

**Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie**

**Ärztliche Direktion:
Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff**

**Sektion Experimentelle Anästhesiologie
Leiterin: Prof. Dr. Marion Schneider**

**Phagozytose und Abbau von EosFP E.coli-Bakterien (transfiziert
mit pH-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff) in Vollblutproben von
Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Leonhard Schreiner

München

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marion Schneider
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang
Tag der Promotion: 16.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Sepsis, SIRS und septischer Schock.....	2
1.2.1. Begriffsdefinitionen.....	2
1.2.2. Pathophysiologie.....	4
1.3. Immunsystem	5
1.3.1. Einteilung der zellulären Anteile des Immunsystems	5
1.3.2. Hämatopoiese und Faktoren-abhängige Reifung von Blutzellen	7
1.3.3. G-CSF.....	8
1.3.4. Die unterschiedlichen Phagozytosewege.....	8
1.4. Fragestellung	11
 2. Material und Methoden	 12
2.1. Patientenkollektiv und Blutentnahme.....	12
2.2. EosFP und EosFP E.coli Bakterien.....	14
2.2.1. Fluoreszenzfarbstoffentwicklung von EosFP.....	14
2.2.2 EosFP E.coli Bakterien	15
2.3. Verwendete Materialien und Geräte.....	16
2.4. Inkubationsansatz	17
2.2.1. Ansatz mit Vollblut zur Durchflusszytometrie-Messung.....	17
2.2.2. Isolierung der Zellen nach Ficoll™ Gradient und Mikroskopie	17
2.5. Detektion von Grün-/Rotfluoreszenz.....	18
2.5.1. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie am LSM 510 meta	18
2.5.2. Die Methodik der Durchflusszytometrie.....	19
2.6.Statistische Auswertungsmethoden.....	24

3. Ergebnisse.....	25
3.1. Fluoreszenzmikroskopie mit Spektralanalyse	25
3.2. Diagnostische Durchflusszytometrie von EosFP E. coli im Vollbluttest	28
3.2.1. Reproduzierbarkeit der FACS-Messung von EosFP E.coli-Phagozytose	28
3.2.2. Vergleich der Gruppe Patienten mit Sepsis zu Patienten im septischen Schock sowie weiterer klinischer Parameter.....	31
3.2.3. Phagozytose im Vergleich der Patienten zur Kontrollgruppe.	33
3.2.4. Degradation der Bakterien im Vergleich Patienten zu gesunder Kontrollgruppe	36
3.2.5. Degradationsfunktion als Verhältnis (grün zu rot) im Vergleich Patienten zur Kontrollgruppe.....	39
3.2.6. Phagozytose und Degradation von Granulozyten bei rhG-CSF-behandelten Patienten.....	42
4. Diskussion.....	46
4.1. Grundlegende Evaluation von Material und Methodik.	46
4.2. Gleichzeitige Messung von Phagozytose und Abbau in einem zu standardisierenden Verfahren.....	48
4.3. Evaluierung der Funktion von Phagozytose und Degradation in Granulozyten bei Patienten mit Sepsis.....	49
4.4. Fallstudien zur Wirkung von rhG-CSF auf die Funktion von Phagozytose und Lysosomen in Granulozyten.	52
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis.....	56
 Lebenslauf.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Adr	Adrenalin
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BFU	<i>burst-forming-unit</i>
BFU-E	<i>burst-forming-unit erythroid</i>
Ca	Carcinoma
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CFU	<i>colony-forming unit</i>
CFU-E	<i>colony-forming unit erythroid</i>
CFU-GM	<i>colony-forming unit granulocyte/monocyte</i>
CFU-Eo	<i>colony-forming unit eosinophil</i>
CFU-BAS	<i>colony-forming unit basophil</i>
CSF	<i>colony-stimulating factor</i>
EosFP	<i>Eos – fluorescent protein</i>
Epo	<i>erythropoietin</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAS	Fas-Rezeptor
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FP	<i>fluorescent protein</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein (from Aequorea victoria sp.)</i>
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	<i>interleukin</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	<i>mixed anti-inflammatory response syndrome</i>
MELD	<i>Model of End Stage Liver Disease</i>
MedMFI	<i>median of the mean fluorescence intensities</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MPO	Myeloperoxidase
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrat
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
OP	Operation
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PIRO	<i>predisposition, infection, response, organ failure sepsis</i>
PMNs	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
rhG-CSF	<i>recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor</i>

ROI	<i>region of interest</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA	<i>sequential organ failure assessment score</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>tumor nodes metastasis</i>
Tpo	<i>thrombopoietin</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
VarK	Variationskoeffizient

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Sepsis stellt nach einer aktuellen deutschen Multicenterstudien die dritthäufigste Todesursache nach koronarer Herzkrankheit und akutem Herzinfarkt dar (Engel et al. 2007). Trotz steigender Behandlungsmöglichkeiten und Kosten im Gesundheitssystem, steigt die Inzidenz von Sepsis. Auch wenn pharmakologische Interventionsmöglichkeiten maximal ausgeschöpft werden, ist mit einer Mortalität von 30% bis 50% zu rechnen (Angus et al. 2013, Engel et al. 2007, Hotchkiss et al. 2003). Selbst bei Fällen mit vorhersagbar hohem Risiko, wie nach größeren abdominalen chirurgischen Eingriffen, ließ sich das Risiko lediglich durch neuere Antibiotika senken (Engel et al. 2007, Danikas et al. 2007). Sinnvoll wäre, auslösende Faktoren präventiv verbessern zu können, z.B. durch Unterstützung der natürlichen Immunantwort. Hierzu müssten beteiligte Ko-Faktoren sowie anlage- und systembedingte Schwachstellen gefunden werden.

Ein notwendiger Mechanismus zur Abwehr von bakteriellen Infektionen ist die Phagozytose. Diese reicht beim Gesunden in den meisten Fällen aus, eingedrungene Erreger zu neutralisieren. Zusätzlich werden dabei durch Antigenpräsentation und Interleukinproduktion weitere Anteile des Immunsystems aktiviert um eine effiziente späte Immunantwort zu ermöglichen (Sriskandan et al. 2008). Der exakte Phagozytose-Weg ist bis heute nur unvollständig geklärt. Obwohl verschiedene Ansätze bereits Ergebnisse über die unterschiedliche Funktionseffizienz diverser Rezeptoren erbracht haben, konnte kein klares Gesamtbild gefunden werden.

Unsere Arbeit verfolgt das Ziel der Entwicklung eines neuartigen Immunoassays. Der Fokus lag auf der simultanen Untersuchung von Phagozytose und dem nachfolgenden intrazellulären Abbau, welche mit transfizierten rot und grün fluoreszierenden Bakterien erreicht wurde, wie im weiteren Verlauf der Arbeit aufgezeigt werden wird.

1.2. Sepsis, SIRS und septischer Schock

1.2.1. Begriffsdefinitionen

Seit Hippokrates 400 v.Chr. die σήπω ("Fäulnis") beschrieb, aus der sich das Wort Sepsis ableitet, versucht man sich bis heute an einer präzisen Definition.

Im Jahre 1914 erklärte Schottmüller die Sepsis im Rahmen eines kontinuierlich „spreitenden“ Infektionsherdes. 1989 beschrieb Roger C. Bone: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“

Die Definition der Sepsis stützt sich momentan auf die Vereinbarung der „ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure (1992)“, die Sepsis, SIRS und septischen Schock getrennt definiert. Man einigte sich auf eine Definition der Sepsis bei vorliegendem Nachweis von Bakterien und SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), einer systemischen Entzündungsreaktion ohne bakterielle Ursache anhand vorliegender Kriterien:

SIRS

Definiert als systemische Immunantwort auf ein nicht-infektiöses Ereignis, beim Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie (Herzfrequenz $> 90/\text{min}$)
- Tachypnoe (Atemfrequenz $> 20/\text{min}$)
oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$ bzw. 33 mm Hg)
- Leukozytose ($> 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($< 4.000/\text{mm}^3$)
oder $> 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten

Sepsis

Definiert als systemische Immunantwort bei nachgewiesener Infektion und dem Vorliegen von ebenfalls mindestens zwei der unter SIRS genannten Kriterien.

schwere Sepsis

Vorliegen einer Sepsis mit gleichzeitiger Organdysfunktion.

septischer Schock

Vorliegen einer Sepsis, deren Auswirkungen auf den Blutdruck die Gabe von Vasopressoren notwendig macht.

(Bone et al. 2009)

Im Rahmen der „International Sepsis Definition Conference 2001“ wurden diese Einteilung um einige diagnostische Kriterien erweitert:

Allgemeine Parameter	- Temperatur $< 36^{\circ}$ oder $> 38^{\circ}$ - Herzfrequenz $> 90/\text{Minute}$ bzw. zwei Standardabweichungen über dem altersentsprechenden Wert - Atemfrequenz $> 20/\text{Minute}$ - Plasmaglukose $> 110\text{mg/dl}$ bei Ausschluss eines Diabetes mellitus - Verschlechterung zerebraler Funktionen - Signifikante Ödembildung oder positive Flüssigkeitsbilanz (20ml/kg in 24 Stunden)
Inflammatorische Parameter	- Leukozyten $> 12000/\mu\text{l}$ oder $< 4000/\mu\text{l}$ - Normale Leukozytenzahl, aber $> 10\%$ Linksverschiebung - Plasma CRP > 2 Standardabweichungen oberhalb des Referenzbereichs - Plasma Procalcitonin > 2 Standardabweichungen oberhalb des Referenzbereichs
Hämodynamische Parameter	- Arterielle Hypotension: systolischer Druck $< 90\text{ mm Hg}$, mittlerer Druck $< 70\text{ mm Hg}$ oder systolischer Abfall $> 40\text{ mm Hg}$ bei Erwachsenen oder < 2 Standardabweichungen unterhalb des entsprechenden Referenzbereichs - Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung $< 70\%$ (nicht bei Neugeborenen und Kindern)
Parameter der Organdysfunktion:	- Arterielle Hypoxie ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300\text{ mmHg}$) - Akute Oligurie (Harnausscheidung $< 0,5\text{ml/kg/h}$) - Kreatinin-Anstieg $\geq 0,5\text{mg/dl}$ - Gerinnungsabnormalitäten ($\text{INR} > 1,5$ oder $\text{aPTT} > 60\text{ Sekunden}$) - Klinische Zeichen eines Ileus - Thrombozytopenie ($< 100000/\mu\text{l}$) - Hyperbilirubinämie (Plasmagesamtbilirubin $> 4\text{mg/dl}$ oder $> 70\text{ mmol/l}$)
Parameter der Gewebeperfusion	- Laktat $> 3\text{ mmol/l}$ - Verminderter „capillary refill“ oder Marmorierung der Extremitäten

(Levy et al. 2003)

Ein propagiertes Konzept ist außerdem das PIRO-Konzept (s. nachfolgende Aufstellung). Es geht auf das *annual meeting for critical care medicine 2002* zurück und umfasst wesentliche Faktoren, die die Aspekte und Ausprägung der Sepsis charakterisieren. Es bildet darüber hinaus Zielkategorien und hilft beim Entwurf von Lösungsstrategien für weitere Forschungen und effizientere Therapieansätze. Es soll ein ähnliches Klassifikationsmodell bilden, bzw. Anwendung finden wie die TNM (*tumor nodes metastasis*) – Klassifikation.

<u>PIRO</u>	
Prädisposition	Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, vorbestehende Medikation, genetische Faktoren, Ernährungs- und Immunstatus
Infektion	Erregervirulenz, Erregerresistenz, polymikrobielle Infektion
Reaktion	Individuelles Mortalitätsrisiko und Ansprechen auf Therapien: abhängig von der individuellen Wirtsreaktion und den entsprechenden Antimediatorstrategien
Organdysfunktion	Vorbestehende Organschäden und Organdysfunktionen beeinflussen den Verlauf, entsprechende Therapien und Therapieeinschränkungen können notwendig werden.

1.2.2. Pathophysiologie

Ein unkontrolliert überschießender Entzündungsprozess charakterisiert sowohl Sepsis als auch SIRS.

Dieser wird im Falle der Sepsis in der Regel ausgelöst durch Erregerausbreitung im vaskulären System, meist Bakterien wie: *Staphylococcus aureus* oder *E.coli*, aber auch Pilzinfektionen oder seltener Viren (Engel et al. 2007, Sriskandan et al. 2008, Rackow et al. 1993). Bei dem SIRS geht man davon aus, dass mittels Zellverletzungen (Trauma, größerer Eingriff im Rahmen einer Pankreatitis oder ähnlichem) durch Zelltrümmer eine solche Immunreaktion hervorgerufen wird. In die Blutbahn eingedrungene Pathogene lösen zunächst über den Weg der phagozytierenden Zellen oder direkt über spezielle Pathogene eine Freisetzung

von Histaminen, Kininen, Endorphinen und Zytokinen aus. Es wird sowohl eine pro- als auch anti-inflammatorische Kaskade aktiviert, deren Zusammenspiel bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die genaue Funktion und Pathogenität ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Sriskandan et al. 2008, Aikawa 1996, Dinarello 1997, Ethuin et al. 2004, Tetta et al. 2003, Schroder et al. 2006). Als einer der häufigen Sepsis auslösenden Faktoren wird das LPS (Lipopolysaccharid), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien genannt. LPS kann über den Lipopolysaccharid-Rezeptor, ein Zusammenspiel von CD14-Rezeptor, TLR4 (*Toll-like receptor*) und Lymphozyten-Antigen 96, an Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen eine Signaltransduktion mit Zellaktivierung und Mediatorfreisetzung, wie z.B. TNF (Tumornekrosefaktor) hervorrufen (Underhill et al. 2012). Damit wird eine Aktivierung, sowohl des humoralen, wie auch des zellulären Immunsystems stimuliert. Wird durch Destruktion von Bakterien in kurzer Zeit eine große Menge LPS im Körper freigesetzt, führt dies zu einer massiven Aktivierung des Immunsystems. Durch u.a. hierbei neu akquirierte Leukozyten wie die neutrophilen Granulozyten und deren weitere Reaktionen mit LPS, kann leicht ein „circulus vitiosus“ durch positive Rückkopplung mit folgender Überstimulation entstehen (Matsuda et al. 2006). Den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) wird daher nicht nur im Rahmen der primären Keimabwehr durch Phagozytose eine entscheidende Position in der Entstehung von Sepsis zugesprochen, sondern auch aufgrund der Zytokin-Ausschüttung, die der Phagozytose folgt. Sowohl aktivierende Zytokine und Chemokine, als auch besonders die anti-inflammatorische Botenstoffe sollen dabei produziert werden (Schroder et al. 2006). Damit ist die Reaktion der PMNs einer der entscheidenden Faktoren in einer septischen Situation.

1.3. Hämatopoese

1.3.1. Einteilung der zellulären Anteile des Immunsystems

Obwohl das Immunsystem grundlegend in das spezifische (adaptive) und unspezifische (angeborene) unterteilt werden kann, stehen dennoch beide so sehr

miteinander in Interaktion, dass keines ohne das andere richtig funktionsfähig ist. Das adaptive Immunsystem wird im Allgemeinen durch die Ausbildung spezifischer Antikörper (humorale Immunität) und zytotoxischer Reaktionen charakterisiert. Des Weiteren bildet sich dort das sogenannte immunologische Gedächtnis durch die Entwicklung von B-Gedächtniszellen aus. Das unspezifische Immunsystem wirkt neben den natürlichen Barriersystemen wie Haut und Schleimhäuten an vorderster Front der körpereigenen Abwehr. Dabei ist der Ausdruck „unspezifisch“ irreführend, denn darin beinhaltet sind spezifische Mechanismen, wie das Komplementsystem und verschiedene Rezeptoren zur Erkennung von körperfremden Antigenen. In Verbindung stehen die beiden Grund-Systeme durch eine Reihe von Zytokinen, welche als Zell-Zell-Interaktionen zwischen den phagozytierenden Zellen und den Zellen des spezifischen Immunsystems agieren. Unter anderem geschieht dies über die Präsentation phagozytierter Fremdanigene an der Zelloberfläche über HLA-II (*human leukocyte antigen – II*) Komplexe und die damit verbundene Aktivierung spezifischer auf diesen Fremdkörper gerichteter Immunantworten. Die 1973 erstmals von R. M. Steinmann beschriebenen dendritischen Zellen sind dabei ein Hauptbindeglied zwischen den „äußeren“ Barrieren und den zellulären Anteilen des Immunsystems. Diese entwickeln sich aus Vorläufern der B- und T-Zellen oder aus Monozyten. Sie sind in der Regel stationär und verlassen ihre Lokalisation (Migration) erst nach der endozytotischen Antigenaufnahme. Da Ihnen die wichtige Aufgabe der Antigenpräsentation zukommt und weniger der Phagozytose größerer Mengen unspezifischer Fremdkörper, sind sie Teil der spezifischen Immunabwehr.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neutrophilen Granulozyten sind eine Untergruppe der Granulozyten, welche ihren Namen durch die Anfärbeeigenschaften erhalten haben und aufgrund des segmentförmigen Zellkerns auch als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bezeichnet werden. Die PMNs haben anders als viele andere Zellen des Immunsystems die Fähigkeit zur Migration und Extravasation aus dem Blutkreislauf hin zum Infektionsherd. Aus den Reserven im Knochenmark schwemmen täglich reife Granulozyten in den Blutkreislauf, wo sie lediglich einige Stunden verbleiben. Die Zahl täglich heranreifender neutrophiler Granulozyten ist daher mit $1-2 \times 10^{11}$ beim Gesunden sehr hoch (Borregaard 2010). Die PMN's bilden mit 40-60% der

Leukozyten, neben den eosinophilen (1-3%) und basophilen (0-1%) Granulozyten, sowie den Monozyten und Lymphozyten, die größte Gruppe der phagozytierenden Zellen im zirkulierenden Blut. Ihre Aufgabe besteht neben der Phagozytose und Lyse von Parasiten (Viren, Bakterien), in der Freisetzung von leukotaktisch wirksamen Stoffen (Leukotriene) und der Bildung von "Antibiotika" (Lysozym, Laktoferrin, O₂-Radikalen). Zu ihrer Reifung ist der Faktor G-CSF (*Granulocyte-colony-stimulating factor*) essentiell.

1.3.2. Hämatopoiese und Faktoren-abhängige Reifung von Blutzellen

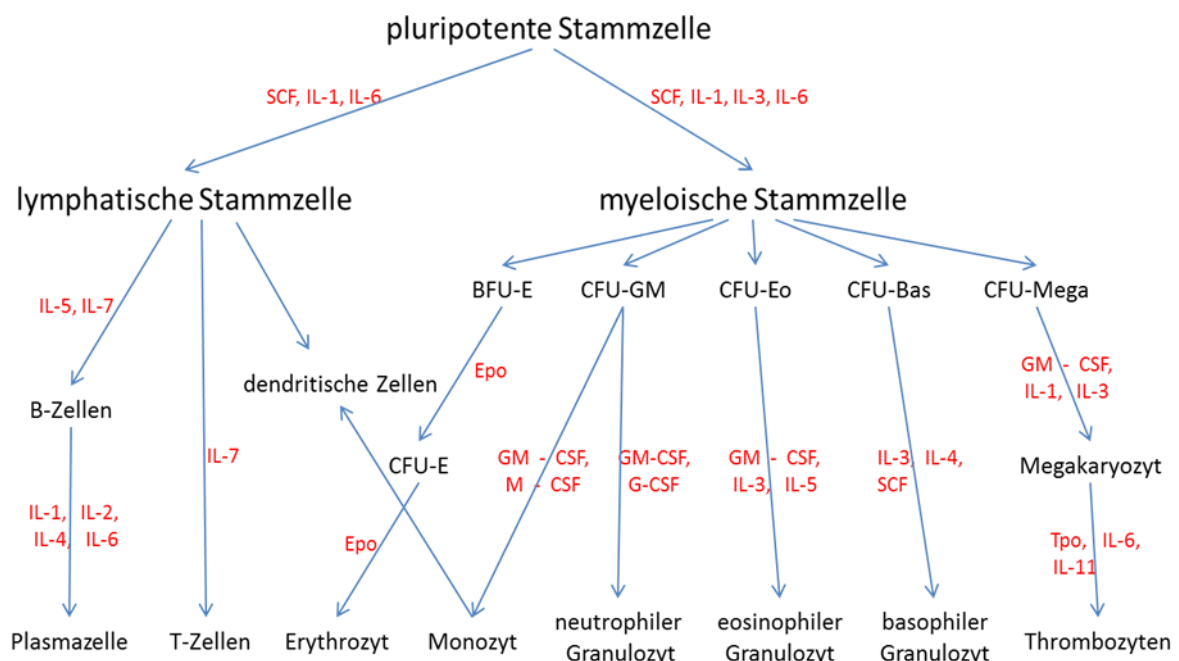


Abb. 1: Stammbaumschema der Hämatopoiese.

Das Schema zeigt die Ausreifung spezifischer Blutzellen aus den pluripotenten Vorläuferzellen mit ihren jeweiligen Zwischenstufen als *burst-forming-unit* (BFU) oder *colony-forming-unit* (CFU) im Knochenmark und den lymphatischen Organen durch spezifische Wachstumsfaktoren: *interleucin* (IL), *stem cell factor* (SCF), *colony - stimulating factor* (CSF), *erythropoietin* (Epo), *thrombopoietin* (Tpo). Die jeweiligen Koloniebildenden Einheiten sind: *burst-forming-unit erythroid* (BFU-E), *colony-forming-unit erythroid* (CFU-E), *colony-forming-unit granulocyte/monocyte* (CFU-GM), *colony-forming-unit eosinophil* (CFU-Eo), *colony-forming-unit basophil* (CFU-Bas), *colony-forming-unit megakaryocytes* (CFU-Mega). Die dendritischen Zellen reifen je nach Typ aus Monozyten oder lymphatischen Stammzellen. Weitere Abkürzungen: GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*).

