

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

vorgelegt in der

Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

bei Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

Direktor des Instituts für Biologie

der Universität zu Lübeck

Mikrobielle und wirtsseitige Bedingungen der Granulozytenaktivierung

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

vorgelegt von

Inga Wilde

aus Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung:

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. P. K. Müller

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Hartmann

2. Berichterstatter: PD Dr. T. Laskay

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

gez. Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. E. Hartmann

MIKROBIELLE UND WIRTSSEITIGE BEDINGUNGEN DER GRANULOZYTENAKTIVIERUNG I

1	EINLEITUNG	1
1.1	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	1
1.2	TRANSENDOTHELIALE MIGRATION	3
1.3	ERKENNUNG VON PATHOGENEN	5
1.3.1	<i>TLR2 und Lipopeptide</i>	5
1.3.2	<i>CD14 und CD14-Promotorpolymorphismus</i>	8
1.4	LEISHMANIEN.....	9
1.5	DIE ANTIGENPRÄSENTATION.....	9
1.6	ZIELE DER STUDIE	11
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	MATERIALIEN	13
2.1.1	<i>Leishmanien</i>	13
2.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.3	<i>Kulturmedien und Puffer</i>	13
2.1.4	<i>Laboraüstung</i>	15
2.1.5	<i>Geräte</i>	15
2.1.6	<i>Chemikalien und Laborreagenzien</i>	17
2.1.7	<i>Radiochemikalien</i>	20
2.1.8	<i>Antikörper</i>	20
2.1.9	<i>Kits</i>	21
2.1.10	<i>Software</i>	21
2.1.11	<i>Primärzellen und Zelllinien</i>	22
2.2	METHODEN	22
2.2.1	<i>Isolation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus humanem Vollblut</i>	22
2.2.1.1	Neutrophile Granulozyten (PMN).....	22
2.2.1.2	Monozyten	23
2.2.2	<i>Analyse der Reinheit der Zellen</i>	23
2.2.3	<i>DNA-Isolation</i>	23
2.2.4	<i>Erythrozytenlyse</i>	24
2.2.5	<i>Kultur von HUVEC</i>	24
2.2.5.1	Kultur von HUVEC in Transwelleinsätzen.....	24
2.2.5.2	Phalloidinfärbung.....	24
2.2.5.3	FITC-BSA-Test	25
2.2.6	<i>Kultur von Leishmanien</i>	25
2.2.7	<i>Bakterienkultur</i>	25
2.2.8	<i>Koinkubation der PMN mit Leishmanien und anderen Stimuli</i>	25
2.2.8.1	Leishmanien.....	26
2.2.8.2	Andere Stimuli.....	26
2.2.9	<i>Durchflusszytometrie (FACS)</i>	26

2.2.10	<i>Bestimmung der Apoptoserate der PMN</i>	27
2.2.10.1	Morphologische Bestimmung der Apoptoserate	27
2.2.10.2	Annexin-V-Binding	27
2.2.11	<i>Spenderpool und Bestimmung des CD14 Promotorpolymorphismus</i>	27
2.2.12	<i>Bestimmung von Zytokinen in Zellüberständen</i>	28
2.2.13	<i>Transmigrationstest</i>	28
2.2.14	<i>Chemotaxistest, Chemokinesetest</i>	28
2.2.15	<i>β-Glucuronidase-Test</i>	29
2.2.16	<i>Analyse der Phagozytoserate der PMN</i>	29
2.2.16.1	Phagozytostest mit lebenden <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.2.16.2	Phagozytostest mit toten <i>S. aureus</i>	30
2.2.17	<i>Oxidativer Burst-Test</i>	30
2.2.18	<i>Blockierung von CD14, TLR2 und TLR4 auf PMN</i>	31
2.2.19	<i>T-Zell-Proliferationstest</i>	31
2.2.20	<i>Plasmidpräparation aus einer Bakterienexpressionskultur</i>	31
2.2.21	<i>Linearisierung der DNA</i>	32
2.2.22	<i>Erstellung transgener fluoreszierender L.m. über homologe Rekombination in einen rRNA-Lokus</i>	32
2.2.23	<i>Statistische Analyse</i>	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	AKTIVIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN DURCH TRANSENDOTHELIALE MIGRATION.....	34
3.1.1	<i>Die Nutzung Gelatine-beschichteter Transwellssysteme führt zu einer konfluenten Endothelzelleinzelschicht</i>	34
3.1.2	<i>Die Transmigration aktiviert neutrophile Granulozyten</i>	35
3.1.3	<i>Die Transmigration führt zu einer Vorstimulation der neutrophilen Granulozyten für eine LPS-induzierte Oberflächenexpression von CD69</i>	37
3.1.4	<i>Die Transmigration stimuliert neutrophile Granulozyten für eine fMLP-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor</i>	39
3.1.5	<i>Die Transmigration führt zu einer apoptoseverzögernden Wirkung von bakteriellen Bestandteilen auf neutrophile Granulozyten</i>	40
3.2	DIE BAKTERIELLEN LIPOPEPTIDE MALP-2 UND PAM ₃ CYS ₃ SK ₄ WIRKEN AUF PMN IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN	43
3.2.1	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ induzieren die Sekretion von IL-8 durch PMN in unterschiedlicher Wirksamkeit</i>	43
3.2.2	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ verändern die Zellmorphologie von neutrophilen Granulozyten</i>	46
3.2.3	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ stimulieren neutrophile Granulozyten, gemessen an der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern</i>	46
3.2.4	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ verstärken die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten</i>	48

