasone megadoses stabilize rat liver lysosomal membranes by non-genomic and genomic effects. *Pharm Res.*, 2000 Dec; 17(12): 1489-1493.



---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Arbeit *Bicker H, Höflich C, Wolk K, Vogt K, Volk HD, Sabat R. A simple assay to measure phagocytosis of live bacteria. Clin Chem. 2008 May; 54(5):911-5, IF 4,803, publiziert, eine Kopie der Publikation befindet sich im Anhang.*

---

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit an Eides Statt,

1. dass ich die vorgelegte Arbeit mit dem **Titel „Etablierung eines EGFP-Phagozytostests zur Beurteilung der Phagozytoseleistung und des Degradationsvermögens von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.“** selbständig und ohne Anwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe;
2. dass ich nicht selbst erhobene Befunde und/oder Ergebnisse nach ihrer Herkunft eindeutig gekennzeichnet habe,
3. dass die Ergebnisse dieser Arbeit an keiner anderen Fakultät Gegenstand eines Promotionsverfahrens gewesen sind.
4. dass die Arbeit bisher nicht durch Dritte veröffentlicht worden ist.

Rotenburg a. d. Fulda, den

---

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

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. H.-D. Volk und Herrn Dr. med. Robert Sabat für die Überlassung des Promotionsthemas und die umfangreiche und motivierende wissenschaftliche Betreuung, Unterstützung und Förderung der vorliegenden Arbeit.

Die Experimente wurden am Institut für Medizinische Immunologie der Universitätsklinik Charité (Campus Mitte), im COZ und im Ida-Simon-Haus, durchgeführt. In diesem Zusammenhang danke ich Frau Katrin Vogt, Herrn Dr. Wolf-Dietrich Döcke und Frau Christa Liebenthal für die vielfache Unterstützung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Conny Höflich für ihre wissenschaftliche Unterstützung und insbesondere ihre motivierenden Aufmunterungen bedanken, ohne die ich vermutlich nicht bis zum Ende durchgehalten hätte.

Ein Dankeschön auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung sowie die herzliche und schöpferische Atmosphäre.