Die genannten Faktoren sind im Zusammenspiel entsprechend dem Stammbaumschema an der Entstehung bzw. Reifung von Phagozyten beteiligt.

1.3.3. G-CSF

G-CSF (*Granulocyte-colony-stimulating factor*) ist Teil der Zytokine, die bei der Reifung und Effektor-Funktion der Phagozyten beteiligt sind. Als Wachstumsfaktor für Granulozyten ist er insbesondere auch zur Reifung der neutrophilen Granulozyten essentiell. Aufgrund seiner Wirkungsweise wurde G-CSF klinisch interessant und mittlerweile als biologisch hergestellter rekombinierter, unglykosylierter humaner Methionin-Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (rhG-CSF) verfügbar. Zur Rekonstitution des Immunsystems wurden hiermit bereits erste Pilotstudien durchgeführt. Eine der positiven Wirkungsweisen des G-CSF ist entsprechend seine Funktion als Stimulator des Zellwachstums, insbesondere der Ausreifung von Zellen des Immunsystems. Üblicherweise wird dies bereits eingesetzt bei Patienten in Leukozytopenie (z.B. Chemotherapie-induziert). Weitere Anwendungsgebiete sind bei der Stammzelltransplantation und rezidivierende Infektionen bei Chemotherapie. Aktuell wird ebenfalls der Nutzen bei Patienten mit septischem Krankheitsbild evaluiert, um durch die Aktivierung physiologischer Systeme das Immunsystem zu unterstützen (Weiss et al. 2003b, Barth et al. 2002, Gerber et al. 2000).

1.3.4. Die unterschiedlichen Phagozytosewege

1.3.4.1. Rezeptor-abhängige Phagozytose

Phagozytose ist eine spezielle Art der Endozytose und wird beschrieben als eine Aufnahme von Material durch das Einstülpen der Biomembran mit darauf folgender Bildung eines Vesikels. Bei der Aufnahme kleiner Flüssigkeitströpfchen spricht man von Pinozytose, bei größeren Körpern von Phagozytose. Vor allem die PMNs und die mononukleären Phagozyten haben sich darauf spezialisiert, diesen Vorgang effektiv zu benutzen, um Krankheitserreger schnell zu beseitigen. Sie werden daher in der Gruppe der professionellen Phagozyten zusammengefasst. Diese Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche ein Spektrum von Rezeptoren zur Erkennung von Fremdmaterialien, unter anderem Rezeptoren für den Fc (*fragment crystallisable*)-Bereich der Klasse IgG (Immunglobulin G) – vor allem Fc-γRI (CD64) und Fc-γRII (CD32), die Rezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) für den Faktor C3b des

Komplementsystems (Gasque 2004). Zusätzlich findet sich auch der PRR (*pattern recognition receptor*), der repetitive Elemente (*pattern*) auf der Oberfläche körperfremder Zellen erkennt. Eine Unterfamilie hiervon, die TLRs (*Toll-like Receptor*) wurde lange für die Unterstützung des Phagozytose-Vorgangs hauptverantwortlich gemacht. Für unsere Studien elementar ist der TLR4, da dieser LPS (Lipopolysacharid) von Gram-negativen Bakterien (wie E.coli) registriert. Bei diesem Rezeptor wurde mehrfach eine besondere Korrelation mit Sepsis gezeigt (Ofek et al. 1995, Kawai et al. 2010, Alves-Filho 2006). Durch Adhäsion an einen der Rezeptoren an der Zelloberfläche wird die Phagozytose eingeleitet, eine Signalkaskade ausgelöst und das Immunsystem aktiviert (z.B. über TNF, Lymphotoxin, IL-1, IL-6, IL-8, Fas). Dies ist eine notwendige Reaktion, die jedoch auch zu den negativen Folgen des septischen Schocks führen kann (Sriskandan et al. 2008). Die direkte Bindung/Erkennen von Antigenen über Rezeptoren wird als die opsonin-unabhängige Phagozytose bezeichnet. Es existiert neben dieser auch eine opsonin-abhängige Phagozytose (Ofek et al. 1995). Opsonine sind Antikörper sowie Komplementfaktoren (z.B. C3b), welche die Bindung zwischen dem Phagozyten und Antigen/Bakterium verstärken. Da diese frei im Serum diffundieren, können so Antigene bereits vor dem Kontakt zu einem Phagozyten mit Opsoninen umgeben werden (Opsonisierung). Die Phagozytose über Komplement-Rezeptoren soll dabei jedoch lediglich eine nicht-inflammatorische Antwort auslösen (Aderem et al. 1999). Durch die Ligand-Rezeptor-Bindung mit einem der genannten Rezeptoren wird eine fokale Reaktion am Phagozyten ausgelöst. Es bilden sich Pseudopodien und die Plasmamembran stülpt sich ein. Am Ende verschmelzen diese Pseudopodien über dem Fremdkörper und es entsteht ein ins Zellinnere abgeschnürtes Vesikel, das Phagosom. Nach dem Reisverschlussmodell erfolgt dies durch die stetige Vergrößerung der Oberflächenkontaktfäche, die mit einem steigenden Ligandenkontakt einhergeht und damit zu einem Anstieg der Impulsgebung bei der phagozytierenden Zelle führt.

1.3.4.2. Intrazelluläre Keimabtötung

Beim Vorgang der Phagozytose werden über Rezeptor-Bindungen zelluläre Mechanismen zur Abtötung des Keims aktiviert. Die als „respiratory burst“ bezeichnete Zunahme der Stoffwechselaktivität zur Bildung von Sauerstoffradikalen wird z.B. durch den Erregerkontakt mit einer NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrat)-Oxydase in der Zellmembran ausgelöst.

Es werden dabei Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hydroxylradikale ($^{\circ}\text{OH}$) sowie Stickoxide (NO) als antimikrobiell wirksame reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet. Zum Eigenschutz der Zellen vor diesen aggressiven Substanzen wirken SOD (Superoxid-Dismutase), Katalasen und das Gluthation-System zusammen, um einen stetigen Abbau zu gewährleisten. Teilweise befinden sich die Radikale bildenden Enzyme, wie z.B. die Myeloperoxidase (MPO) in Granula (bei PMNs) (Winterbourn et al. 2006), bzw. in den Vesikeln, gemeinsam mit weiteren abbauenden Enzymen wie z.B. Peroxidasen, Lysozym, Laktoferrin und anderen. Da die meisten dieser Hydrolasen ihr pH-Optimum im sauren Bereich haben, wirken sie nur innerhalb der angesäuerten Lysosomen, welche mit dem Phagosom fusionieren. Gleichzeitig wirkt der in diesen lysosomalen Degradationskompartimenten erzeugte niedrige pH-Wert selbst bereits häufig wachstumshemmend auf die Mikroorganismen (DeCoursey 2010).

1.3.4.3. Extrazelluläre Keimabtötung

Neutrophilen Granulozyten haben zudem die Fähigkeit, Bakterien extrazellulär mittels einer freigesetzten fibrillären Matrix aus Chromatin zu binden. Dies verhindert die weitere Verbreitung von Bakterien und fördert das Zerstören der dort festgesetzten Bakterien. Diese Netze werden als „*neutrophil extracellular traps*“ (NETs) bezeichnet (Brinkmann et al. 2004, Brinkmann et al. 2007). Um diese NETs zu aktivieren extrahiert die Zelle eine nach ihrer Aktivierung im Zellinnere gebildete hochaktive Mischung aus Nukleinsäuren und Enzymen in einer Apoptose-Reaktion (Cabrini et al. 2010, Remijsen et al. 2010).

1.4. Fragestellung

Die kombinierte Fluoreszenz transfizierter EosFP E.coli-Bakterien bringt die Möglichkeit eines neuartigen Assays mit sich, zur simultanen quantitativen Messung der Phagozytose und dem intrazellulären Abbau der Pathogene. Der Nutzen unter Laborbedingungen wird in der nachfolgenden experimentellen Arbeit geprüft. Dazu wurden Blutproben von Sepsis-Patienten in einer Pilotstudie getestet. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Können EosFP (Eos - fluorescent protein) transfizierten Bakterien für einen Vollblut-basierten Test zur Beurteilung von Phagozytose und Abbau eingesetzt werden?
- 2) Lässt sich in einem derartigen standardisierten Phagozytose – Test auch der Abbau der phagozytierten Bakterien bestimmen und quantifizieren? Und Unterscheiden sich hier Phagozytose und Degradation von Granulozyten zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Sepsis, bzw. im septischen Schock?
- 3) Wie verändern sich die Parameter Phagozytose und Degradation durch therapeutische Gaben von rhG-CSF (Neupogen®) bei Patienten mit Sepsis?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und Blutentnahme

Es wurden Patienten mit schwerer Sepsis (n=11) sowie im septischen Schock (n=6) untersucht, die auf der chirurgischen Intensivstation des Departement Anästhesiologie (Universitätsklinikum Ulm) behandelt wurden. Die Einteilung wurde anhand der Sepsis-Kriterien der „ACCP-SCCM *Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure* (1992)“ vorgenommen. Da postoperativ häufig zur Kreislaufstabilisierung (meist aufgrund des Blutverlustes) Katecholamine angewendet werden, wurde die Differenzierung zum septischen Schock im Einzelfall davon abweichend anhand der Arztberichte und in Zusammenarbeit mit dem zuständigen Oberarzt vorgenommen. Niedrige Katecholamingaben bis 0,05µg/kg/min, sowie bei Sepsis - unabhängigen Komplikationen, wie vorbestehendes Vorhofflimmern und dem Einzelfall einer kurzfristigen Gabe während kardiopulmonaler Reanimation, wurden nicht gewertet. In dieser Pilotstudie, genehmigt durch die Ethik-Kommission i.R. der Zusammenarbeit mit einer Studie über G-CSF (Weiss et al. 2003b), wurde außerdem die Schnittmenge der Patienten (n=5), welche eine Therapie mit rhG-CSF (*rekombinant human granulocyte-colony-stimulating factor*, Neupogen™) erhielten, 2 Tage nach Therapie erneut untersucht. Dieses Patienten (in nachfolgender Tabelle in oranger Schrift) waren i.R. der Indikationsstellung zur rhG-CSF - Gabe in Neutropenie und zugleich in Sepsis (n=2) oder septischem Schock (n=3). Bei den gesunden Probanden (n=27), handelte es sich um eine anamnestisch gesunde Kontrollgruppe Freiwilliger. Es wurden sowohl den Patienten, als auch den Probanden Blutproben mit Natrium-Heparin-Monovetten unter sterilen Standardbedingungen entnommen. Bei den Patienten der Intensivstation geschah die Probengewinnung im Rahmen der täglichen Routineblutentnahme. Die Patientendaten wurden auf dem Server der Universitätsklinik gespeichert und die Proben im Labor anonymisiert mit Code-Nummern versehen. Bei Sepsis wurden jeweils die Blutproben etwa zwei Wochen nach Erfüllung der Sepsis-Kriterien entnommen, um die Auswirkungen des Zytokinsturms erfassen zu können.

Tab. 1: Patientenliste mit Diagnose und Klinik.

		Hauptdiagnose	Tumorleiden	OP	Adr	NA	SOFA	Sex	Alter
#6178	Sepsis	Peritonitis		A	0	0	2	m	26
#6179	Sepsis	nekrotisierende Fasciitis		W	0	0	5	m	61
#6208	sept. Schock*	paralytischer Ileus; Colitis		A	1	1	9	w	74
#6209	Sepsis *	Ileus; Peritonitis	GIST	A	0	1 ¹	7	m	76
#6323	Sepsis	Colonperforation; M.Crohn		A	0	0	3	w	45
#6324	sept. Schock	Anastomoseninsuffizienz	Colon-Ca	A	1	1	5	m	74
#6388	Sepsis	gedeckte Peritonitis		A	0	0	2	w	45
#6612	Sepsis	Anastomoseninsuffizienz		A	0	1 ²	7	w	45
#6403	sept. Schock	akutes Abdomen		A	0	1	6	w	45
#6404	Sepsis	4-Quadranten-Peritonitis		A	0	1 ²	9	m	77
#6444	sept. Schock	Wundabszess	Nieren-Ca	W	0	1	11	m	59
#6445	sept. Schock	Fournier-Gangrän		W	1	1	7	m	57
#6447	sept. Schock	ARDS; Fasciitis; Leberversagen		W	1	1	14	m	52
#6495	Sepsis *	Anastomoseninsuffizienz	Colon-Ca.	A	0	0	7	w	64
#6496	Sepsis	Bronchialstumpfsuffizienz	NSCLC	L	0	1 ²	5	w	58
#7070	Sepsis	Osteomyelitis		W	0	0	0	w	37
#7142	Sepsis	Pneumonie	NSCLC	L	1 ³	1 ³	4	m	55

In obiger Tabelle wird pro Zeile ein anonymisierter Patient/-in mit den für die Studie entscheidenden Kriterien aufgeführt. Patienten in Sepsis wurden hellblau, Patienten im septischen Schock dunkelblau unterlegt. Die orange Schriftfarbe markiert jene, welche G-CSF erhielten.

Adr. = Adrenalinpflichtigkeit und NA = Noradrenalinpflichtigkeit (0 -> nicht vorhanden, 1 -> vorhanden); SOFA = *sequential organ failure assessment score*; Sex = Geschlecht (m=männlich, w=weiblich); OP = chirurgische Operation; **W** = Wundrevision bei Wundinfekt; **L** = Lungenoperation; **A** = abdominelle Operation; ARDS = *acute respiratory distress syndrome*; Ca = Carcinoma; NSCLC = *non small cell lung cancer*; GIST = gastrointestinaler Stroma – Tumor.

*: Verstorben während der Hospitalisation auf der Intensivstation;

¹: Katecholamingabe bei Tachyarrhythmie i.R. eines vorbestehenden Vorhofflimmerns.

²: Niedrige Katecholamingaben postoperativ <0,05µg/kg/min.

³: Katecholamingabe lediglich kurzfristig im Rahmen einer cardiopulmonalen Reanimation.

2.2. EosFP und EosFP E.coli Bakterien

2.2.1. Fluoreszenzfarbstoffentwicklung von EosFP

Der Fluoreszenzfarbstoff „EosFP(wt)“, der von der Koralle *Lobophyllia hemrichi* isoliert wurde, bildet eines der bisher am besten charakterisierten Proteine der Klasse rot zu grün fotokonvertierten FPs (*fluorescence protein*).

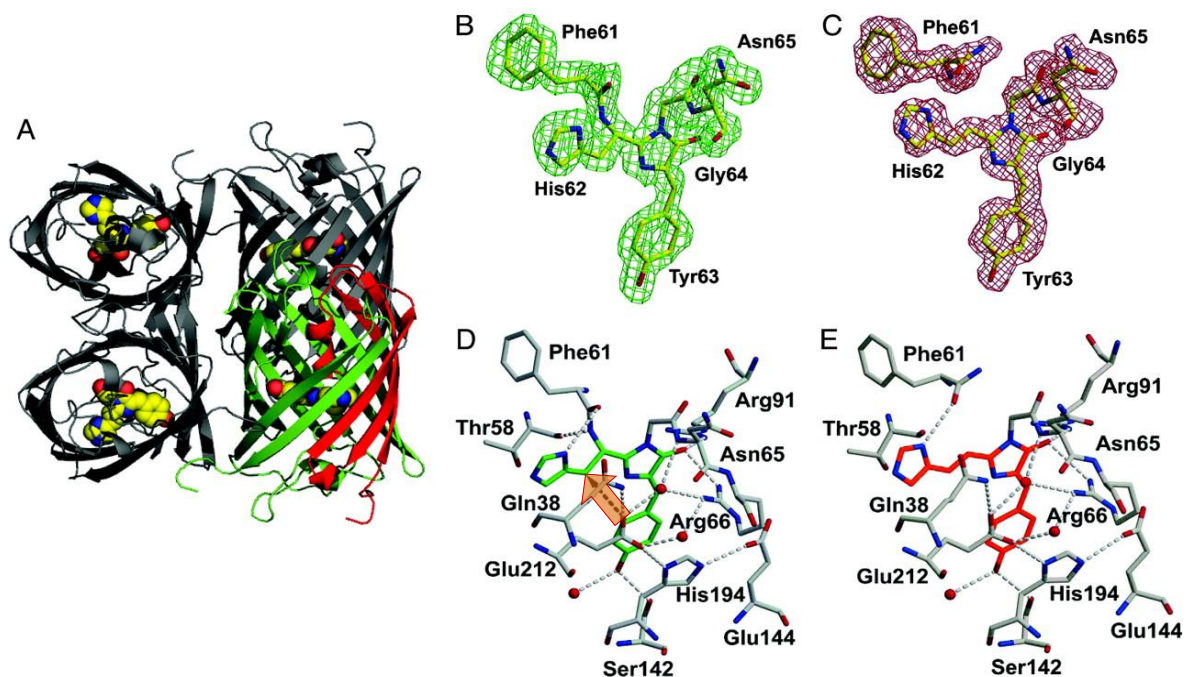


Abb. 2: Molekulare Struktur von „EosFP“.

(A) Banddiagramm des EosFP-Tetramers. Grüne und rote Farben markieren jeweils die durch Fotokonversion geschaffenen Proteinfragmente. Die Atome in den Chromophoren sind farbcodiert (B und C). Die Wasserstoff-Brücken-Bindungen, die die Bildung des grünen (D) und roten (E) Chromophor erzwingen, sind dargestellt als gestrichelte Linien. Der gestrichelte Pfeil (D) zeigt die Interaktion zwischen Glu-212 Carboxy und His-62 C-H auf, die essentiell für die Spaltung der His-62 N-C Bindung ist.

Abbildung und Kommentar mit freundlicher Genehmigung (aus Nienhaus et al. 2005, S.365).

Zur Verdeutlichung wurde das Element der fluoreszenzbestimmenden Interaktion (gestrichelter Pfeil D) zusätzlich farblich (orange-rot) hervorgehoben.

Unter Bestrahlung durch Licht mit einer Wellenlänge von ca. 390nm kann das ursprüngliche Fluoreszenzspektrum mit dem Hauptmaximum bei 506nm und einem Nebenmaximum bei 516nm zu einem roten Spektrum mit einem Maximum bei 571nm verändert werden.

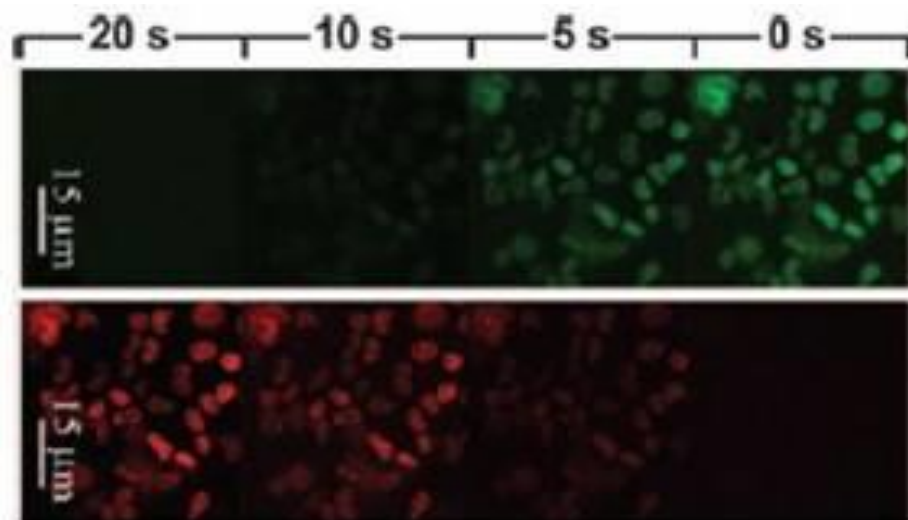


Abb. 3: Induzierung der Photokonversion bei EosFP E.coli Bakterien über die Zeit.

Abbildung mit freundlicher Genehmigung (S.15909 in Wiedenmann et al. 2004)

Die Stabilität der durch Photokonversion entstandenen Eos-FP ist stark pH-abhängig und ist bei pH-Werten von <4 instabil, wohingegen die grüne Komponente selbst bei niedrigen pH-Werten noch konstant bleibt (Wiedenmann et al. 2004).

2.2.2 EosFP E.coli Bakterien

Die „EosFP(wt)“ cDNA wurde in E.coli-Bakterien transfiziert und das Bakterium „pQE32-EosFP(wt)“ geschaffen. Dieses wurde in vitro bis zu einer Zellkonzentration von 5 bis 10^{10} / ml angezüchtet und mit UV-Licht (390 – 400 nm) bestrahlt. Danach wurde die Zellsuspension mit 3,7% Formaldehyd in PBS, das frisch aus Paraformaldehyd hydrolysiert wurde, fixiert und 10mal in PBS gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde auf 10×10 Zellen/ml eingestellt und in PBS im Kühlschrank aufbewahrt. Das nun sowohl rot als auch grün fluoreszierende E.coli-Bakterium wurde mit Paraformaldehyd in Phosphat-Puffer-Lösung fixiert und 5mal in einem Wasch-Vorgang gereinigt.