3.2.5	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ stimulieren neutrophile Granulozyten für eine fMLP-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor.....</i>	49
3.2.6	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wirken chemokinetisch auf neutrophile Granulozyten.....</i>	50
3.2.7	<i>MALP-2 und Pam₃CysSK₄ aktivieren neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von MIP-1β.....</i>	53
3.2.8	<i>Die Stimulation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄ führt zu einer Verzögerung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten.....</i>	54
3.2.9	<i>MALP-2 wirkt auf neutrophile Granulozyten über CD14.....</i>	55
3.3	BEDEUTUNG DES CD14-PROMOTORPOLYMORPHISMUS 159C→T FÜR DIE AKTIVIERBARKEIT VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN DURCH BAKTERIELLE BESTANDTEILE.....	57
3.3.1	<i>Bestimmung des Genotyps bezüglich des CD14-Promotorpolymorphismus in einem Pool von freiwilligen Spendern.....</i>	57
3.3.2	<i>Untersuchung der zwei Genotypen CC und TT auf mögliche Unterschiede bezüglich der Funktion neutrophiler Granulozyten.....</i>	57
3.3.3	<i>Zellmorphologische Veränderungen der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LTA und LPS.....</i>	58
3.3.4	<i>Expression von CD62L auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LPS.....</i>	60
3.3.5	<i>IL-8-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten oder Monozyten nach Stimulation mit LTA oder LPS.....</i>	61
3.3.6	<i>CD14-Expression auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....</i>	63
3.3.7	<i>CD14 Expression auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach Stimulation mit LTA und LPS.....</i>	65
3.3.8	<i>Freisetzung von löslichem CD14 durch neutrophile Granulozyten.....</i>	67
3.3.9	<i>Untersuchung der Phagozytoseaktivität von PMN.....</i>	69
3.3.10	<i>Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten.....</i>	70
3.4	ERSTELLUNG TRANSGENER LEISHMANIEN.....	72
3.4.1	<i>Integration einer für GFP- und DsRed-kodierenden „DNA-Cassette“ in das Genom von Leishmania major.....</i>	72
3.4.2	<i>Charakterisierung transgener Leishmanien.....</i>	73
3.4.2.1	Wachstumsrate der transgenen Leishmanien.....	73
3.4.2.2	Transgene L.m. in neutrophilen Granulozyten.....	74
3.5	CHARAKTERISTIKA ANTIGENPRÄSENTIERENDER ZELLEN BEI NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....	75
3.5.1	<i>Neutrophile Granulozyten exprimieren MHC-II-Moleküle nach Stimulation mit IFNγ und GM-CSF.....</i>	76
3.5.2	<i>PMN exprimieren CD1a- und CD1b- Moleküle auf ihrer Oberfläche.....</i>	77
3.5.3	<i>Expression von CD1-Molekülen auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten.....</i>	78
3.5.4	<i>CD1b-positive neutrophile Granulozyten aktivieren keine CD1b-spezifischen T-Zellen... </i>	79
4	DISKUSSION.....	81
4.1	TRANSMIGRATION.....	81

4.2	AKTIVIERBARKEIT VON PMN DURCH DIE LIPOPEPTIDE MALP-2 UND PAM ₃ CYSSK ₄	84
4.3	BEDEUTUNG DES CD14-PROMOTORPOLYMORPHISMUS 159C→T FÜR DIE REAKTIVITÄT NEUTROPHILER GRANULOZYTEN AUF BAKTERIELLE BESTANDTEILE	89
4.4	GENERIERUNG TRANSGENER LEISHMANIEN	93
4.5	NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MIT CHARAKTERISTIKA ANTIGENPRÄSENTIERENDER ZELLEN.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	SUMMARY	100
7	REFERENZEN	101
8	LISTE DER POSTER, VORTRÄGE UND PUBLIKATIONEN AUS DIESER ARBEIT.....	114
9	DANKSAGUNG.....	115
10	CURRICULUM VITAE.....	117

Abkürzungen

aa	<i>amino acid</i>
ab	<i>antibody</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (100%)
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CC	homozygot für das C-Allel des CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COS	<i>Columbia sheep</i>
DC	dendritische Zellen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DsR	rot fluoreszierendes Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPB	Elektroporationspuffer
Exp.	Experiment
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
F _c	<i>fragment crystalline</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC-H	<i>forward scatter high</i>

fMLP	Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor receptor
h	hora
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulphonic acid]
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HOCl	hypochlorige Säure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells ,
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LBP	Lipopolysaccharide bindendes Protein
<i>L. major, Lm</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	<i>lipoteichoic acid</i>
M	Molarität
m _A	arithmetischer Mittelwert
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MALP-2	<i>macrophage-activating Lipopeptide-2</i>
mCD14	membrangebundenes CD14
McF	Mac Farland
MEM	modified eagle's medium
m _G	geometrischer Mittelwert
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MPO	Myeloperoxidase

mV	Millivolt
N	Normal
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NK	natürliche Killer
$\cdot\text{OH}$	Hydroxidradikal
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
Pam ₃ CysSK ₄	N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-(S)-seryl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysine
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophil granulocytes</i>
PP	Polypropylen
PRR	pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserin
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sCD14	lösliches CD14
SD	<i>standard deviation</i>
SDM	<i>semi defined medium</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC-H	<i>side scatter hight</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Pufferlösung
TC	<i>T-Cell</i>
T _H	T Helfer
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrosis Faktor

Tr	Transmigration
TT	homozygot für das T-Allel des CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T
u	<i>unit</i>

1 Einleitung

Zur Abwehr pathogener Organismen besitzt der menschliche Körper u.a. das Immunsystem. Dabei wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden. Zur Verbesserung medizinischer Therapieverfahren, nicht nur in Bezug auf Infektionserkrankungen, sondern auch der in der westlichen Welt zunehmenden Autoimmunerkrankungen, ist ein genaueres Verständnis des Immunsystems dringend erforderlich.

1.1 Neutrophile Granulozyten

Granulozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie gehören zu den Leukozyten und stammen somit von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Diese entwickeln sich über myeloide Vorläuferzellen und eine Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzelle zu Granulozyten. Die Granulozytenpoese dauert ca. 14 Tage. Die Granulozyten lassen sich in die funktionell unterschiedlichen neutrophilen (Abb. 1), eosinophilen und basophilen Granulozyten unterteilen. Durch eine Färbung können die in ihrem Zytoplasma zahlreich vorhandenen primären Lysosomen im Lichtmikroskop als Granula sichtbar gemacht werden. Der Zellkern neutrophiler Granulozyten lässt sich mit einem neutralen Farbstoff anfärben. Aufgrund der gelappten Form ihres Zellkerns werden die neutrophilen Granulozyten auch als polymorphonukleäre Zellen (PMN) bezeichnet. Sie sind neben den Monozyten und Makrophagen die effektivsten Phagozyten des Immunsystems, u.a. durch ihre große Anzahl. Im Blut stellen die Granulozyten einen Anteil von 40 % - 75 % der Leukozyten. Es werden täglich 10^{11} PMN aus dem Knochenmark ins Blut abgegeben. Während einer akuten Infektion kann die Freisetzung jedoch auf 10^{12} pro Tag ansteigen (1). Ihre Halbwertszeit im Blut beträgt 6 - 8 h. Anschließend werden sie spontan apoptotisch. Die Apoptose führt bei den PMN zu morphologischen und biochemischen Veränderungen, wie der Zellschrumpfung, der Kondensation des Chromatins und der Abrundung des zuvor mehrlappigen Zellkerns. Diese ermöglichen es, apoptotische Neutrophile zu erkennen (2,3).