Da zur Degradation phagozytierten Materials eine pH-Veränderung von statten geht, kann hiermit die Fusion mit dem Lysosom detektiert werden, sobald die rote Emissionskomponente verschwindet.

2.3. Verwendete Materialien und Geräte

- Heraeus Brutschrank 37° C, 5,0% CO₂
- sterile Werkbank der Firma Müller
- Zentrifuge GS-6R Beckmann
- Zentrifuge Mikro Rapid/K Hettich
- Lichtmikroskop Telaval 31 – Zeiss
- Leica – Fluoreszenzmikroskop
- Falcon 5ml *polypropylene round bottom tube nonpyrogenic*
- Eppendorf Mikropipetten
- Sarstedt Polypropylenröhrchen
- konfokales Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 510 meta
- Software Zeiss LSM Image Browser Version 4.0.0.157
- FACS Calibur® (Becton Dickinson)
- CELLQuest Software Version 3.0
- Neubauer-Zählkammer
- Zytozentrifuge
- Objekttrager

Lösungen:

- DBPS 1fach von GIBCO Invitrogen
- RPMI 1640, 25mM HEPES
- Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml, isoton, Biochrom AG)
- BD FACS™ *Lysing Solution*
- BD FACSTFlow
- BD FACSRinse
- BD Cellfix (1:10 dest. H₂O, BD Biosciences)
- Antibiotikum: Gentamycinsulfat (Refobacin ®)
- Glutaraldehyd

2.4. Inkubationsansatz

2.2.1. Ansatz mit Vollblut zur Durchflusszytometrie-Messung

Die mit Natrium-Heparin versetzten Blutproben wurden 1:5 mit RPMI 1640 (Zellkulturmedium) und mit Antibiotika gemischt, um die Proben steril zu halten. Die Zell-Zahl der EosFP transfizierter E.coli-Bakterien wurde jeweils mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer quantifiziert und entsprechend verdünnt. Die Bakterien wurden mit dem Ziel einer Zell-Zahl von ca. 10^9 E.coli/mL übersättigt verwendet und in Einzelportionen zusammen mit dem Vollblut unterschiedlich lange im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen gekühlt, um eine weitere Phagozytose zu verhindern und mit vorgekühltem BD-Lysing Buffer behandelt. Nach der Lysezeit der Erythrozyten (10min), wurden die Proben vorsichtig bei 850rpm für 15min zentrifugiert und dekantiert um die Lysierungsflüssigkeit zu entfernen. Die Proben wurden in zwei weiteren Wasch-Vorgängen mit gekühltem PBS nochmals in derselben Weise zentrifugiert und dekantiert. Je nach Verfahren wurden nachfolgend zusätzliche PerCP(*peridinin-chlorophyll protein*)-Antikörpermarkierungen vorgenommen, mit dementsprechenden weiteren Inkubationszeiten und Waschvorgängen. Bei der Handhabung jeglicher fluoreszierender Stoffe wurden diese vor größerer Lichteinstrahlung geschützt, um einem Fluoreszenzverlust vorzubeugen. Die Proben wurden zur Durchflusszytometrie in Proberöhrchen vorbereitet und vor der Messung mit Cellfix fixiert.

2.2.2. Isolierung der Zellen nach Ficoll™ Gradient und Mikroskopie

Zur konfokalen Lasermikroskopie wurden die Blutproben zusätzlich mit dem Ficoll™ Gradienten - System getrennt, um unterschiedliche Zellpopulationen zu isolieren. Das System basiert auf einem Dichtegradienten welcher nach Zentrifugation der Blutbestandteilen zu einer Separierung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen führt: Plasma, Interphase (Lymphozyten und Monozyten)

und im Sediment: Granulozyten und Erythrozyten. Das Zentrifugieren erfolgte bei 2000 Umdrehungen/min für 20 min bei 10° C ohne Bremse. Entsprechend ließen sich die im unteren Bereich des Dichtegradienten angesiedelten Granulozyten bei vorsichtigem Absaugen mit der Pipette meist zusammen mit lediglich geringen Erythrozytenverunreinigungen separieren. Nach ergänzender Lyse der Erythrozyten mit *Lysing Solution* folgten jeweils zwei Waschschriffe mit PBS bei 900 Umdrehungen/min für 5 min. Nun wurde die aufgeschüttelte Zellsuspension mit der Zytocentrifuge für 5 min bei 300 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Die Objektträger wurden getrocknet entweder zur Sichtkontrolle am Lichtmikroskop und Fluoreszenzmikroskop angefärbt oder für die Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie nativ gehalten, respektive mittels Glutaraldehyd fixiert.

2.5. Detektion von Grün- / Rotfluoreszenz

2.5.1. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie am LSM 510 meta

Zur mikroskopischen Auswertung der Zytospinpräparate wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 meta) verwendet. Diese Methode ermöglicht eine Rasteraufnahme der Bildstrukturen. Der Laserstrahl generiert dabei durch Fluoreszenzanregung die Bildschärfe der tomographischen Ebene entsprechend dem Lochblenden (*Pinhole*) - System. So gelangt nur das gewünschte Fluoreszenz-Licht an den Detektor und sowohl Hintergrundsignale, als auch Fluoreszenzen aus anderen Tiefen werden ausgeblendet. Nach Sichtung mehrerer Ebenen wurde eine Schichtebene ausgewählt, hochaufgelöst und mit Emissionswellenlängen-Muster sowie Intensität digital abgespeichert. Aufgrund der Fixierung mit Glutaraldehyd ist hierbei der bekannte Fluoreszenzpeak um 550nm zusätzlich zum Hintergrundrauschen als Überlagerung zu berücksichtigen. Als Anregungswellenlänge zur Fluoreszenz wurde 488nm gewählt. Die Trennung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten wurde anhand der Emissionsdaten unter Verwendung der Software „Zeiss LSM Image Browser“ Version 4.0.0.157 vorgenommen. Damit konnte die Datenauswertung auf die einzelnen Bildregionen

unterschiedlicher Phagozytosestadien fokussiert werden (ROI/*Region of Interest*) und eine Extraktion der spezifischen Fluoreszenzemissionswellenlängen numerisch erfolgen.

2.5.2. Die Methodik der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie kann als Reihenuntersuchungsmethode quantitativ unterschiedliche Fluoreszenzen und strukturelle Merkmale von Zellen messen. Durch Bestimmung von Zellgröße, Granularität („innere Komplexität“) und Fluoreszenz (meist durch Antikörper) jeder einzelnen Zelle können diese ihren Subpopulationen zugeordnet werden. Die, in unserem Fall durch Phagozytose fluoreszierender Bakterien markierten Zellen, werden nach dem Ansaugvorgang mit einer Salzlösung verdünnt und als Flüssigkeitsstrahl von einer Düse durch einen Argon-Ionen-Laser geschickt. Durch Ummantelung mit einem Hüllstrom (*sheath fluid*) wird von der Düse aus ein konstanter, so dünner Probenstrom erreicht, dass die Zellen den Laser nacheinander passieren. Es werden Vorwärtsstreuung (*forward scatter / FSC*) in einem Winkel von 1° - 20° und die Seitwärts-Streuung (*sideward scatter / SSC*) im 90° - Winkel gemessen. FSC stellt ein Maß für die Zellgröße dar, während das SSC den Granulagehalt der Zelle wiedergibt. Die Fluoreszenzen werden durch den Argon-Ionen-Laser angeregt und mit Fotodetektoren gemessen.

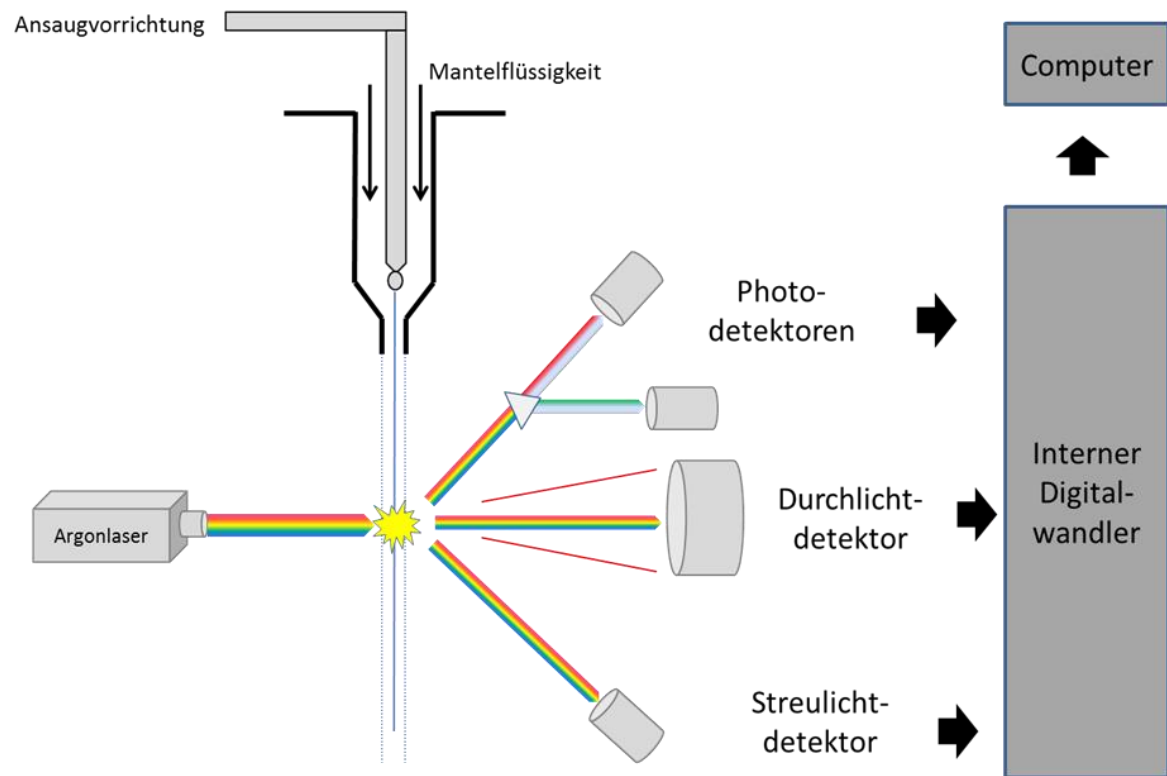


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Durchflusszytometrie (selbst erstellt).

Über die Ansaugvorrichtung wird die Zellsuspension in einem von der Mantelflüssigkeit umgebenen gerichteten Strahl durch die Detektoreinheit / den Laserstrahl gesand. Die hier hindurchtretende Strahlung wird mittels Photosensoren detektiert und digital ausgewertet.

Durch unterschiedliche Emissions- sowie Absorptionsspektren können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. Spektrale Überlappung begrenzt die Anzahl der gleichzeitig messbaren Fluoreszenzintervalle. Sie tritt auf, wenn es zu Überschneidungen von Emissionsspektren kommt.

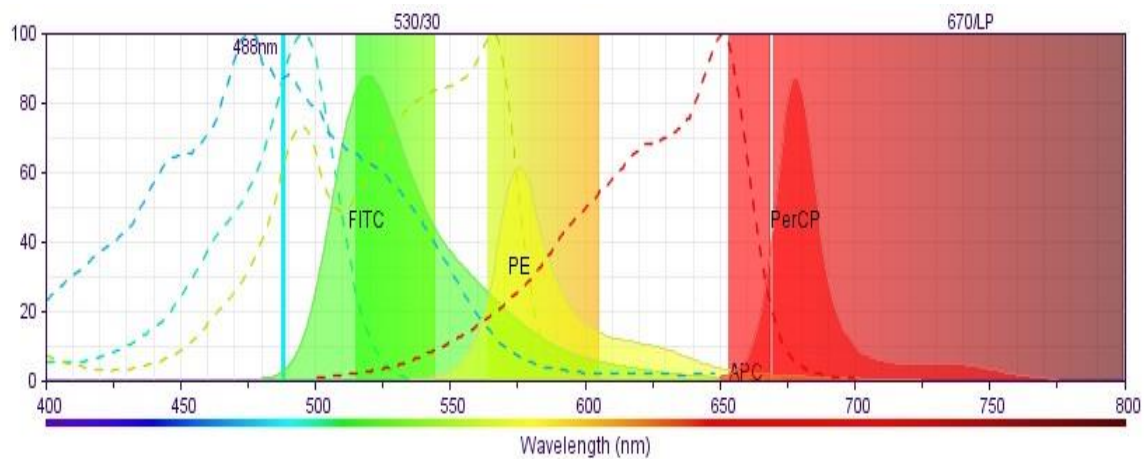


Abb. 5 Überlappung der klassischen Emissionsbereiche für FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-, PE(Phycoerythrin)- und PerCP(Peridinin Chlorophyll Protein)- Antikörpermarkierungen nach Anregung durch 488nm.

Abbildung mit freundlicher Empfehlung von *Courtesy and © Becton, Dickinson and Company*.

Die Überlappung der roten und grünen EosFP-Fluoreszenz liegt in einem Bereich vergleichbar mit der Überlappung von FITC und PE (Standardmarkierungsfarbstoffe) und kann somit in gleicher Weise ausgewertet werden. Des Weiteren lässt das EosFP Spektrum demnach zusätzliche Antikörpermarkierungen in weiteren Fluoreszenzbereichen bei PerCP und APC (Allophycocyanin) zu, wodurch weitere Antikörpermarkierungsuntersuchungen im selben Ansatz vorgenommen werden können. Die gemessenen FSC-/SSC-Daten und Fluoreszenzintensitäten werden über den Digitalwandler an das Computersystem gesendet und dort mithilfe der „CELLQuest“ Software Version 3.0 ausgewertet. Die Daten lassen sich als „Scatter-dot-plot“ (Streudiagramm), wie folgende Abbildung (Abb.6) beispielhaft zeigt, darstellen.

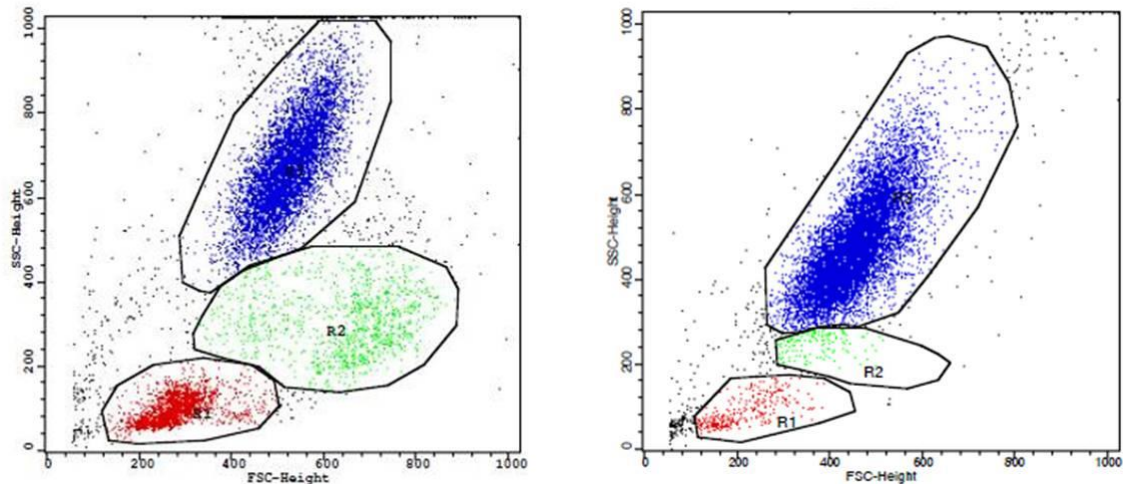


Abb 6: Exemplarische Durchflusszytometrie - Messung.

Links: Messung mit physikalischer Zellzuordnung: Größe (FSC = *forwardscatter* / x-Achse) und Dichte (SSC = *sidewardscatter* / y-Achse) beim gesunden Probanden – Lymphozyten (rot/R1), Monozyten (grün/R2) und Granulozyten (blau/R3). Rechts: Messung bei einem Patient mit Sepsis.

Durch FSC und SSC können die Populationen der Lymphozyten (Gate 1 / R1), Monozyten (Gate 2 / R2) und Granulozyten (Gate 3 / R3) *gated*/getrennt und entsprechend in der jeweiligen Fluoreszenz quantifiziert werden. Durch zusätzliche Fluoreszenzmarkierungen konnten die Zellpopulationen sowohl bei den Kontrollen ohne EosFP Bakterien, als auch als mittels zusätzlicher Fluoreszenzmarkierungen (z.B. PerCP) bestätigt werden (da lediglich zur Bestätigung der anerkannten Methodik durchgeführt, wurden diese Ergebnissen nicht aufgeführt).

Die folgende Abbildungen 7 a) - c) zeigen exemplarisch Ergebnisse markierter und getrennt untersuchter neutrophiler Granulozyten aus Vollblut mit phagozytierten EosFP E.coli.-Bakterien. Es stellen sich die jeweiligen Fluoreszenzen graphisch dar: Fluoreszenz 1 (grün) x-Achse und Fluoreszenz 2 (rot) y-Achse. 30 Minuten nach Zugabe der Bakterien zeigen sich die Fluoreszenzen in Abb. 7 a) mit einer noch fast gleich starken (1:1) Grün- und Rotfluoreszenz, bei der entsprechend auch die meisten positiven Zellen auf einer 45° Diagonalen liegen. Anhand der zeitlichen Folge der Untersuchungen kann man in Abb. 7 b) und c) bei 60 und 120 Minuten Inkubationszeit der Abnahme der roten Fluoreszenz folgen, während die Werte grüner Fluoreszenz (Verschiebung in Richtung x-Achse) bestehen bleiben. In Abb. 7 d) ist entsprechend dem weiteren Abfall roter Fluoreszenz mittlerweile die Haupt-Zellpopulation im rechten unteren Quadranten. Dabei ist die

Verschiebung in Richtung x-Achse analog der grünen Fluoreszenz weiterhin unverändert geblieben und demnach dieses Protein weiterhin ungefähr in gleicher Quantität vorhanden.

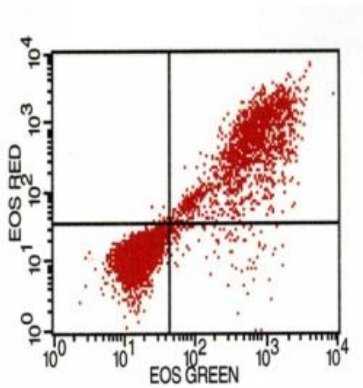


Abb. 7 a)

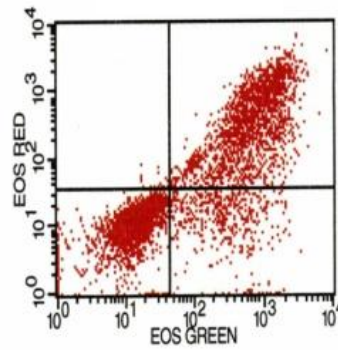


Abb. 7 b)

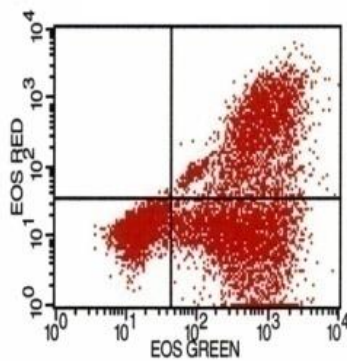


Abb. 7 c)

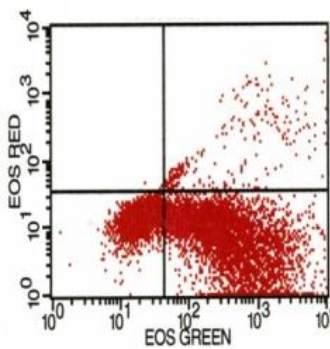


Abb. 7 d)

Abb. 7: Fluoreszenz-Scatter-Dot-Plot a) 30, b) 60, c) 120 Minuten und d) 24h Inkubation.

X-Achse: „EOS GREEN“ = grüne Fluoreszenz (logarithmisch).

Y-Achse: „EOS RED“ = rote Fluoreszenz (logarithmisch).

Zur numerischen Datengewinnung und Trennung von nicht auswertbaren Zelltrümmern wurden durch die CELLQuest Software nach Kalibrierung anhand der Kontrollen die Dot-Plot-Ergebnisse in 4 Quadranten separiert (wie in der Abb. 7 dargestellt) und getrennt ausgewertet: Die relevanten Quadranten waren UR (*upper right* / oben rechts) und LR (*lower right* / unten rechts). Wenn die Anzahl Zelltrümmer weit über die der ergebnisrelevanten Werte hinausging wurde das Testergebnis nicht gewertet. Dies ist aufgrund der erhöhten Fragilität durch die stattgehabte Phagozytose im Rahmen der labortechnischen Auswertung durchschnittlich bei etwa 6% (gesamt 44 Patienten und Probanden) vorgekommen und ließ sich durch Anpassungen im Verlauf deutlich verbessern. Es ergibt sich zu

den jeweiligen Quadranten ein Durchschnitt der Fluoreszenzintensität als MFI-Wert (*mean fluorescence intensity*). Diese Werte wurden von UR und LR im Verhältnis zu den prozentualen Anteilen gemessener Ereignisse gesetzt und zusammen sowohl für die rote, als auch für die grüne Fluoreszenz berechnet:

$$\text{MFI(UR)} \left(\frac{\% \text{UR}}{\% \text{LR} + \% \text{UR}} \right) + \text{MFI(LR)} \left(\frac{\% \text{LR}}{\% \text{LR} + \% \text{UR}} \right) = \text{MFI (gesamt)}$$

2.6. Statistische Auswertungsmethoden

Nach dem Übertragen der Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Statistiken in Excel-Tabellen wurden die gesamt-MFIs automatisiert berechnet und zur weiteren Bearbeitung sowie graphischen Darstellung auf Graph Pad 5.0 übertragen. Die statistische Auswertung wurde innerhalb des Programmes (Graph Pad 5.0) erstellt. Als Homogenitätstest diente der Wilcoxon-signed-rank Test, um die zentrale Tendenz zu bestimmen. Es wurde ein nichtparametrisch statistischer Test verwendet, da es sich jeweils um mehrere Proben eines Patienten/Spenders handelte, bei denen eine zentrale Tendenz anzunehmen war. Zur Bestimmung der Signifikanz-Unterschiede der Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test analog zur Überprüfung der gruppeninternen Homogenität, respektive signifikanter Unterschiede der Gruppen, angewendet. Der p-Wert galt bei < 0,05 als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Fluoreszenzmikroskopie mit Spektralanalyse

Die isolierte Granulozyten, welche für unterschiedliche Zeitperioden mit Eos-FP E. coli Bakterien inkubiert waren wurden nach den Waschvorgängen im Standard-Fluoreszenzmikroskop erstbegutachtet (Exzitationswellenlänge 450–490 nm bei einem FT 510 nm und LP 520 nm - Filter).

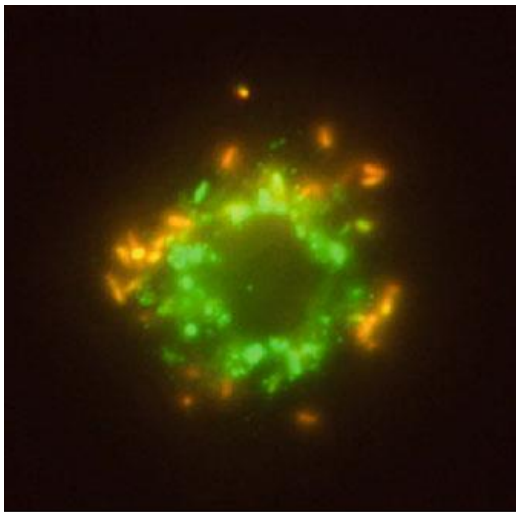


Abb. 8: Fluoreszenzbild eines Phagozyten nach 3h Eos-FP Phagozytose.

Standard Immunfluoreszenzmikroskopie mit 488nm Anregung und Emissionswellenlängen bereichen von 512-560 nm.

Durch die kombinierte rote und grüne Fluoreszenz vor Eintritt in den Phagosomen-Lysosomen-Degradationskomplex erscheinen die peripher liegenden Zellen in Abb. 8 orange. Die Bakterien welche einen pH-Abfall erfahren haben emittieren dagegen lediglich noch grüne Fluoreszenz.

Nachfolgend wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Zeiss 510 *Meta spectral analysis*, 63× Ölimmersionsobjektiv) mit entsprechender Möglichkeit zur Spektralanalyse angewandt. Folgende Abb. 9 zeigt am Beispiel eines Scans die Bilder bereits extrahierten Wellenlängen 520 nm (grün) und 573 nm (rot).

Die Abbildung 10 zeigt das spektrale Verteilungsmuster der damit erfassten Fluoreszenzspektren (Inkubationszeit 120 min).

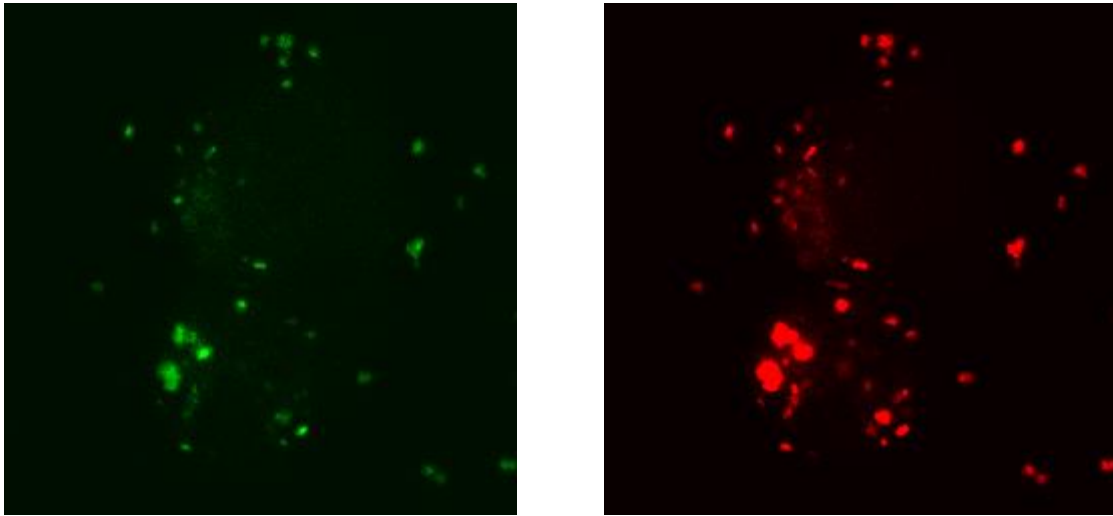


Abb. 9: Rot- und Grünfluoreszenz von Granulozyten nach Inkubation mit Eos-FP Bakterien (Zeiss 510).

Links: Grünes Emissionsspektrum (510-550nm). Rechts: Rotes Emissionsspektrum (560-620 nm).

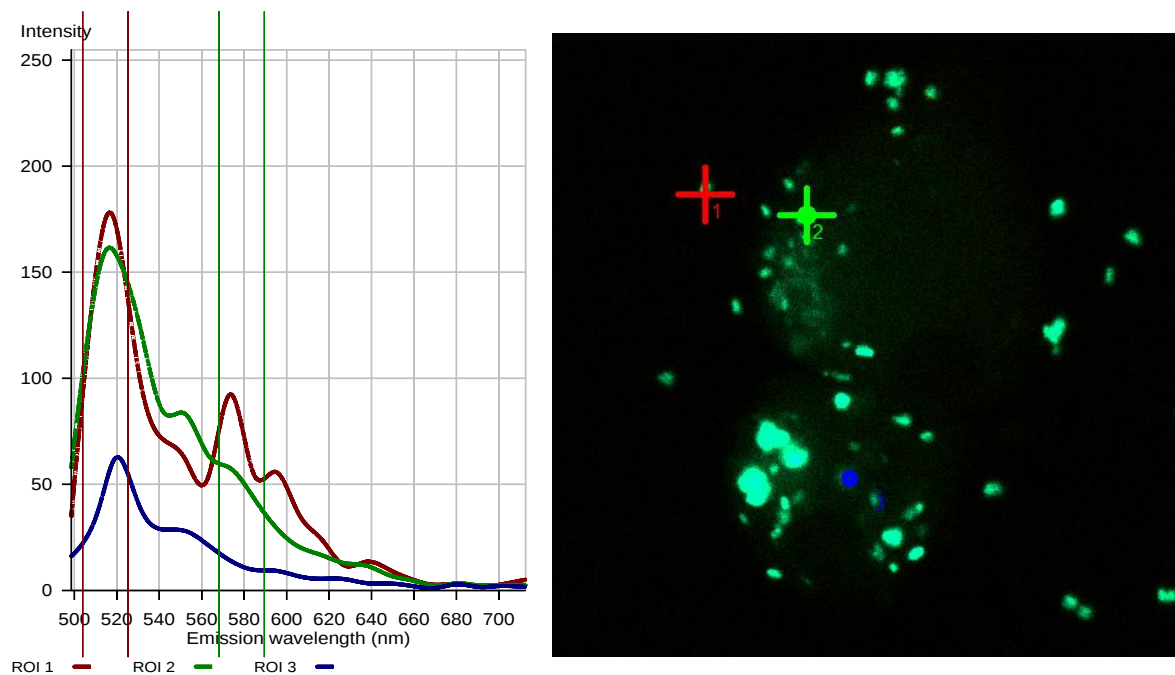


Abb. 10: Verlaufsdarstellung mit extra- und intrazellulären Intensitätsmessungen.

Links: Darstellung der Fluoreszenzemission (X-Achse) und Intensität (Y-Achse) von bestimmten regions of interest (ROI); rechts: Darstellung der Granulozyten nach Phagozytose von Eos-FP Bakterien. Kreuze zeigen die Lokalisation der ROI. Grünes Emissionsspektrum (505-522nm). Rotes Emissionsspektrum (557-590 nm).

Bei Abbildung 10 wurde für die markierten Regionen (ROI/*region of interest*) eine spektrale Auswertung durchgeführt. Das Ergebnis (Graph in Abb. 10) zeigt die Kurven der ROIs mit entsprechenden Peaks im grünen sowie roten Fluoreszenzbereich. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von ROI 1 (rot) ergab eine sowohl stark grüne, als auch rote Fluoreszenz. Die ROI 2 (grün) zeigt durch die deutlich niedrigere Intensität der roten Fluoreszenz den gesenkten pH-Wert durch Eintritt in den Phagosomen-Lysosomen-Degradationskomplex an, bei gleichbleibender grüner Fluoreszenz. Es zeigte sich auch eine homogene flächige Fluoreszenz im Zellinneren bei ROI3 (blau), welche in erster Linie durch Verteilung der Fluoreszenz zunehmend abgebauter Bakterien zu erklären ist. Dieser beschränkt sich entsprechend vor allem auf das grüne Wellenlängenemissionsspektrum, bei insgesamt sinkenden Werten. Der Abfall grüner Fluoreszenz ist als Verteilung der Bakterienproteine über die größere Fläche durch Degradation des Bakteriums, im Sinne einer systembedingten Veränderung i.R. der ROI-Messmethode (Verteilung über eine größere Fläche, Partialvolumeneffekt) zu sehen. Nachfolgende Tabelle zeigt die Fluoreszenzintensität zu einem spezifischen Wellenlängenbereich.

Tabelle 2: : Extra- und intrazelluläre quantitative Messergebnisse aus Abb. 10.

Wellenlänge _{em} [nm]		ROI 1	ROI 2	ROI 3
520		170.4	157.9	62.8
573		92.4	57.6	14.1

3.2. Diagnostische Durchflusszytometrie von EosFP E. coli im Vollbluttest

Im weiteren Verlauf wird Phagozytose als MFI der grünen Fluoreszenz gehandhabt. Degradation wird hingegen im Sinne der Phagosomen-Lysosomen-Fusion bzw. der pH-Senkung direkt durch rote Fluoreszenz angegeben, respektive dem MFI der roten Fluoreszenz. Entsprechend ist mit der Degradationsfunktion die „ratio“, also das Verhältnis von MFI grüner zum MFI roter Fluoreszenz verbunden.

3.2.1. Reproduzierbarkeit der Durchflusszytometrie von EosFP E.coli-Phagozytose

3.2.1.1. Reproduzierbarkeit der Messungen.

Es wurden innerhalb eine Versuchsreihe, bei der die Blutprobe desselben Spenders in 3 getrennten Ansätzen unter Anwendung der Standardbedingungen ausgewertet wurden, die Ergebnisse verglichen um eine Abschätzung der Messungenauigkeit zu erhalten. Es zeigt sich entsprechend folgender Tabelle ein unter 5% schwankender Variationskoeffizient.

Tabelle 3: Ergebnisvariationsbestimmung.

Phagozytose	30'	60'	120'	20h
Mean (Mittelwert)	714,9	682,8	640,4	393,9
SD (<i>standard deviation</i>)	6,779	23,76	29,62	18,14
VarK (Variationskoeffizient)	0.95%	3.48%	4.62%	4.61%

3.2.1.2. Reproduzierbarkeit der Messungen nach zellfixierender Lösung.

Zellfixierende Lösungen können Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen haltbar machen, so dass die Durchflusszytometrie auch zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden können und damit eine effizientere Nutzung von Ressourcen ermöglicht wird. Um zu evaluieren ob mit diesem Zusatz eine Ergebnisverfälschung, z.B. über Veränderung des pH-Wertes stattfindet, wurden mehrere Ansätze mit und ohne zellfixierende Lösung (Cellfix[™]) durchgeführt und die Unterschiede ausgewertet.

Es zeigten sich, wie in den folgenden Graphen dargestellt, in diesem Ansatz keine über die Messungenauigkeit hinausgehenden Veränderungen durch Zugabe von CellFix®.

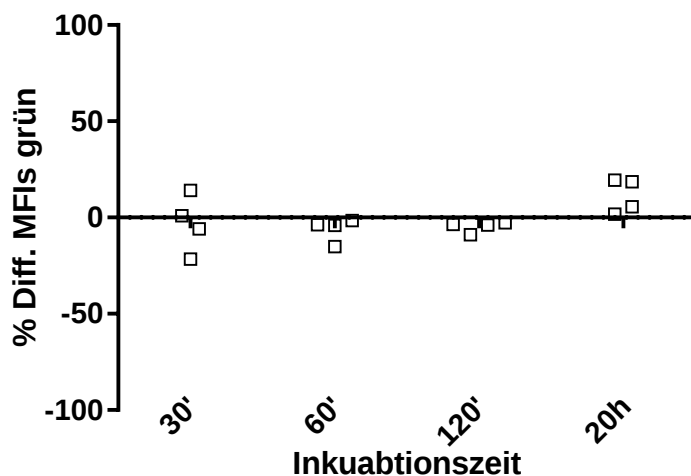


Abb. 11 a) Prozentuale Differenz der *Mean Fluorescence Intensity* der grünen Fluoreszenz.

Y-Achse: Prozentuale Differenz/Abweichung der grünen Fluoreszenz-Werte nach Cellfix[™] - Zugabe. X-Achse: Inkubationszeit.

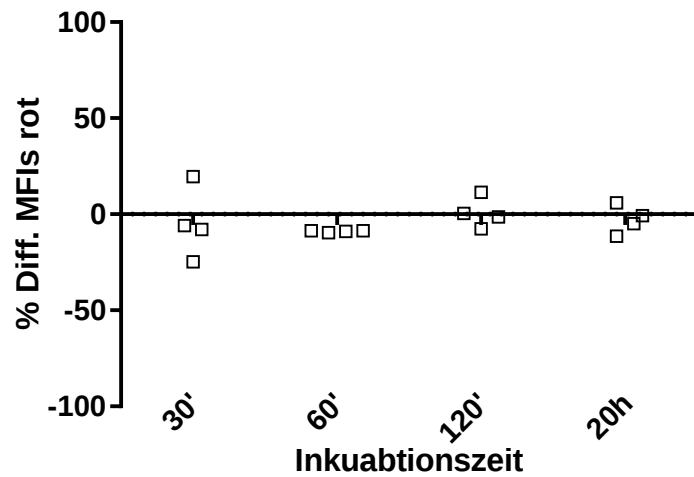


Abb.11 b) Prozentuale Differenz der *Mean Fluorescence Intensity* der roten Fluoreszenz.

Y-Achse: Prozentuale Differenz/Abweichung der roten Fluoreszenz-Werte nach Cellfix[™] - Zugabe. X-Achse: Inkubationszeit.

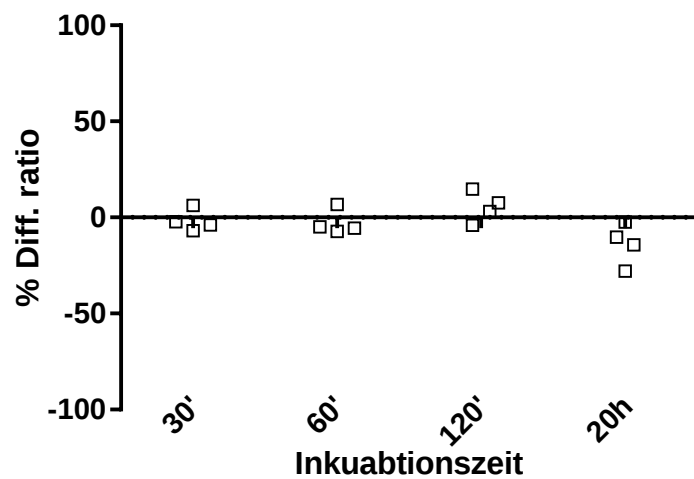


Abb. 11 c) Differenz der *Ratio*.

Y-Achse: Prozentuale Differenz/Abweichung der grünen Fluoreszenz-Verhältnis-Werte (rot/grün) nach Cellfix[™] - Zugabe. X-Achse: Inkubationszeit.

3.2.2. Vergleich der Gruppe Patienten mit Sepsis zu Patienten im septischen Schock sowie weiterer klinischer Parameter

Es wurde getestet, ob sich die Ergebnisse für Patienten mit Sepsis (n=11) von Patienten im septischen Schock (n=6) unterscheiden. Da es i.R. der Granulozytenfragilität nach Phagozytose teilweise bei unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten zu nicht mehr verwertbaren Zellfragmentierungen gekommen ist, fehlen vereinzelte Werte.

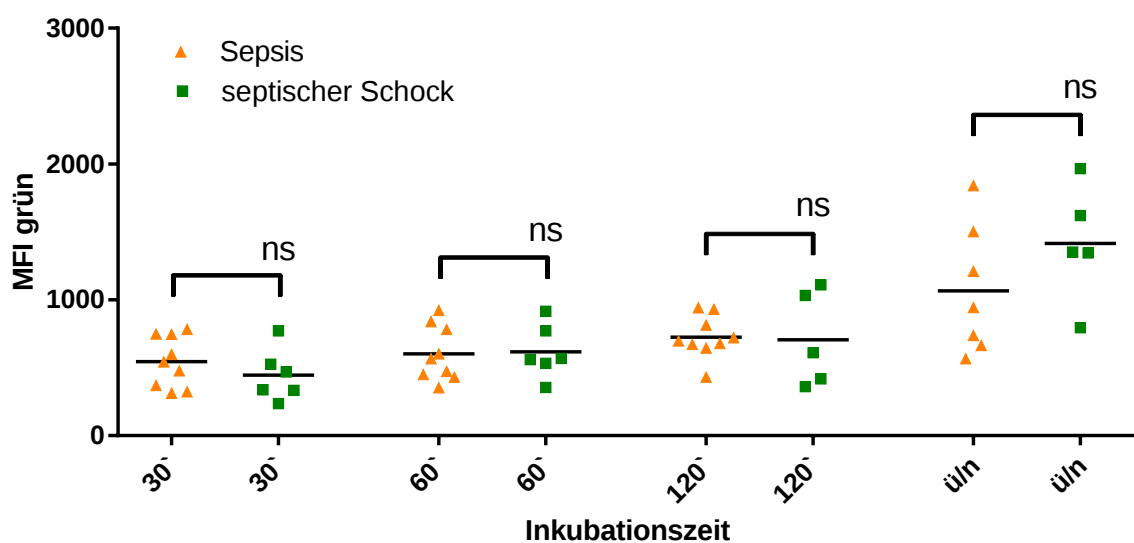


Abb. 12: Vergleich der Phagozytosefunktion von Patienten mit Sepsis und im septischem Schock.

Y-Achse: Grüne MFI (*Mean Fluorescence Intensity*)-Werte. X-Achse: Inkubationszeit (ü/n = über Nacht). Datenwolken der Patienten mit Sepsis (orange) und der Patienten im septischen Schock (grün) mit gleicher Inkubationszeit wurden nebeneinander dargestellt. Nicht signifikant = "ns".

Abbildung 12 zeigt, dass sich die Ergebnisse beim Vergleich der Phagozytose von Patienten mit Sepsis zu Patienten im septischen Schock nicht signifikant unterscheiden (nicht signifikant: ns > 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

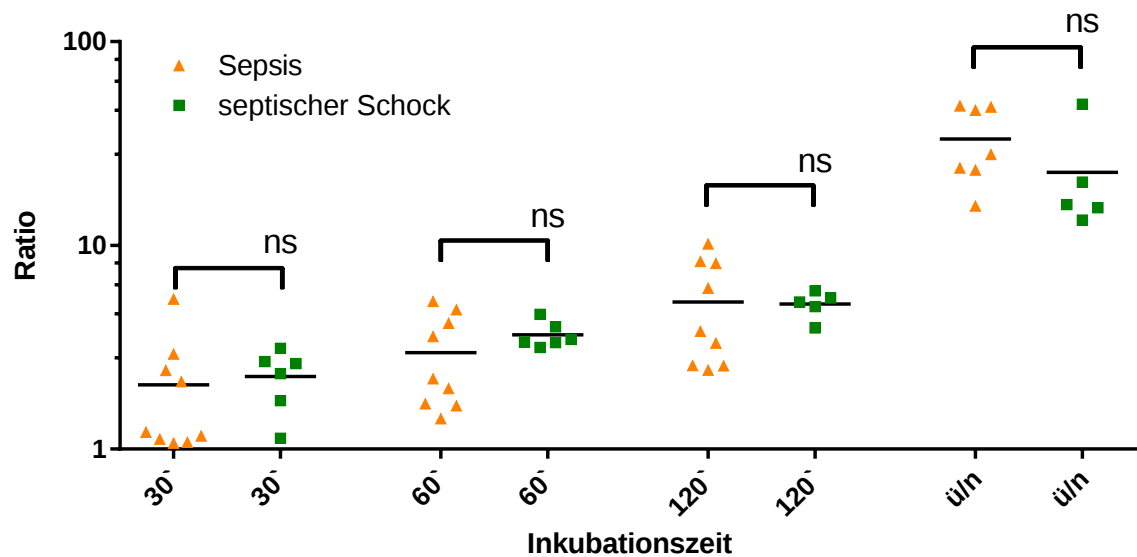


Abb. 13: Vergleich des intrazellulären Abbaus von Patienten mit Sepsis und im septischem Schock.