Abb. 1 Neutrophile Granulozyten. Giemsa-Färbung. (Originalvergrößerung 1000-fach).

Die frühe Apoptose ist zudem durch einen sog. Membran-„Flip-Flop“ gekennzeichnet. Dabei wird das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Plasmamembran auf die äußere Seite transloziert (4). So können Makrophagen die apoptotischen Zellen erkennen (5) und beseitigen.

Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort, da sie als erste Zellen des angeborenen Immunsystems in das infizierte Gewebe einwandern. Die transendotheliale Migration aus dem Blut in das Gewebe erfolgt entlang eines chemotaktischen Gradienten. Am Ort der Infektion führt nun das Entzündungsmilieu zu einer Verzögerung der Apoptose. So können PMN die Pathogene bis zum Eintreffen weiterer Phagozyten abwehren. Die Bekämpfung von Pathogenen durch PMN beruht vorwiegend auf ihrer ausgeprägten Phagozytoseaktivität, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), als auch der Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden aus zahlreichen zytoplasmatischen Granula. Hier spielen besonders die azurophilen Granula eine Rolle, welche hydrolytische und bakterizide Proteine, wie Defensine aber auch die Myeloperoxidase beinhalten. Bakterien und andere Eindringlinge werden vollständig oder teilweise in intrazelluläre Kompartimente, sog. Phagosomen, aufgenommen, welche im Laufe ihrer Maturierung mit Lysosomen verschmelzen. Im Phagolysosom kommt es nun zur Abtötung der Eindringlinge durch azide und oxidative Substanzen (6). Obwohl auch einzelne Bestandteile von Pathogenen PMN aktivieren können, sind sie nicht alle dazu in der Lage Effektorfunktionen der PMN auslösen. Einige Moleküle, wie LPS, sind nur in der Lage eine Vorstimulation, ein sog. *Priming*, der PMN für nachfolgende Stimulationen

zu bewirken (7). Die Sekretion von Chemokinen, wie MIP-1 α und MIP-1 β , durch aktivierte PMN führt zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen, wie z.B. Monozyten und dendritischen Zellen (8,9) und damit zu einer verstärkten Bekämpfung der Pathogene. Über die Sekretion verschiedener Zytokine kommunizieren die PMN auch mit den Zellen des adaptiven Immunsystems und zeigen so auch immunmodulatorische Fähigkeiten (10,11).

1.2 Transendotheliale Migration

Im Laufe einer Infektion müssen die Leukozyten die Blutbahn verlassen und in das infizierte Gewebe einwandern, um dort die Krankheitserreger zu bekämpfen. Der Prozess der Extravasation, bzw. der transendothelialen Migration (TEM), beruht auf einem komplexen Informationsaustausch zwischen den Endothelzellen und den durchtretenden Leukozyten. Dabei sind verschiedene Adhäsionsmoleküle und intrazelluläre Signalkaskaden involviert. Dieser mehrschrittige Prozess, auch als „multi-step paradigm“ bezeichnet (12), ist abhängig von der sequenziellen Aktivierung verschiedener adhäsiver Proteine und ihrer Liganden auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen (EC). Der mehrschrittige Prozess der TEM besteht aus dem Rollen der Leukozyten über das Endothel, der Adhäsion und schließlich der Diapedese (Abb. 2).