Y-Achse (logarithmisch): Verhältnis rote/grüne Fluoreszenz. X-Achse: Inkubationszeit (ü/n = über Nacht). Datenwolken der Patienten mit Sepsis (orange) und der Patienten im septischen Schock (grün) mit gleicher Inkubationszeit wurden nebeneinander dargestellt. Nicht signifikant = "ns".

Abbildung 13 zeigt den Vergleich des Verhältnisses von grüner zu roter Fluoreszenzemission. Die Patienten im septischen Schock verteilen sich deutlich zentraler gruppiert.

Zur Suche nach möglichen Ursachen anderer individueller Unterschiede bei den Ergebnissen einzelner Patienten wurden zusätzliche Vergleichsstatistiken mit klinischen Daten erstellt. So wurden z.B. die Phagozytose- und Degradationswerte zusätzlich nach Überleben/Versterben auf Intensivstation, Steroidgabe, *Glasgow-Coma-Scale*, Diabetes, max./min. Blutzucker, Alter, Geschlecht, unterschiedlichen Sepsis-Scores, usw. miteinander verglichen. Es konnte jeweils kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

3.2.3. Phagozytose im Vergleich von Patienten zur Kontrollgruppe

Folgende Graphen zeigen die Entwicklung der Aufnahme von EosFP E.coli Bakterien durch Granulozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation. Anhand des MFI-gesamt-Wertes der grünen Fluoreszenz zeigt sich der Bakterienabbau.

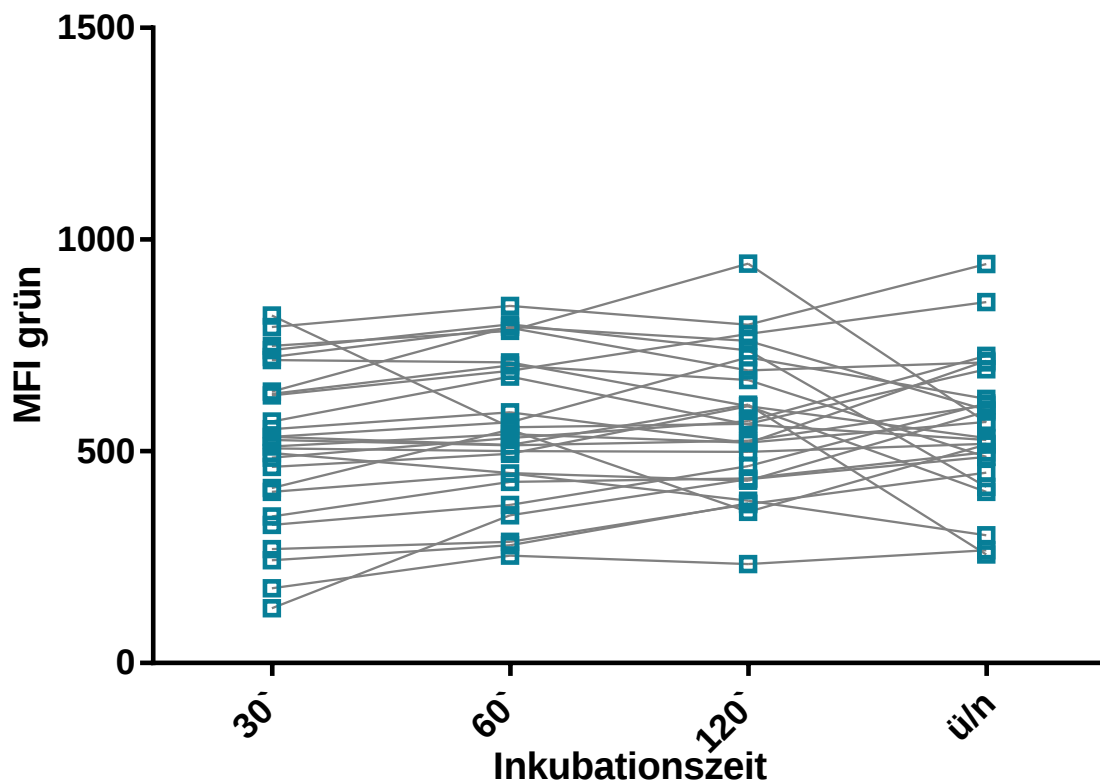


Abb. 14: Phagozytose im zeitlichen Verlauf bei gesunden Probanden.

Y-Achse: MFI (Mean Fluorescence Intensity) - grün von gesunden Probanden (verbunden).
X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

Die Abb. 14 zeigt den Verlauf der gesunden Kontrollgruppe (n=27). Hier sind leicht konstant steigende Ergebnisse über die Zeitwerte 30min, 60min und 120min zu ermitteln. Nach 120min und bei den Werten über Nacht (ü/n) beginnt die grüne Fluoreszenz einiger Proben teilweise wieder zu sinken.

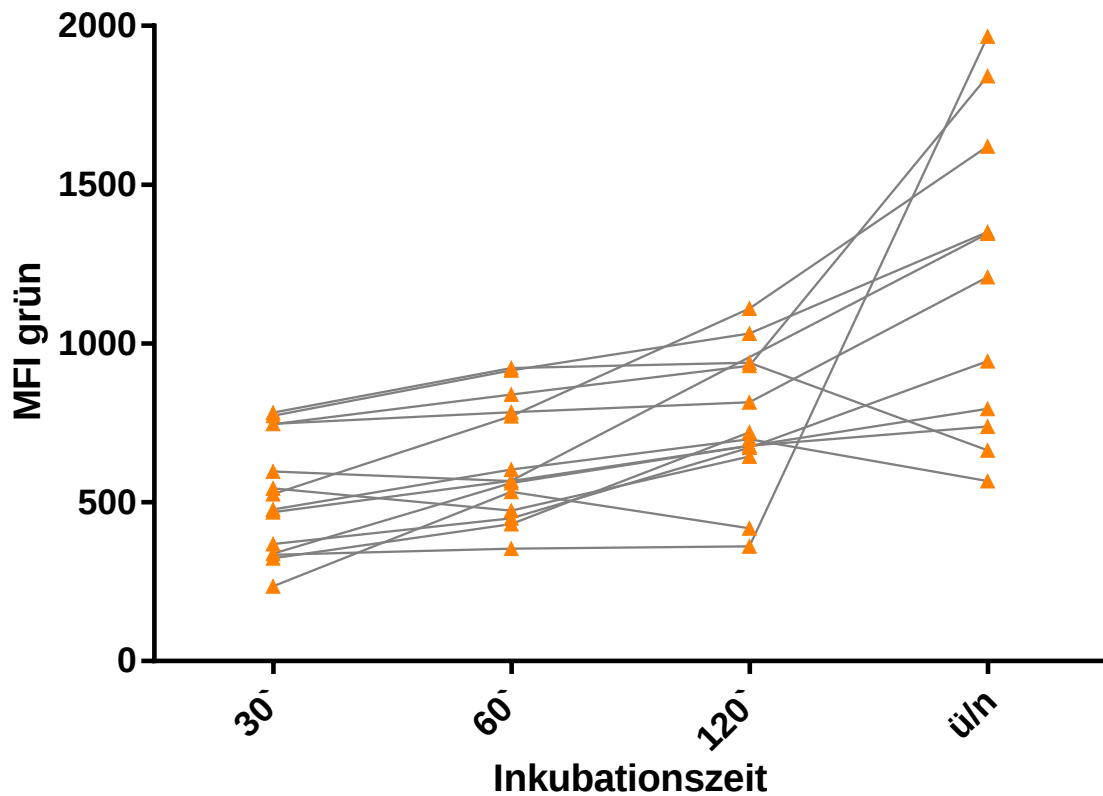


Abb. 15: Phagozytose von Patienten mit Sepsis.

Y-Achse: MFI (Mean Fluorescence Intensity) - grün von Patienten mit Sepsis (verbunden).
X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

Die Ergebnisse der Phagozytose von Patienten mit septischem Krankheitsbild werden in Abb. 15 dargestellt. Die MFI-Werte steigen hier deutlicher an und nach 120min findet sich größtenteils noch ein zusätzlicher Anstieg. Der einzelne Versuch und damit jede einzelner Patient, wurde zur Darstellung des Verlaufs in sich verbunden dargestellt.

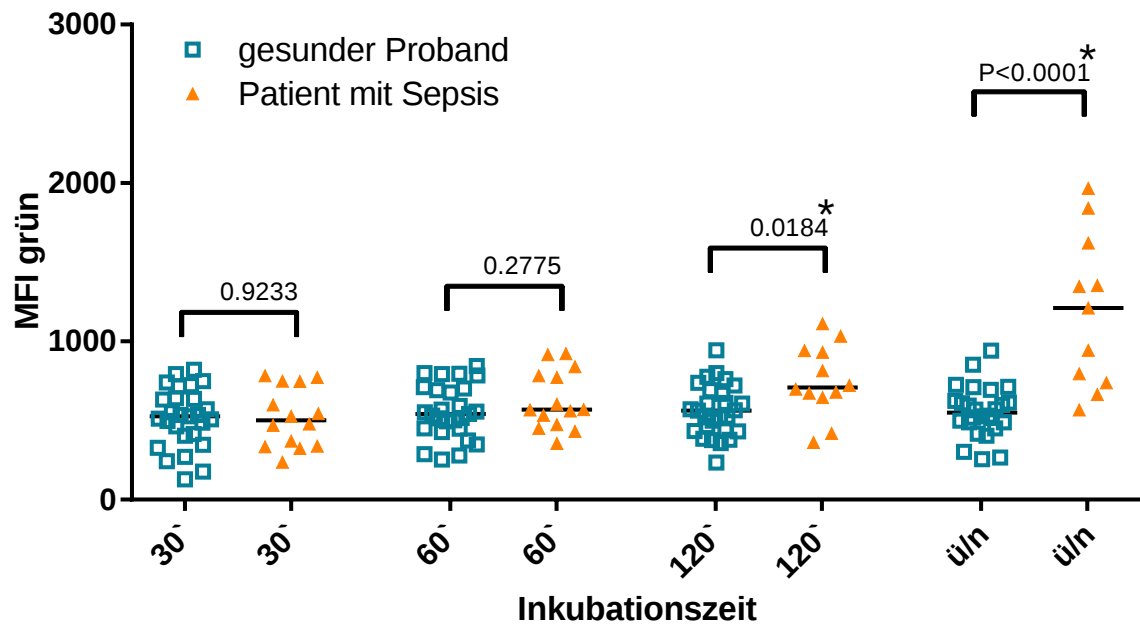


Abb. 16: Phagozytose von Probanden und Patienten im Vergleich.

Y-Achse: MFI (Mean Fluorescence Intensity) grün als Datenwolke von gesunden Probanden (blau) und Patienten in Sepsis (orange) mit Durchschnittswert. X-Achse: Inkubationszeit. Eckige Klammer: p-Wert. Bei Sternmarkierung (*) ist der Wert signifikant. Abkürzung ü/n = über Nacht.

Die Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der Phagozytoseleistung bei Granulozyten gesunder Kontrollen im direkten Vergleich zu jener von Patienten mit Sepsis.

Eingetragen sind hier über den Klammern auch die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests, die <0,05 als signifikant gelten. Die entsprechenden Werte sind mit einem Stern (*) versehen. Bei anfangs ähnlichen Werten (MFI - Median bei 30min: Probanden 526,4; Patienten 501,5) steigen die Werte der Patienten nach 60min über die Werte der gesunden Probanden an (MFI - Median bei 60min: Probanden 540,0; Patienten 567,6). Bei 120min und den Werten „über Nacht“ ergibt sich bereits ein signifikant höherer Wert bei der Patientengruppe (MFI - Median bei 120min: Probanden 563,1; Patienten 709,2); (über Nacht: Probanden 549,7; Patienten 1209,0).

3.2.4. Degradation im Vergleich von Patienten zur Kontrollgruppe

Der Vorgang des Ansäuerns der Phagosomen, bzw. der Verdauung und Phagosom-Lysosom-Fusion, konnte analog durch die Messungen roter Fluoreszenz beobachtet werden. Der *Mean*-Wert der roten Fluoreszenz ist abhängig von der Anzahl der Bakterien, die phagozytiert wurden und sinkt durch die Ansäuerung beim Vorgang der Verdauung im Lysosom.

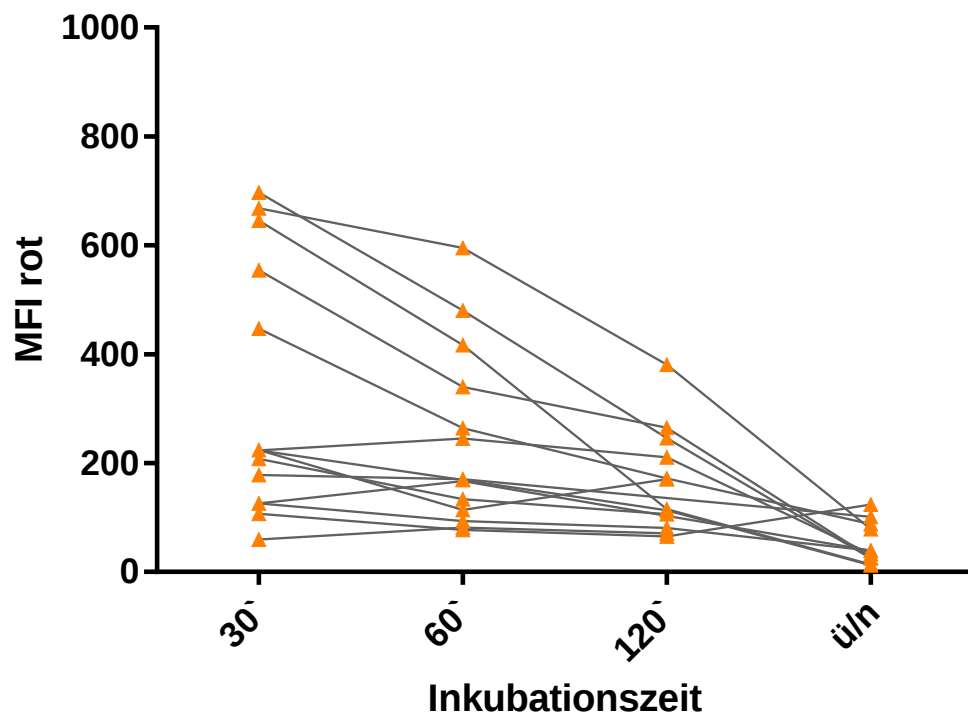


Abb. 17: Degradation bei Patienten mit Sepsis.

Y-Achse: *MFI (Mean Fluorescence Intensity)* rot bei Patienten von Sepsis (verbunden).
X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

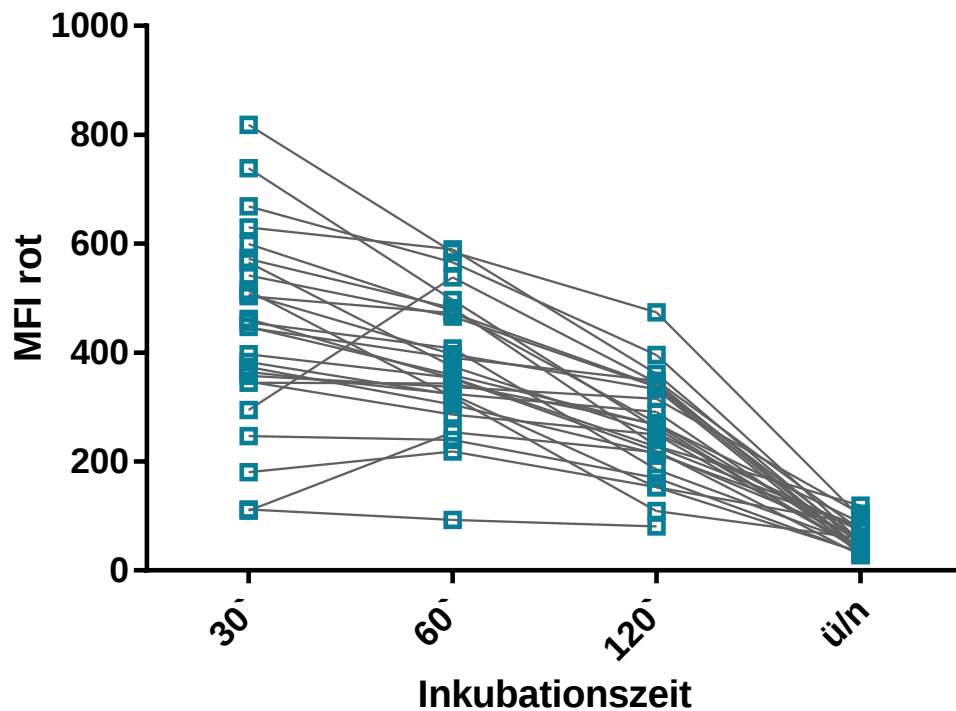


Abb. 18: Degradation bei gesunden Probanden.

Y-Achse: MFI (Mean Fluorescence Intensity) rot von Probanden (verbunden).

X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

Abb. 18 zeigt die einzelnen MFI-Werte der roten Fluoreszenz bei gesunden Probanden, während Abb. 17 die der Sepsis-Patienten zeigt. Jede Probe ist zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs während der Inkubation, verbunden. Es zeigen sich in beiden Graphen sinkende Werte der roten Fluoreszenz entsprechend dem Abbau / der Ansäuerung in Lyso-Phagosomen. Statistische Berechnungen nach dem Wilcoxon-signed-rank-test ergaben eine signifikante zentrale Tendenz.

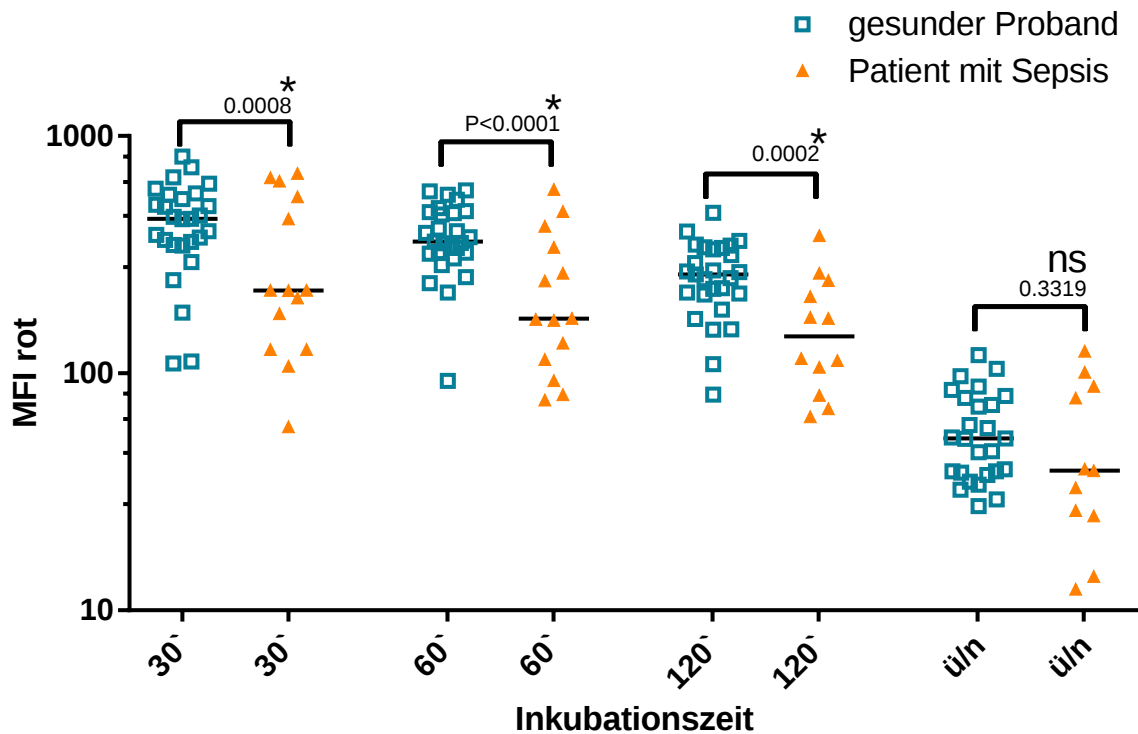


Abb. 19: Intrazellulärer Abbau im Vergleich zwischen Patienten und Probanden

Y-Achse: MFI (Mean Fluorescence Intensity) rot als Datenwolke von gesunden Probanden (blau) und Patienten in Sepsis (orange) mit Durchschnittswert. X-Achse: Inkubationszeit. Eckige Klammer: p-Wert. Bei Sternmarkierung (*) ist der Wert signifikant. Abkürzung ü/n = über Nacht. „ns“ = nicht signifikant.

Abb. 19 zeigt den absoluten Wert der roten Fluoreszenz - MFIs der gesunden Probanden im direkten Vergleich zu denen der Sepsispatienten. Nach 30min Inkubation findet sich in einer Subpopulation der Sepsispatienten eine niedrigere rote Fluoreszenz; der Median liegt bei 223,5 während bei den gesunden Probanden ein Median von 447,2 berechnet wurde.

Ebenso signifikant niedriger bleiben die Werte der Patientengruppe mit Medianen von 169,8 bei 60min und 142,9 bei 120min im Vergleich zu den Medianen der gesunden Probanden mit 358,7 bei 60min und 260,7 bei 120min.

Nicht signifikant hingegen zeigte sich der Unterschied bei den „über Nacht“ - Werten, es ergab sich ein Median von 23,94 bei den Sepsispatienten und ein Median von 53,03 bei den gesunden Probanden.

3.2.5. Degradationsfunktion als Verhältnis (grün zu rot) im Vergleich Patienten zur Kontrollgruppe

Um ein von der primären Aufnahme in die Zelle (Phagozytose selbst) unabhängigeres Bild zu gewinnen wurden die MFI-Werte ins Verhältnis zueinander gesetzt so dass nun die *ratio* rot/grün eine Darstellung der effektiven Verdauungsleistung erlaubt.

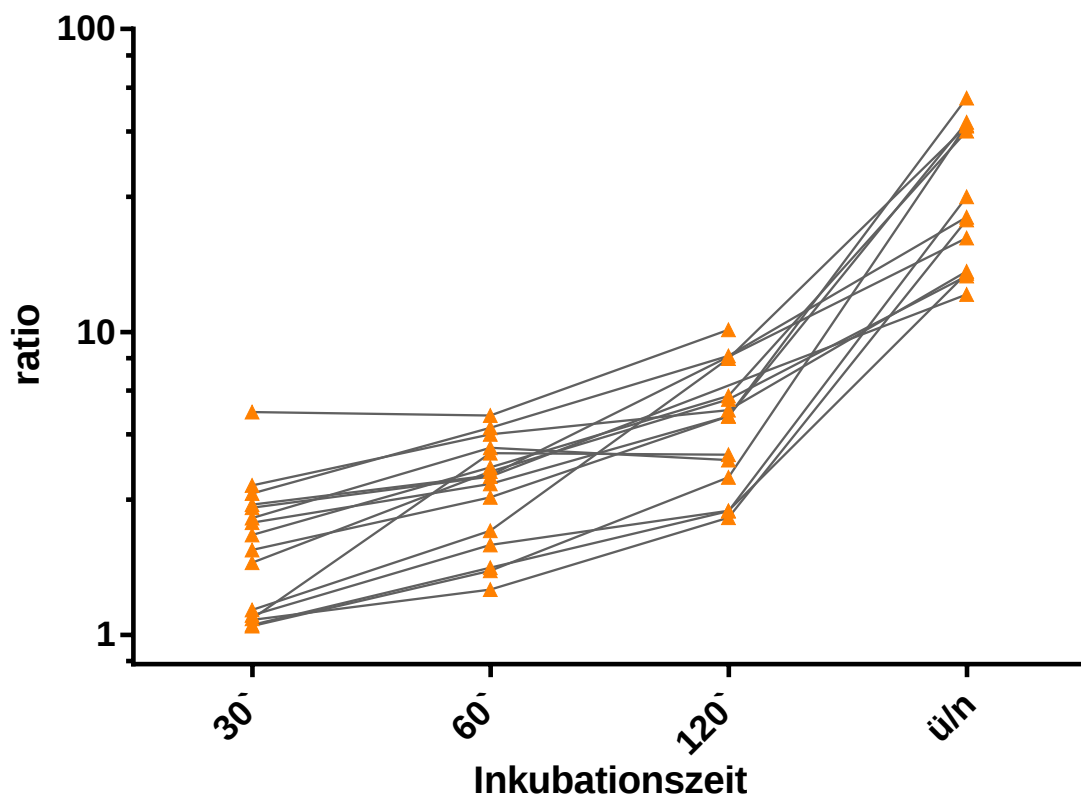


Abb. 20: Ratio (grün/rot Fluoreszenz) bei Patienten mit Sepsis.

Y-Achse (logarithmisch): MFI (Mean Fluorescence Intensity) - Verhältnis (grün zu rot) von Patienten mit Sepsis (verbunden). X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

Abb. 20 zeigt die Veränderung des Grün-Rot Verhältnisses der Fluoreszenzemission in den Granulozyten der Sepsispatienten über die Messzeitpunkte: 30min, 60min, 120min und über Nacht. Der Anteil der Grünfluoreszenz nimmt bei allen Proben kontinuierlich zu. Es lassen sich erneut 2 Gruppen bzgl. der Kinetik unterscheiden, welche als Hinweis für die effiziente Phagosomen-Lysosomen-Fusion gewertet werden kann (durch kontinuierlichen Verlust der roten Fluoreszenzemission von Eos-FP erklärbar).

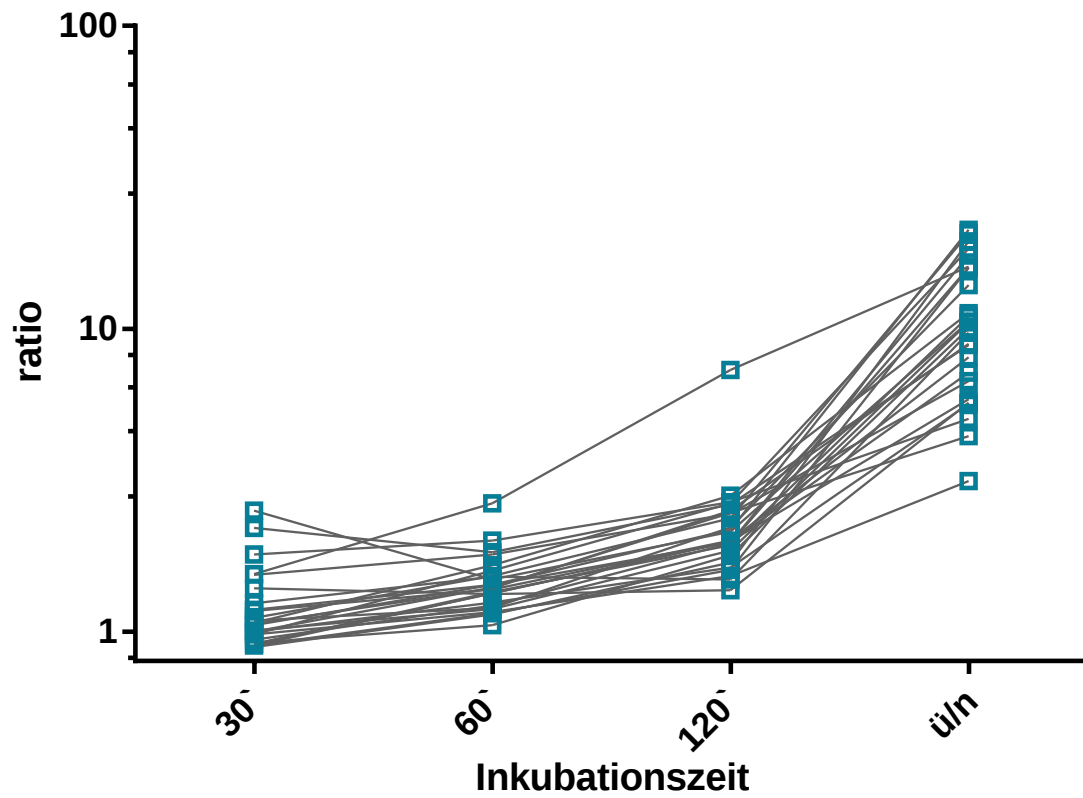


Abb. 21: *Ratio* (grün/rot Fluoreszenz) bei gesunden Probanden.

Y-Achse (logarithmisch): MFI (Mean Fluorescence Intensity) - Verhältnis (grün zu rot) von Probanden (verbunden). X-Achse: Inkubationszeit. Abkürzung ü/n = über Nacht.

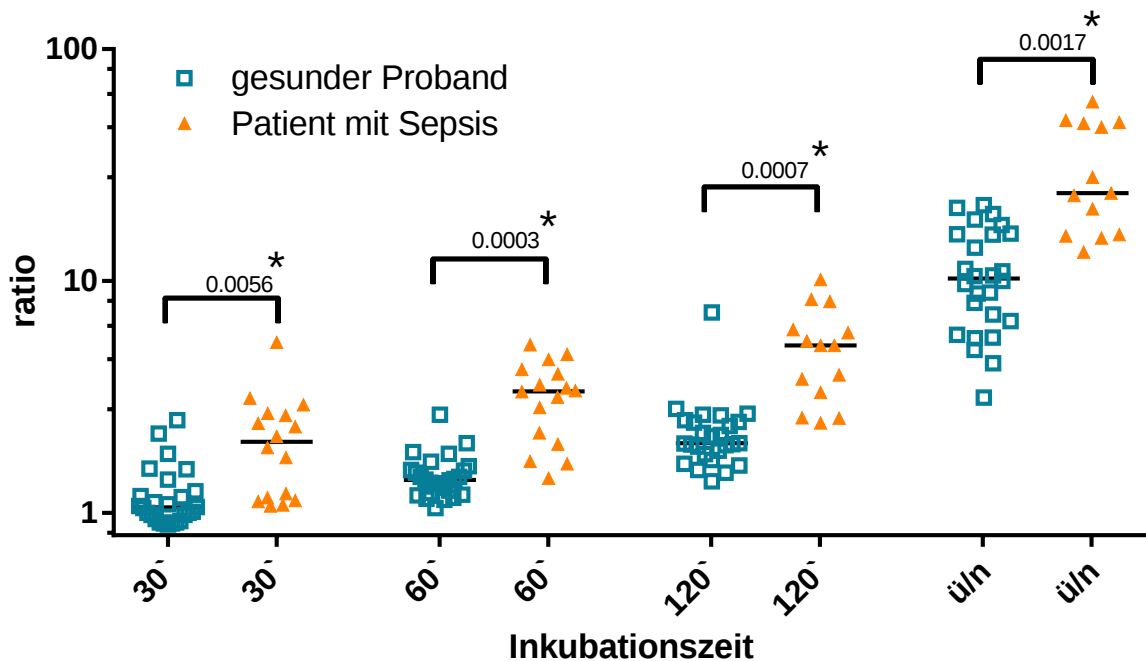


Abb. 22: Intrazellulärer Abbau bzw. *ratio* (grün/rot Fluoreszenz) im Vergleich gesunder Probanden zu Patienten mit Sepsis.

Y-Achse (logarithmisch): MFI (Mean Fluorescence Intensity) Verhältnis (grün/rot) als Datenwolke von gesunden Probanden (blau) und Patienten in Sepsis (orange) mit Durchschnittswert. X-Achse: Inkubationszeit. Eckige Klammer: p-Wert. Bei Sternmarkierung (*) ist der Wert signifikant. Abkürzung ü/n = über Nacht. „ns“ = nicht signifikant.

Abb. 22 zeigt nun das Verhältnis (grün/rot Fluoreszenz) im Vergleich von gesunden Spendern zu Patienten mit Sepsis. Der Vergleich der Mediane zeigt bei den gesunden Spendern anfangs einen geringeren Verlust von Rotfluoreszenz an, mit entsprechend geringem Median der *ratio* von 1,055 bei 30 Minuten Inkubationszeit. Dem Wert nach muss bei der Mehrzahl der Ergebnisse die rote Fluoreszenz hier noch in etwa vergleichbar sein mit der grünen Fluoreszenz, also noch kein Abbau stattgefunden haben. Währenddessen hat die *ratio* bei den Patienten bereits nach 30 Minuten einen Median von 2,025 erreicht. Über die unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte steigt nun sowohl bei den Gesunden als auch bei den Patienten der Wert an. Bei Patienten sind diese zu allen Zeitpunkten signifikant (*) - Markierung, entsprechend einem $p < 0,05$) über denen der Spender, mit einer *ratio* von 3,345 zu gesund 1,385 nach 60 Minuten; 5,270 zu gesund 1,995 nach 120min und 23,94 zu gesund 10,26 beim „über Nacht“ - Wert.

3.2.6. Phagozytose und Degradation von Granulozyten bei rhG-CSF-behandelten Patienten

In einem weiteren Ansatz versuchten wir der Entwicklung unter G-CSF-Gabe zu folgen und untersuchten jene Sepsis-Patienten nach, welche bei Neutropenie (Indikation zur Therapie) innerhalb einer Studie (s. Abschnitt 2.1.) mit 300µg rhG-CSF (*recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor*, Neupogen™) behandelt wurden. Wir führten den Phagozytose-Test demnach einmal vor G-CSF-Gabe und einmal 2 Tage danach durch. Folgende Graphen zeigen die Entwicklung der Phagozytose-Funktion nach G-CSF-Gabe.

Die Graphen in Abbildung 23 a) – e) zeigen jeweils die Entwicklung der Phagozytose-Ergebnisse von einem einzelnen Patienten nach der Gabe von rhG-CSF an. Nach G-CSF-Gabe sinkt bei 4 von 5 vor allem der späteste Wert etwa auf das Niveau der vorgängigen Ergebnisse und es findet sich konsekutiv ein etwas nivellierter Verlauf, wie dies z.B. auch bei gesunden Probanden der Fall ist (s. Abb. 14). Bei einem Patienten war in allen Werten eine Steigerung der Phagozytose-Funktion nach G-CSF-Gabe zu erkennen. Zwei Ergebnisse zum Zeitpunkt 120 min vor G-CSF-Gabe waren, technisch bedingt, nicht verwertbar.

Die Graphen Abb. 24 a) – e) zeigen die Ergebnisse der MFIs roter Fluoreszenz und damit der pH-Reduktion. Bei 16 von 20 Ergebnissen findet sich eine Reduktion der Werte, respektive Angleichung auf ein durchschnittliches Niveau eines MFI von ca. 100. Eine Ausnahme bildet Patient e) welcher bei sehr hohen Ausgangswerten um teils bis zu 1/3 des Wertes absinkt, jedoch das Niveau der anderen Patienten nicht erreicht. Zudem Patient d) welcher in den Anfangswerten leicht ansteigt.

Entsprechend findet sich bei Auswertung der Degradations-abhängigen *ratio* rot/grün in den darauffolgenden Abbildungen 25 a) - e) ebenso insgesamt eher eine Steigerung im Sinne einer möglichen Steigerung der Funktion von Degradation, bzw. des Abbaus. Durch die meist zusätzlich vermehrte Aufnahme grüner Fluoreszenz, wie vorgängig aufgezeigt, ist zudem auch in Fällen geringerer Steigerungen des Verhältnisses von einer quantitativ gesteigerten Anzahl an Degradationsvorgängen auszugehen.

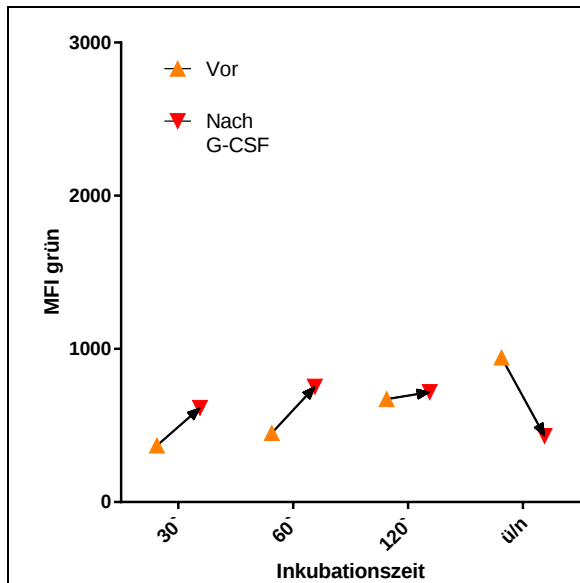


Abb. 23 a)

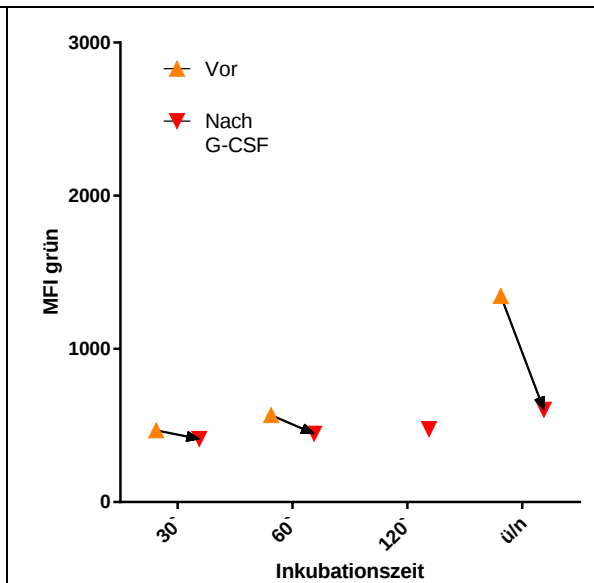


Abb. 23 b)

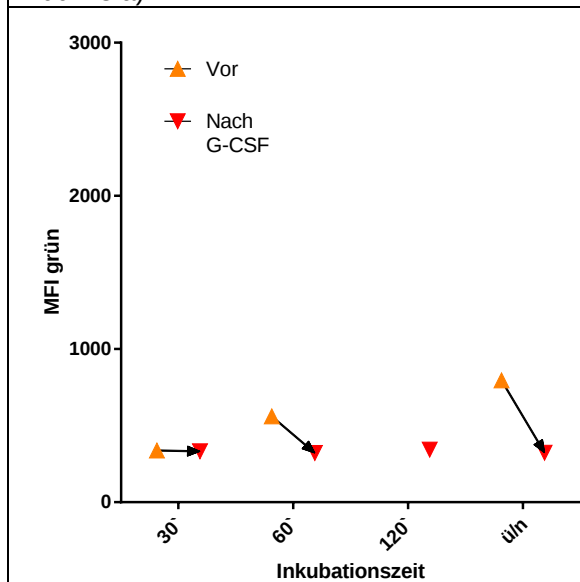


Abb. 23 c)

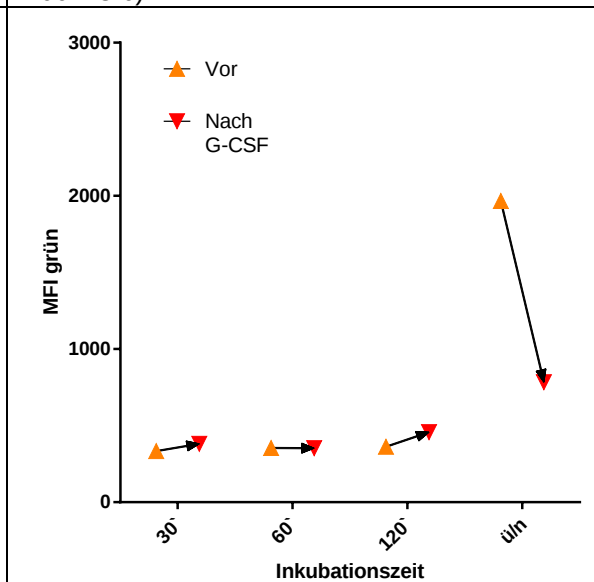


Abb. 23 d)

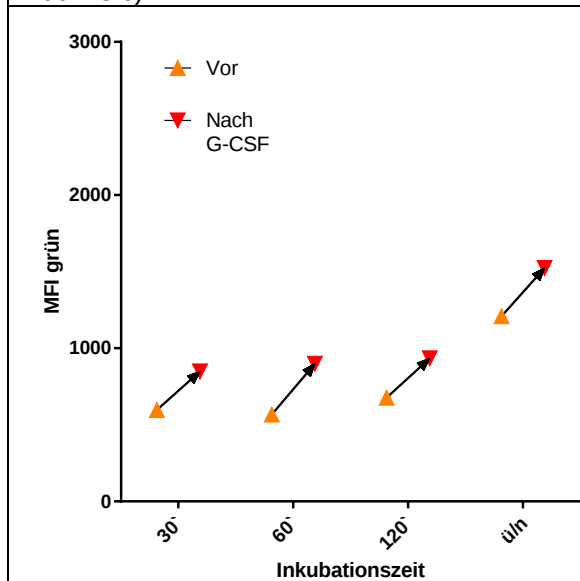
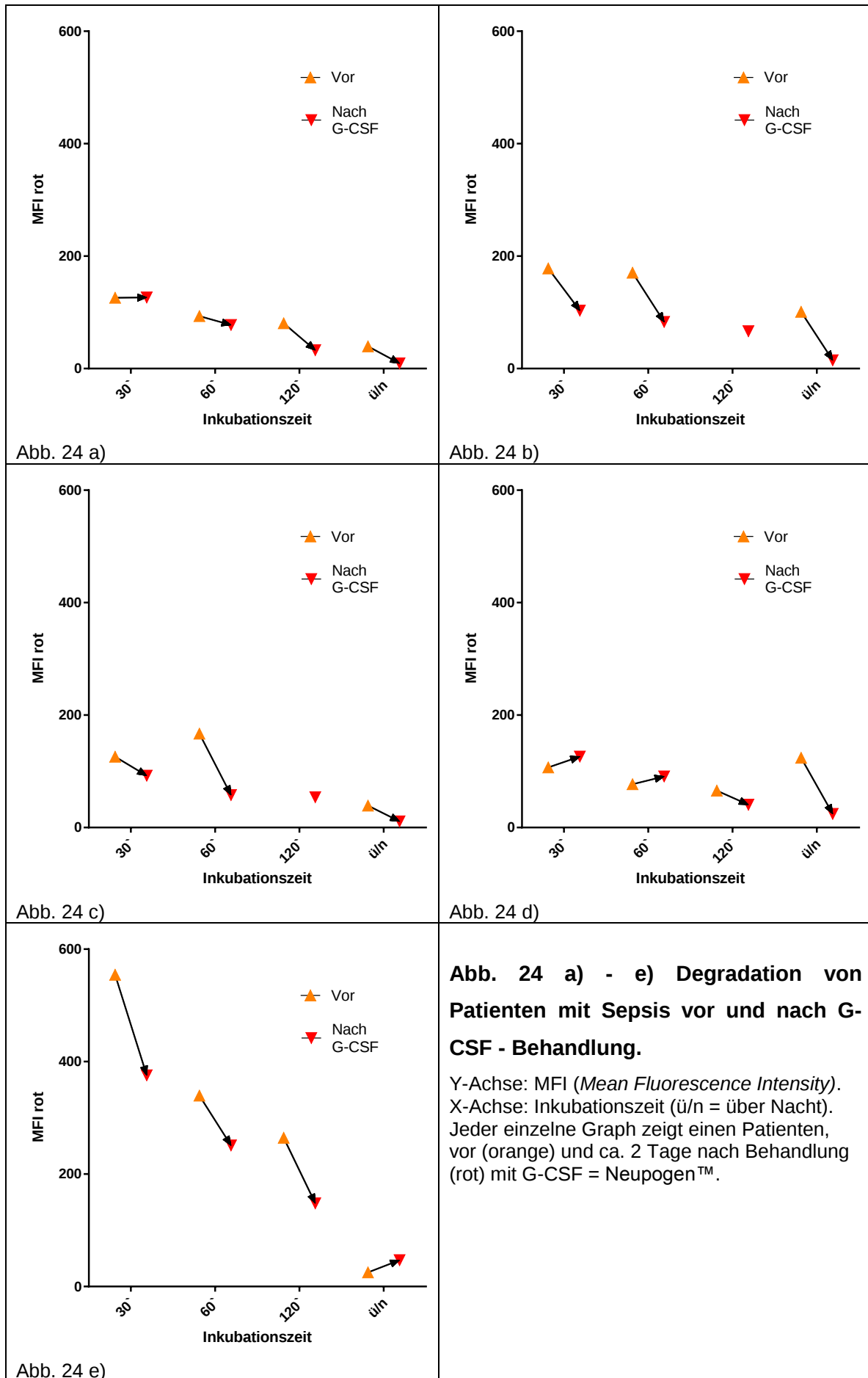


Abb. 23 e)

Abb. 23 a) - e) Phagozytose von Patienten mit Sepsis vor und nach G-CSF - Behandlung.