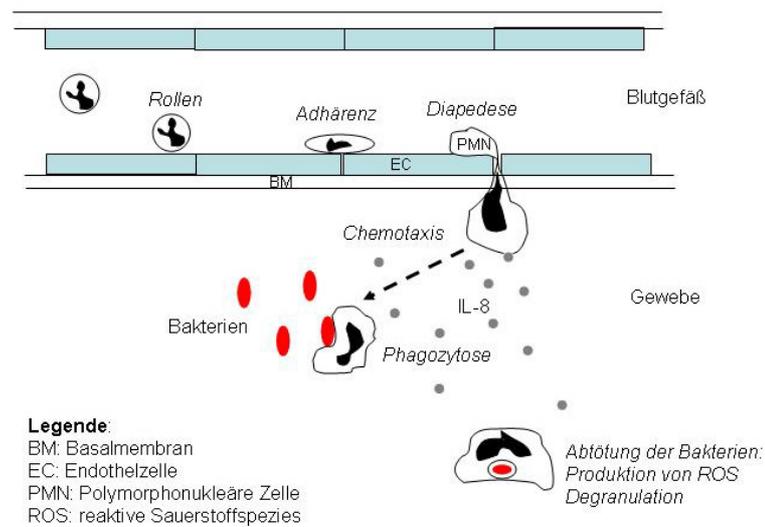


Abb. 2 Transendotheliale Migration der PMN und Bekämpfung von Pathogenen. Neutrophile Granulozyten können durch Chemokine, wie IL-8, zur Migration in das Gewebe stimuliert werden. Die Migration ist ein mehrstufiger Prozess, bestehend aus dem Rollen am Endothel, der Adhärenz und der Diapedese. Im infizierten Gewebe bekämpfen die neutrophilen Granulozyten Eindringlinge über mehrere Mechanismen.

Das Rollen basiert auf einer reversiblen schwachen Interaktion zwischen Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelle und dem Leukozyt. Hier spielen Selektine, wie z.B. das Leukozytenselektin CD62L, eine Rolle. Diese befinden sich sowohl auf PMN (z.B. CD62L) als auch auf aktivierten Endothelzellen (z.B. CD62E) (13). Durch die Nähe der Zellen zueinander können die Neutrophilen nun leichter durch chemotaktische Zytokine auf der apikalen Oberfläche der Endothelzellen aktiviert werden und sich fester an diese binden, um schließlich durch das Epithel zu wandern (12). Die feste Bindung des Leukozyten an die Endothelzelle ist entweder eine rezeptorvermittelte Antwort auf inflammatorische Zytokine oder sie ist eine Antwort auf Signale von aktivierten Selektinen. Deren zytoplasmatische Domänen sind mit Signaltransduktionswegen, die zur Aktivierung von Integrinen führen, verbunden (14). Somit könnten die Selektine über die Aktivierung der Integrine der Verstärkung des Adhäsionsprozesses dienen (15). Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die sich u.a. auf Neutrophilen befinden und der Zell-Zell-Adhäsion oder dem Kontakt zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix dienen. Dabei ist die Bindung der PMN an aktiviertes Endothel besonders durch zwei Integrine vermittelt (15). Eines von ihnen ist das Makrophagen-Antigen-1 (Mac-1), bestehend aus CD11b und CD18. Das Mac-1 liegt bereits präformiert in drei Kompartimenten der PMN vor: den sekretorischen

Vesikeln, den spezifischen Granula und den Gelatinasegranula (6). Somit kann es nach Kontakt mit degranulierenden Stimuli schnell auf die Oberfläche der PMN gebracht werden (16). Für die Leukozyten ist das Auffinden der richtigen Stelle (*Homing*), an der sie einwandern sollen, sehr wichtig. Dieses *Homing* geschieht bevorzugt an sog. *trizellulären Junctions*, also an Stellen, an denen drei Endothelzellen aufeinander treffen (17). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine intrazelluläre Diapedese (18). PMN besitzen Proteasen, wie z.B. die Gelatinase, die in der Lage sind Kollagen, Laminin oder andere extrazelluläre Komponenten in der Basalmembran und der subendothelialen Matrix zu zersetzen. Adhäsion und Migration der PMN wird begleitet durch die Freisetzung von Proteasen durch die PMN (19).

Lösliche Mediatoren der Migration sind z.B. IL-8, TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α und MIP-1 β . Dabei kann das Zytokin IL-8 sowohl von Monozyten und Makrophagen als auch von PMN und Endothelzellen freigesetzt werden (20,21) und lockt spezifisch neutrophile Granulozyten an (22,23), während z.B. MIP-1 β neben Monozyten und dendritischen Zellen auch CD4⁺-T-Lymphozyten anzieht. Neutrophile besitzen mehrere Rezeptoren für chemotaktische Moleküle, wie den Komplementrezeptor für C5a, den fMLP-Rezeptor für Formylpeptide, und den CXCR2-Rezeptor für IL-8. *In vitro* führt ihre Stimulation auf PMN zu einer verstärkten Oberflächenexpression adhäsiver Proteine. Inflammatorische Mediatoren, wie TNF- α oder bakterielle Bestandteile, wie Lipopolysaccharid (LPS), aktivieren auch das Endothel (15).

1.3 Erkennung von Pathogenen

1.3.1 TLR2 und Lipopeptide

Mikroorganismen zeichnen sich durch hochkonservierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) aus, welche von den Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt werden. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) stellen eine hochkonservierte Familie von PRRs dar, welche auf nahezu allen Zellen des Immunsystems exprimiert werden (24).