Y-Achse: MFI (*Mean Fluorescence Intensity*).
 X-Achse: Inkubationszeit (ü/n = über Nacht).
 Jeder einzelne Graph zeigt einen Patienten, vor (orange) und ca. 2 Tage nach Behandlung (rot) mit G-CSF = Neupogen™.



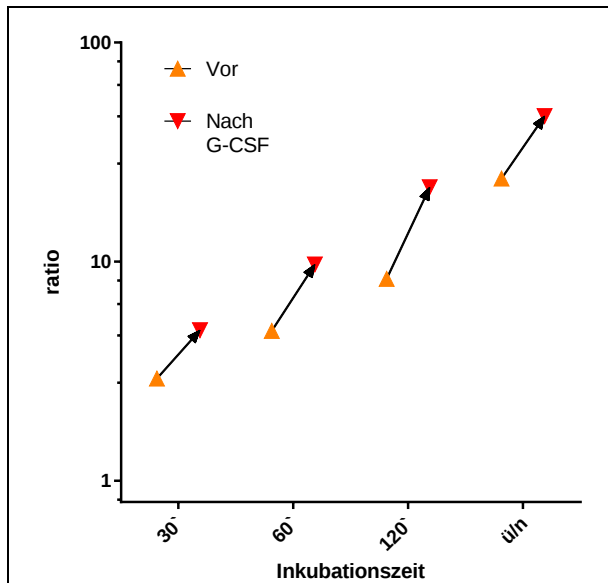


Abb. 25 a)

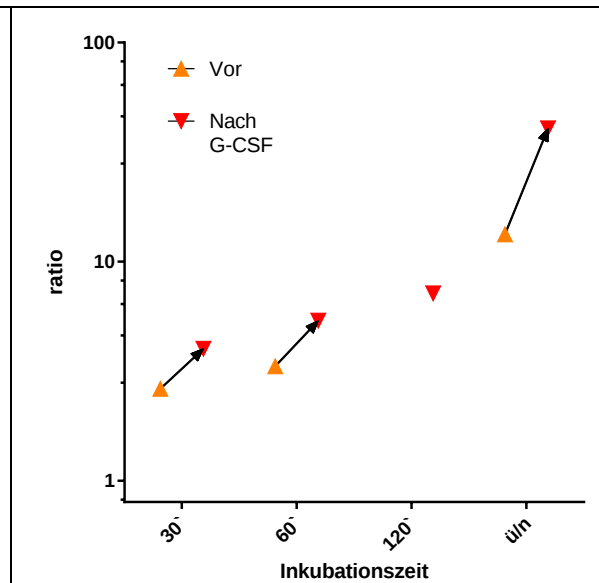


Abb. 25 b)

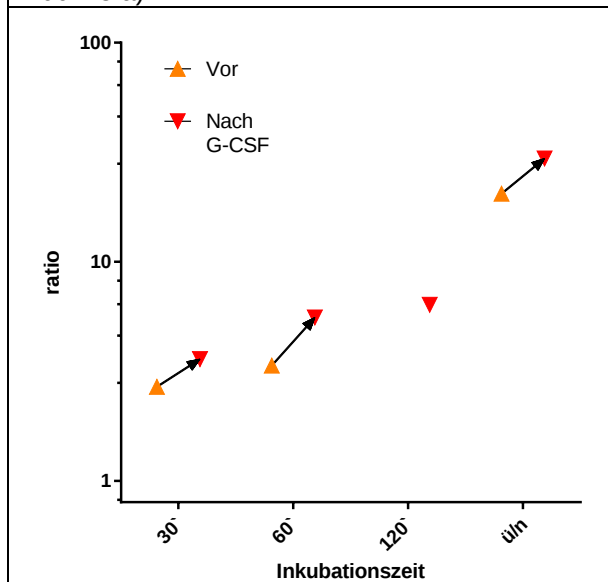


Abb. 25 c)

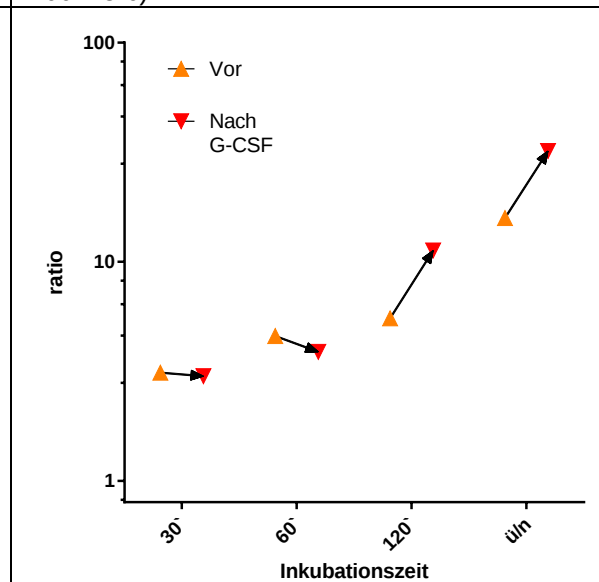


Abb. 25 d)

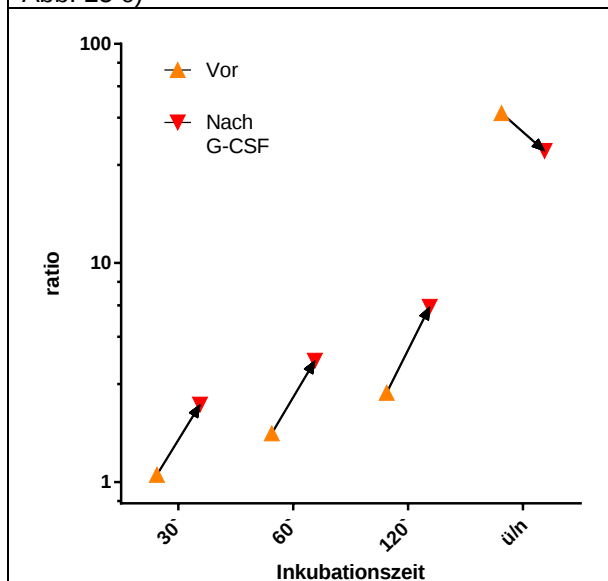


Abb. 25 e)

Abb. 25 a) - e) Ratio (grün/rot Fluoreszenz) Patienten mit Sepsis vor und nach G-CSF - Behandlung.

Y-Achse (logarithmisch): Verhältnis (grün zu rot) der MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) – Werte X-Achse: Inkubationszeit (ü/n = über Nacht).

Jeder einzelne Graph zeigt einen Patienten, vor (orange) und ca. 2 Tage nach Behandlung (rot) mit G-CSF = Neupogen™.

4. Diskussion

4.1. Grundlegende Evaluation von Material und Methodik

In dieser experimentellen Arbeit wurden Phagozytosefunktion und simultan Phagosomen-Lysosomen-Fusion von Granulozyten in Vollblutproben durch Bakterien mit pH-sensitiv fluoreszierendem Proteinen untersucht. Es wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen dass die pH-Senkung essentieller Bestandteil des intrazellulären Degradationsvorganges ist und insbesondere notwendig für die nachfolgende Immunantwort durch Antigenpräsentierung (Ip et al. 2010). Die Methode erweitert damit aktuell vorhandene Phagozytose-Assays welche üblicherweise mit FITC-gelabelten Bakterien arbeiten (Bicker et al. 2007, Gille et al. 2006, Oda 1986). Das neuartige GFP-ähnliche Fluoreszenzprotein "Eos-FP" wurde durch Transfektion von einer Koralle (*Lobophyllia hemrichii*) auf E.coli-Bakterien übertragen. Die Bestrahlung von EOS-FP mit UV-Licht generiert einen partiellen Molekül-Umbau mit pH-sensitiven roten Fluoreszenzbestandteilen (Wiedenmann et al. 2004, Wiedenmann et al. 2006, Nienhaus et al. 2006, Wiedenmann et al. 2009). Nun können die Eos-FP transfizierten E.coli Bakterien genutzt werden um:

1. Die phagozytierenden Granulozyten zu quantifizieren.
2. Die phagozytierte Bakterienmenge zu messen.
3. Die Phagosomen-Lysosomen-Fusion zeitlich und quantitativ zu erfassen.

(Schreiner et al. 2011, Dreschers et al. 2013)

Bisherige Studien beschreiben hauptsächlich die frühe (bis 60 min) Phagozytose (Lehmann et al. 2000, Danikas et al. 2008) sowie Degradation (Bicker et al. 2008). Versuchsreihen mit eigenständig fluoreszierenden Bakterien weisen jedoch teilweise erst deutlich später signifikante Differenzen von Phagozytose und Degradation auf (Schreiner et al. 2011, Haas 2013). Phagozytose sowie Degradation werden nicht nur durch Oberflächenkonfigurationen beeinflusst (Champion et al. 2006) sondern auch durch Antigene an der Zelloberfläche von Bakterien (Ip et al. 2010). Methoden mit Phagozytose-Medien wie Zymosan (Le Cabec et al. 2000) oder *latex/polystyrene beads* (Lehmann et al. 1997) können nicht sämtliche komplexe natürliche Phagozytosewege und Interaktionen nachbilden. Das Ziel sollte sein, verlässliche Daten anhand von möglichst

originären Bakterien zu generieren. In unseren Versuchen wurden E.coli K12 verwendet, es wäre jedoch auch die Transfektion anderer Bakterienstämme möglich.

Zur Bestätigung der Methodik wurde zuerst mittels konfokaler Lasermikroskopie und Spektralanalyse der Nachweis erbracht, dass solitäre Bakterien außerhalb der phagozytierenden Zelle mit einem anderen Spektrum fluoreszieren, als im Zellinneren. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie kombiniert mit digitaler Bildauswertung erlaubte dies auch in einzelnen Standardproben quantitativ zu erfassen. Mittels konfokaler Bildanalyse wurden Interferenzen von Strukturen außerhalb des Fokus sowie Streustrahlungen minimiert und 0,25 µm dicke optische Schichten zur Bildanalyse vermessen. Die intrazellulären E.coli Bakterien zeigten aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit erwartungsgemäß eine Abnahme der roten Fluoreszenz, während die extrazellulären Bakterien dieselbe Intensität von roter, wie auch grüner Fluoreszenz aufwiesen (Schreiner et al. 2011). Die Fluoreszenz innerhalb der Phagozyten ist durch intensive grün-Fluoreszenz suffizient verfolgbar. Diese kann strukturell im Verlauf allenfalls flächig auseinanderweichen, wodurch fluoreszenzmikroskopisch die quantitative Auswertbarkeit fortgeschrittener Degradationsphasen durch Partialvolumeneffekte eingeschränkt wird, jedoch nicht das Verhältnis (Rot/Grün). Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, die letztlich für die suffiziente Reihenuntersuchung verwendet wird (Lehmann et al. 2000), werden hierdurch nicht beeinflusst. Einschränkungen sind bei der Durchflusszytometrie-Methodik und dem dazugehörigen sog. "*gating*" (Identifizierung der Granulozyten über Größe und Granularität) zu sehen. Z.B. werden bei Stress oder Infekt vom Körper unreife Granulozyten in den Blutkreislauf geschwemmt (Cornbleet 2002), welche hier differente Eigenschaften aufweisen. Ein möglicher Nachteil hierbei ist ein "*shift*" aus dem üblichen "*gate*" durch veränderte Streulichteigenschaften (Ziegler-Heitbrock 2000), wie dies auch durch stattgehabte Phagozytose passieren kann (Rothe et al. 1988). Dass reife Granulozyten aber auch eine andere Phagozytoseaktivität als unreife Granulozyten besitzen, ist bekannt (Taneja et al. 2008) und findet sich in unseren Ergebnissen wieder. Des Weiteren wird durch Phagozytose teilweise Apoptose induziert (Dreschers et al. 2013). Apoptotische Zellen wurden im "*gate*" nicht erfasst. Vermeiden ließe sich diese Einschränkung

durch zusätzliche Oberflächenmarker (Bicker et al. 2008) oder Messungen mit einem geringerem Vorwärtsscatte.

Ein Merkmal vieler Phagozytose-Assays ist, dass lediglich ein einziger Messzeitpunkt verwendet wird (Lehmann et al. 2000, Liu et al. 2000, Rodríguez et al. 2001) ohne die Kinetik des Vorgangs abzubilden. Wie sich in unseren Ergebnissen zeigte und bereits vorbeschrieben ist (Nuutila et al. 2005), sind die Ergebnisse stark von der Inkubationszeit abhängig (Schreiner et al. 2011, Haas 2013). Bisherige Untersuchungen waren häufig (teils auch methodisch bedingt) auf kurze Inkubationszeiten beschränkt (Wenisch et al. 1999). Unserer Daten zeigen, dass die Phagozytose jedoch erst zwischen 60 - 120 Minuten signifikant über die Werte gesunder Probanden ansteigt (Schreiner et al. 2011). Messzeitpunkte sollten daher verteilt werden, wie z.B. auf 30 min, 60 min, 120 min und 24 Stunden.

4.2. Gleichzeitige Messung von Phagozytose und Abbau in einem zu standardisierenden Verfahren

Duale Emission unterschiedlicher Wellenlängen und zusätzliche spezifische pH-Abhängigkeit macht Eos-FP zu einer effizienten Färbemethode für die Phagozytose. Die Intensität grüner Fluoreszenz korreliert mit der Menge phagozytierter Bakterien. Das Verhältnis roter Fluoreszenz zur grünen Fluoreszenz korreliert über den Nachweis eines pH-reduzierten Milieus mit dem Anteil der Bakterienmenge im Lysosomen-Phagosomen-Degradationskomplex. Quantitativer Verlust grüner Fluoreszenz zeigt ggf. den vollständigen Proteinabbau an, welcher i.R. hoher Proteinstabilität jedoch erst sehr spät vonstattengeht wird (Wiedenmann et al. 2009). Im vorliegenden Essay werden die Fluoreszenzen einzeln, sowie das Verhältnis zueinander erfasst.

Die zu untersuchenden Zellpopulationen können sowohl durch Scatter-Analyse als auch durch Oberflächenmarkierungen mit Antikörpern aufgeteilt werden, da handelsübliche Fluoreszenz-Antikörper (wie perCP) nicht mit dem Fluoreszenzspektrum von Eos-FP überlagern. Das *Gating* erfolgte durch die etablierte "*scatter-analysis*". Für den Versuchsansatz wurden fixierte und vollständig dispersierte Bakterien verwendet, welche entsprechend vorbereitet in

bereits befüllten TruCulture™ Spritzen gekühlt auch für längere Zeit aufbewahrt werden konnten. Wie bei Canonico et al., fanden sich auch in unseren Kontrollen keine Unterschiede bei Verwendung zellfixierender Lösung (Cellfix™) und Lagerung für 1-2 Tage vor der Durchflusszytometrie (Canonico et al. 2004). Insgesamt ist dadurch der Assay einfach und stabil anwendbar, auch für Multicenter - Studien. Zukünftig kann das Eos-FP Protein zudem auch dazu dienen, andere Bakterienarten zu markieren. Besonders von Interesse ist dies in Bezug auf Bakterien mit möglicher Beeinflussung der Phago-Lysosomen-Funktion (Hines et al. 1999, Gorvel et al. 2002, Makino et al. 2007). Auch die Beobachtung der Antigenpräsentation und der hierfür notwendigen Prozessierung von Proteinen in den dafür spezialisierten Zellen ist mit einer ausführlicheren Analyse, z.B. durch GFP-abgeleitete Proteine, möglich (Wiedenmann et al. 2009). Eine Schwierigkeit im Versuchsablauf ergab sich durch die hohe Fragilität der Granulozyten nach dem Phagozytoseprozess, so dass anfangs einzelne Ergebnisse nicht auswertbar waren. Nach der Generierung angepasster Standardprotokolle ergab sich jedoch eine effiziente Anwendung und Messbarkeit.

4.3. Evaluierung der Funktion von Phagozytose und Degradation in Granulozyten bei Patienten mit Sepsis

In vorgängigen Studien zur Phagozytose bei Sepsis zeigte sich eine Reduzierung der Phagozytose - Rate (Danikas et al. 2008, Bicker et al. 2007, Hirsh et al. 2001). Unsere Ergebnisse widersprechen auf den ersten Blick der aktuellen Datenlage. Bei keinem der Patienten mit Sepsis fand sich ein signifikantes Defizit der Granulozyten zur Phagozytose und dem Abbau von Eos-FP E.coli-Bakterien. Es fand sich sogar eine signifikant höhere Phagozytoserate nach 120 Minuten, sowie erhöhte Phagosomen-Lysosomen-Fusionsrate (zu jedem Messzeitpunkt).

Es existieren bekanntermaßen unterschiedliche Wege die Phagozytose zu initiieren, u.a. durch vorgängige Opsonisierung. Alternative Wege sind z.B. bei E.coli-Bakterien der für die Immunantwort immer wieder als entscheidend hervorgehobene TLR4-Rezeptor (Ofek et al. 1995, Kawai et al. 2010, Alves-Filho 2006). Standard-Phagozytose-Tests verwenden teilweise bereits opsonisierte Bakterien, so dass kurze Inkubationszeiten verwendet werden können (Danikas et

al. 2008). Der nicht-opsonisierende Phagozytoseweg wird dabei in den Ergebnisdiskussionen, trotz seiner immer wieder hervorgehobenen Wichtigkeit insbesondere auch in Hinblick auf die Sepsis (Kawai et al. 2010) häufig vernachlässigt. Auch die Phagozytose von Zymosan-Partikel und *antigen-coated latex beads* (Hirsh et al. 2001, Lehmann et al. 1997, Lehmann et al. 2000) läuft vornehmlich Opsonin-abhängig. Hinzu kommt, dass nahezu sämtliche Studien sehr kurze Inkubationszeiten aufweisen (meist im Bereich von 10-20 min) (Bicker et al. 2007, Danikas et al. 2008, Hirsh et al. 2001, McCloskey et al. 2000, Rodriguez et al. 2001). Da die nicht-opsonin-abhängige Phagozytose erst später einsetzt (Lehmann et al. 2000) wird somit hierdurch zusätzlicher Fokus auf die opsonisierende Phagozytose gelegt.

Bei Betrachtung der Verlaufsdarstellung von unserem Patientengut sowie der Probanden fällt auf, dass die Probanden eine eher konstante Phagozytose aufwiesen, während diese bei Patienten nach 60-120 min kontinuierlich, nahezu exponentiell, ansteigt. Ausgehend von der Annahme dass der Opsonin-unabhängige Phagozytoseweg bei gesunden Probanden primär keine wesentliche Rolle spielt, bei Patienten in Sepsis jedoch bereits aktiviert ist und nach 60-120 min einsetzt, wäre hierin der Hauptunterschied der differentiellen Phagozytosewerte begründet. Zum definitiven Nachweis dieser These könnte der Versuchsansatz angepasst, z.B. mit Serumersatz durch Complement - inaktiviertes Hypogammaglobulinämie - Serum, durchgeführt werden.

Im Umkehrschluss hätte dies zur Folge, dass für eine Untersuchung der für das Immunsystem essentiellen TLR-abhängigen Phagozytose bei Sepsis, Assays mit Bakterien (bei hohem Bakterien zu Zell - Verhältnis) ohne Oberflächenmarkierung und mit späten Inkubationszeitpunkten verwendet werden sollten.

Für die Zugabe von Bakterien in gesättigter Konzentration, unter welcher der Nicht-Opsonin-abhängige Phagozytoseweg deutlicher zu Tragen kommt (Lehmann et al. 2000), wurde in Kauf genommen, dass während der gesamten Inkubationszeit immer wieder neu Bakterien in den Phagozytosevorgang eintreten konnten. Der homogene Abfall des Verhältnis von roter und grüner Fluoreszenz in den Scatter-Dot-Plots (Abb. 7) zeigte die minimale Zahl verbleibender Granulozyten mit einem 1:1 - Verhältnis der Fluoreszenzen nach 24h (verbleibende 45°-Diagonale Abb. 7d). Diese weist den Anteil der neu phagozytierten Bakterien nach. Um diese Ergebnisbeeinträchtigung zu verhindern,

könnten die Zellen nach der initialen Inkubationszeit von überschüssigen Bakterien gereinigt werden (z.B. mit mehreren Wasch-Vorgängen). Dieser Vorgang birgt jedoch auch die Gefahr zusätzlicher Zelldenaturierung.

Es fand sich eine gewisse Aufspaltung der Ergebnisse im Sinne möglicher Untergruppierungen innerhalb der Sepsis-Patienten, insbesondere nach langen Inkubationszeiten. Zur weiteren Identifizierung dieser Untergruppen wurden klinische Daten herangezogen: Alter, Geschlecht, MELD-Score, SOFA-Score, SAPS 2 - Score, TISS 10, TISS 28, CPIS, Tumoranamnese, Komorbiditäten, Mortalität während des Intensivaufenthaltes, Diabetes und Steroidgabe. Eine klare Korrelation ließ sich hierbei nicht nachweisen, wenngleich bei positiver Tumoranamnese und höherem Alter die intrazelluläre Phagosomen-Lysosomen-Fusion insgesamt tendenziell (nicht signifikant) schneller voranzuschreiten scheint. Durch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen ließen sich hier möglicherweise signifikante Werte erzielen.

Die Steuerung der Phagozytose-Aktivität erfolgt letztlich auch durch eine Anzahl von Wachstumsfaktoren, welche in der Umgebung einer Entzündungsreaktion produziert werden. Denkbar wären auch differenzierte Beeinflussungen durch die komplexen Zytokin-Konzentrationen bei SIRS, MARS und CARS (Kox et al. 2000, Osuchowski et al. 2006). Eine zusätzliche angepasste Anwendung unseres Versuchsansatzes mit Testserie unter Zugabe unterschiedlicher Zytokinen könnte hier Aufschluss geben.

Insgesamt geben vorliegende Resultate der zugleich erfassten Phagosomen-Lysosomen-Fusion keinen Hinweis darauf, dass ein unvollständiger Abbau der Bakterien in den Granulozyten für die Verbreitung der Bakteriämie innerhalb des Körpers bei Patienten mit Sepsis verantwortlich ist (Kim 2008). In unserem Versuch wurden jedoch abgetötete Bakterien verwendet, wodurch sich hier eine gewisse eingeschränkte Aussagekraft ergibt im Gegensatz zu oberflächenmarkierten Ansätzen mit lebenden Bakterien (Bicker et al. 2007, Maselli et al. 2002). Es wurde berichtet, dass lebende Bakterien über eine in das Cytosol diffundierende RNA eher zu einer Oberflächenantigenpräsentation führen als abgetötete Bakterien (Underhill et al. 2012). Diese RNA-Diffusion scheint als

Signal zu wirken und einen etwas differenten weiteren Degradationsprozess zu initiieren (Sander et al. 2011). Da unser Versuchsansatz unter höherem Ressourcenaufwand auch mit lebenden Bakterien möglich ist, gibt es hier möglicherweise anhand der Eos-FP E.coli Bakterien ein weiteres Feld der Untersuchungsmöglichkeit (Vergleichsstudien lebender zu abgetöteter Bakterien). Bekannt ist, dass unterschiedliche Bakterienstämme auf verschiedene Art und Weise die Phagozytosefunktion beeinflussen können und das Schicksal der Neutrophilen zu sowohl Nekrose, als auch Apoptose führen könnten (Matsuda et al. 1999). Die hier vorgestellten Resultate stellen aktuell eher eine Bestätigung dar, für die ursprüngliche Auffassung, dass Granulozyten von Patienten mit Sepsis eine erhöhte funktionelle Kapazität besitzen (Rothe et al. 1990, Rothe et al. 1992, Martins et al. 2003) und zudem weniger schnell Apoptose auslösen (Weiss et al. 2003a, Marshall et al. 2007). Weiterführende Analysen und Testserien werden jedoch benötigt, dies auch für lebende Bakterien zu bestätigen.

4.4. Fallstudien zur Wirkung von rhG-CSF auf die Funktion von Phagozytose und Lysosomen in Granulozyten

In ersten Einzelfallstudien wurde nachgewiesen, dass der mit unserer Arbeit etablierte Versuchsansatz als Vollblut-Untersuchungsmethode zur Beobachtung des Effekts von Wachstumsfaktoren wie rhG-CSF genutzt werden kann. Die Ergebnisse der Einzelfall - Untersuchungen nach G-CSF-Behandlung lassen erste Spekulationen zu, unter anderem dass z.B. nicht alle Patienten gleich reagieren. Unterschiedliches Ansprechen der Patienten auf rhG-CSF wurde auch bereits in früheren Studien beschrieben (Weiss et al. 2003b). Die Granulozyten in unserem Versuch zeigten nach der rhG-CSF Infusion eher eine erhöhte Degradationsrate/Phagosomen-Lysosomen-Fusion (3 von 5 Patienten). Zu den bereits erwähnten Punkten ergaben sich Hinweise darauf, dass nach der in-vivo-Applikation von rhG-CSF nicht nur die Degradation, sondern auch die Phagozytose - Rate zu den frühen Messzeitpunkten gesteigert wurde. Beides korreliert zu vorgängigen Studien mit endogenem (Barth et al. 2002) sowie exogenem (Gerber et al. 2000) G-CSF. Gleichzeitig stellten wir jedoch fest, dass

die hohen Werte nach 24h tendenziell eher sanken (4 von 5 Patienten). G-CSF verursacht bekanntermaßen die Freisetzung unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark. Da diese noch nicht im Sinne der Immunsystemaktivierung vorgebahnt sind, ist es nicht überraschend, dass sich die Phagozytosewerte tendenziell jener von Gesunden (konstantes Niveau), bzw. damit möglicherweise der opsonin-abhängigen Phagozytose anpassen (siehe Diskussion in Punkt 4.1.). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Taneja et al., bei denen reife neutrophile Granulozyten bei Sepsispatienten verglichen mit unreifen Vorläuferzellen und reifen neutrophilen Granulozyten von gesunden Probanden signifikant erhöhte Phagozytosewerte aufwiesen (Taneja et al. 2008). Eine Beeinflussung ist jedoch auch über Rezeptoren denkbar, insbesondere CD64 und TLR. Beweiskräftigere Ergebnisse waren nicht zu erwarten von einer Einzelfallstudie. Antiseptische Therapien sind jedoch meist insgesamt noch eher neu und kostenintensiv. Hier ergibt sich die Möglichkeit, sowohl einfache und kostengünstige Therapie-Überwachungsmethode zu etablieren, als auch weitere Daten zu Studienzwecken zu generieren.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende experimentelle Arbeit stellt einen neuartigen Assay zur simultanen Beurteilung von Phagozytoseleistung und Degradation (intrazellulärer Abbau) vor. Hierfür wurden fluoreszierende „EosFP-E.coli.“ -Bakterien verwendet, Escherichia coli – Bakterien welche mit dem Fluoreszenz-Protein („EosFP“) einer Koralle (Lobophyllia hemrichi) transfiziert worden sind. Dieser Fluoreszenzfarbstoff konvertiert durch Foto-Stimulation von einem grünen zu einem stark pH-abhängigen (<pH4) roten Farbstoff und kann damit die für intrazellulären Abbau hauptverantwortliche Fusion von Phagosom und Lysosom nachweisen. Der grüne Farbstoff selbst ist auch bei niedrigen pH-Werten stabil. Die Fluoreszenzbereiche sind denen etablierter Antikörpermarkierungen sehr ähnlich und lassen sich daher mit einer Anregungswellenlänge von 490nm und Emissionswellenlängensfiltern um 530nm und 570nm messen. Im Eos-FP E. coli-Phagozytostest können folgende Parameter dokumentiert werden:

1. Phagozytoseleistung durch Anstieg der Grünfluoreszenz über die Zeit.
2. Abbauleistung durch Abnahme der Rotfluoreszenz über die Zeit.
3. Verhältnis von Grün-zu-Rotfluoreszenz über die Beziehung zwischen Phagozytoseleistung und Abbau.

Die hier dokumentierten Ergebnisse zeigen für folgende Patientengruppen die in der nachstehenden Tabelle zusammengefassten Ergebnisse:

Tabelle 4: Zusammenfassung.

Testpopulation	Phagozytoseleistung	Abbauleistung	Ratio
Kontrollen	288,8	547,7	4,0
Sepsis	779,6	228,0	10,4
Septischer Schock	779,9	156,5	8,1
G-CSF-Behandlung	727,2	105,2	12,8

Vollblutproben wurden dazu mit den simultan rot und grün fluoreszierenden Bakterien inkubiert, so dass Zellen des Immunsystems diese phagozytieren konnten. Die Fluoreszenzintensität ist damit über die Zeit ein Maß für die

Phagozytoseleistung pro Zelle (1). Die pH-Veränderungen mit konsekutivem Verlust der roten Fluoreszenz ermöglicht den Nachweis der Phagosomen-Lysosomen-Fusion und ist ein Maß für die Abbauleistung über die Zeit (2). Die Ratio von Grün zu Rot gibt einen Anhalt für das Verhältnis von Phagozytose zu Abbau. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Kontrollen und septischen bzw. Patienten im septischen Schock besteht darin, dass die Grünfluoreszenz über alle gemessene Zeitpunkte bei den Kontrollen deutlich weniger ansteigen als bei den Patienten. Das bedeutet, dass die Probanden in der Geschwindigkeit der Phagozytose reduziert sind, aber die Gesamtphagozytoseleistung bei allen Schockpatienten und bei etwa der Hälfte der Sepsispatienten deutlich stimuliert ist. Das könnte mit einer Ausreifung der meistens linksverschobenen Granulozytenpopulation bei Sepsis erklärt werden.

Die aktivierten Granulozyten von Patienten mit Sepsis weisen nach einer anfänglichen Verzögerung eine höhere Phagozytose - Aktivität auf, als gesunde Probanden. Zugleich konnten wir nun indirekt über die pH-Senkung den Eintritt in den Phagosomen-Lysosomen-Degradationskomplex messen. Dieser war zu jedem Inkubationszeitpunkt bei Patienten mit Sepsis signifikant höher, als bei gesunden Probanden. Die Daten zeigen demnach, dass Granulozyten von Patienten mit Sepsis schneller die phagozytierten Bakterien intrazellulär abbauen als gesunde Probanden. Aktuelle Studien über Phagozytose weisen gegenteilige Ergebnisse auf, unterscheiden sich jedoch deutlich von der Methodik (Inkubationszeit, Konzentration und Art des "target" sowie damit verbundenem Phagozytoseweg).

In ergänzenden Einzelfall-Untersuchungen wurde die Wirkung von rhG-CSF (*recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor*) auf Patienten mit Neutropenie und Sepsis anhand derselben Methodik ausgewertet. Die Veränderungen hierbei korrelieren mit einer Angleichung an die Ergebnisse gesunder Probanden. Der neuartige Assay ließ sich demnach auch als Verfahren erstmals standardisiert anwenden. Es bedarf jedoch noch einer Bestätigung durch größere Fallzahlen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual Review of Immunology, 17: 593-623 (1999)
2. Aikawa N: Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 97: 771-777 (1996)
3. Alves-Filho J C, Tavares-Murta B M, Barja-Fidalgo C, Benjamim C F, Basile-Filho A, Arraes S M, Cunha F Q: Neutrophil function in severe sepsis. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, 6: 151-158 (2006)
4. Angus D, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. New England Journal of Medicine, 369: 840-851 (2013)
5. Barth E, Fischer G, Schneider E M, Moldawer L L, Georgieff M, Weiss M: Peaks of endogenous G-CSF serum concentrations are followed by an increase in respiratory burst activity of granulocytes in patients with septic shock. Cytokine, 17: 275-284 (2002)
6. BD Bioscience: , Fluoreszenzspektren von FITC-, PE- und PerCP-Antikörpermarkierungen. Available: http://www.bdbiosciences.com/external_files/media/spectrumviewer/index.jsp [23.02.2010]
7. Bicker H, Hoflich C, Wolk K, Vogt K, Volk H D, Sabat R: A simple assay to measure phagocytosis of live bacteria. Clin.Chem., 54: 911-915 (2008)
8. Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J, ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. Chest, 136: e28 (2009)
9. Borregaard N: Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity, 33(5):657-670 (2010)
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss D S, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 303: 1532-1535 (2004)
11. Brinkmann V, Zychlinsky A: Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nature Reviews Microbiology, 5: 577-582 (2007)
12. Cabrini M, Nahmod K, Geffner J: New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. Current Opinion in Hematology, 17: 31-35 (2010)

13. Canonico B, Zamai L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, Felici C, Falcieri E, Reilly J T, Barnett D, Papa S: Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Journal of immunological methods*, 295: 67-78 (2004)
14. Champion J A, Mitragotri S: Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 4930-4934 (2006)
15. Cornbleet P J: Clinical utility of the band count. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22: 101-136 (2002)
16. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA, Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clinical & Experimental Immunology*, 154: 87-97 (2008)
17. DeCoursey T E: Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiology (Bethesda)*, 25: 27-40 (2010)
18. Dinarello C A: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112: 321S-329S (1997)
19. Dreschers S, Gille C, Haas M, Grosse-Ophoff J, Schneider M, Leiber A, Bühring H, Orlikowsky T: Infection-induced Bystander-Apoptosis of Monocytes Is TNF-alpha-mediated. *PLoS ONE* 8: e53589 (2013)
20. Engel C, Brunkhorst F M, Bone H G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*, 33: 606-618 (2007)
21. Ethuin F, Chollet-Martin S, Jacob L: A new role for neutrophils during sepsis: target and source of interleukin-12. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 23: 132-137 (2004)
22. Gasque P: Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology*, 41: 1089-1098 (2004)
23. Gerber A, Struy H, Weiss G, Lippert H, Ansorge S, Schulz H U: Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo neutrophil functions in nonneutropenic surgical intensive care patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 20: 1083-1090 (2000)
24. Gille C, Spring B, Tewes L, Poets C F, Orlikowsky T: A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytometry Part A*, 69: 152-154 (2006)

25. Gorvel J P, Moreno E: Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90: 281-297 (2002)
26. Haas M: Apoptose neonataler und adulter Monozyten im Infektionsmodell mit *Escherichia coli*: Die Rolle des TNF-alpha Signalwegs. Med Dissertationsschrift, Technische Hochschule Aachen (2013)
27. Hines M E, 2nd, Baldwin C A, Styer E L, Hullinger G A, Cole J R, Jr: Effects of macrophage inhibitory factor-A3 (MIF-A3) on cytokine secretion and phagolysosome fusion in murine macrophages. *Veterinary Microbiology*, 65: 47-60 (1999)
28. Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, and Krausz M M: Overexpression of the high-affinity Fc gamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock*, 16: 102-108 (2001)
29. Hotchkiss R S, Karl I E: The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 348: 138-150 (2003)
30. Ip W K, Sokolovska A, Charriere G M, Boyer L, Dejardin S, Cappillino M P, Yantosca L M, Takahashi K, Moore K J, Lacy-Hulbert A, Stuart L M: Phagocytosis and phagosome acidification are required for pathogen processing and MyD88-dependent responses to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, 184:7071-7081 (2010)
31. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11: 373-384 (2010)
32. Kim K S: Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 625-634 (2008)
33. Kox W J, Volk T, Kox S N, Volk H D: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 26: 124-128 (2000)
34. Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I: Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infection and immunity*, 68: 4736-4745 (2000)
35. Lehmann A K, Halstensen A, Holst J, Bassøe C F: Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis. *Journal of immunological methods*, 200: 55-68 (1997)
36. Lehmann A K, Sørnes S, Halstensen A: Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 243: 229-242 (2000)
37. Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J L, Ramsay G, International Sepsis Definitions Conference: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine*, 29: 530-538 (2003)

38. Liu Q, Suzuki K, Kudo S, Yamada M, Kowatari K, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K: Effect of decaglycerol monooleate on phagocytosis and respiratory burst activity of human neutrophils: an in vitro study. *Food and chemical toxicology*, 38, 423-428 (2000)
39. Makino M, Maeda Y, Fukutomi Y, Mukai T: Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes Infect.*, 9: 70-77 (2007)
40. Marshall J C, Malam Z, Jia S: Modulating neutrophil apoptosis. *Novartis Foundation Symposia*, 280: 53-66; discussion 67-72, 160-164 (2007)
41. Martins P S, Kallas E G, Neto M C, Dalboni M A, Blecher S, Salomao R: Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*, 20: 208-212 (2003)
42. Maselli A, Laevsky G, Knecht D A: Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology* 148: 413-420 (2002)
43. Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Lin M T, Han I, Furukawa S, Ikeda S, Muto T: Ratio of bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines PMN fate. *Shock*, 12: 365-372 (1999)
44. Matsuda N, Hattori Y: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101: 189-198 (2006)
45. McCloskey P S, Salo R J: Flow cytometric analysis of group B streptococci phagocytosis and oxidative burst in human neutrophils and monocytes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27: 59-65 (2000)
46. Nienhaus G U, Nienhaus K, Holzle A, Ivanchenko S, Renzi F, Oswald F, Wolff M, Schmitt F, Rocker C, Vallone B, Weidemann W, Heilker R, Nar H, Wiedenmann J: Photoconvertible fluorescent protein EosFP: biophysical properties and cell biology applications. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 351-358 (2006)
47. Nienhaus K, Nienhaus G U, Wiedenmann J, Nar H: Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 102: 9156-9159 (2005)
48. Nuutila J, Lilius E M: Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65: 93-102 (2005)
49. Oda T, Maeda H: A new simple fluorometric assay for phagocytosis. *Journal of immunological methods*, 88: 175-183 (1986)

50. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N: Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49: 239-276 (1995)
51. Osuchowski M F, Welch K, Siddiqui J, Remick D G: Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *Journal of Immunology*, 177: 1967-1974 (2006)
52. Rackow E C, Astiz M E: Mechanisms and management of septic shock. *Critical Care Clinics*, 9: 219-237 (1993)
53. Remijsen Q, Berghe T V, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P: Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research*, (2010)
54. Rodríguez M E, Van der Pol W L., Van de Winkel J G: Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera. *Journal of immunological methods*, 252: 33-44 (2001)
55. Rothe G, Valet G: Phagocytosis, intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry. *Cytometry* 9: 316-324 (1988)
56. Rothe G, Kellermann W, Valet G: Flow cytometric parameters of neutrophil function as early indicators of sepsis- or trauma-related pulmonary or cardiovascular organ failure. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 115: 52-61 (1990)
57. Rothe G, Klingel S, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W, Zirkelbach C, Banati R B, Mangel W F, Valet G: Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 373: 547-554 (1992)
58. Sander L E, Davis M J, Boekschoten M V, Amsen D, Dascher C C, Ryffel B, Swanson J A, Müller M, Blander J M: Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, 474: 385-389 (2011).
59. Schreiner L, Huber-Lang M, Weiss M E, Hohmann H, Schmolz M, Schneider E M: Phagocytosis and digestion of pH-sensitive fluorescent dye (Eos-FP) transfected *E. coli* in whole blood assays from patients with severe sepsis and septic shock. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5: 135-144 (2011)
60. Schroder A K, von der Ohe M, Kolling U, Altstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D, Dalhoff K, Ju X, Zenke M, Heussen N, Rink L: Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology*, 119: 317-327 (2006)
61. Sriskandan S, Altmann D M: The immunology of sepsis. *Journal of Pathology*, 214: 211-223 (2008)

62. Taneja R, Sharma A P, Hallett M B, Findlay G P, Morris M R: Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* 30: 618-622 (2008)
63. Tetta C, Bellomo R, D'Intini V, De Nitti C, Inguaggiato P, Brendolan A, Ronco C: Do circulating cytokines really matter in sepsis? *Kidney International Supplements*, (84): S69-71 (2003)
64. Underhill D M, Goodridge H S: Information processing during phagocytosis. *Immunology*, 12: 492-502 (2012)
65. Weiss M, Elsharkawi M, Welt K, Schneider E M: Transient leukocytosis, granulocyte colony-stimulating factor plasma concentrations, and apoptosis determined by binding of annexin V by peripheral leukocytes in patients with severe sepsis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010: 742-747 (2003a)
66. Weiss M, Voglic S, Harms-Schirra B, Lorenz I, Lasch B, Dumon K, Gross-Weege W, Schneider E M: Effects of exogenous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim, rhG-CSF) on neutrophils of critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome depend on endogenous G-CSF plasma concentrations on admission. *Intensive Care Medicine*, 29: 904-914 (2003b)
67. Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W: Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. *Infection*, 27: 183-186 (1999)
68. Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Rocker C, Salih A, Spindler K D, Nienhaus G U: EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 101: 15905-15910 (2004)
69. Wiedenmann J, Nienhaus G U: Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. *Expert Review of Proteomics*, 3: 361-374 (2006)
70. Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus G U: Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life*, 61: 1029-1042 (2009)
71. Winterbourn C C, Hampton M B, Livesey J H, Kettle A J: Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 39860-39869 (2006)
72. Ziegler-Heitbrock H W, Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 67: 603-606 (2000)

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.