Bisher konnten 10 humane TLRs identifiziert werden. TLR1, -2, -4, -5 und -6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie verschiedene bakterielle Moleküle erkennen können (Abb. 3). Möglicherweise erfolgt bei den Phagozyten eine Rekrutierung der TLRs auch in die Phagosomen (25,26). TLR3, -7, -8 und -9 befinden sich in den intrazellulären Kompartimenten (27-29), wo sie fremde Nukleinsäuren erkennen können. TLR10 ist der zuletzt entdeckte humane TLR und seine Funktion, sowie sein Ligand sind noch nicht bekannt. Neutrophile Granulozyten exprimieren die RNA aller TLRs, außer derjenigen von TLR3 (30). Fast alle Agonisten der TLRs lösen in PMN eine entzündliche Reaktion aus. Die meisten TLRs liegen als Monomere vor. TLR2 allerdings dimerisiert mit TLR1 oder mit TLR6, um funktionell zu sein. Für die Funktion von TLR4 und TLR2 ist CD14, ein weiteres Oberflächenmolekül auf Neutrophilen und Monozyten, von Bedeutung. Mit Hilfe von CD14 und dem LPS-bindenden Protein (LBP) werden Liganden von TLR4, wie das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien und von TLR2, wie die Lipoteichonsäure (LTA) grampositiver Bakterien, verstärkt an die beiden Rezeptoren gebunden (31,32).

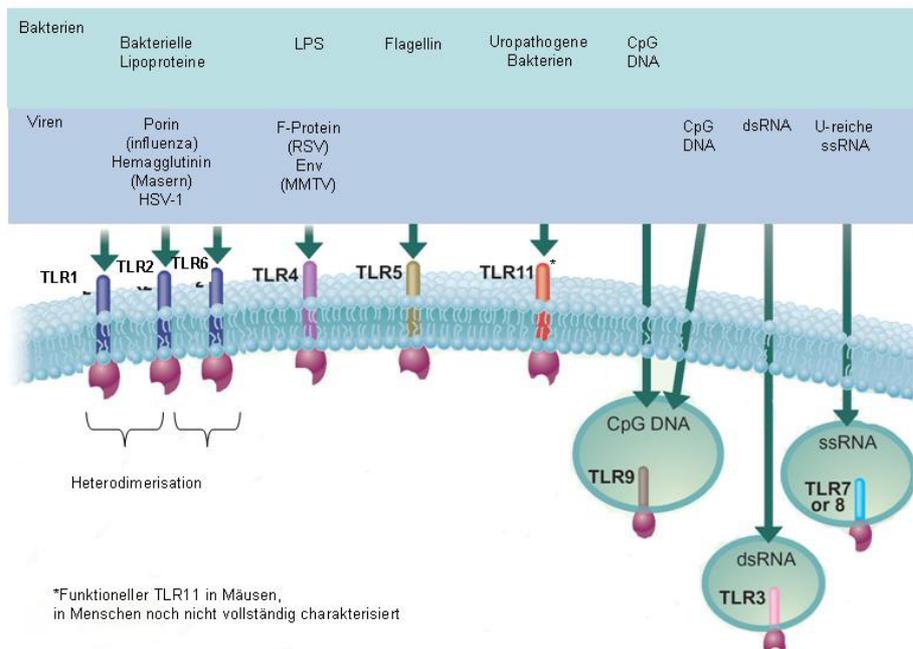


Abb. 3 Die Toll-like-Rezeptor (TLR) Familie. Verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) binden spezifisch an verschiedene TLRs, zum Teil auf der Zelloberfläche, zum Teil in intrazellulären Kompartimenten (adaptiert von Referenz 33).

Ein Bestandteil der Zellwände grampositiver und gramnegativer, sowie zellwandloser Bakterien sind die Lipopeptide. Bei ihnen handelt es sich um toxische Zellwandkomponenten, welche durch passive Prozesse, wie das Absterben des Bakteriums oder auch durch die Behandlung mit Antibiotika, freigesetzt werden. Als Rezeptor für die Lipopeptide dient der TLR2. Verschiedene Peptidoglykane, sowie Porine und Hemagglutinine der Viren stellen ebenfalls mögliche TLR2-Liganden dar. Während TLR2/6 diacylierte Lipopeptide bindet, erkennt TLR2/1 meistens triacylierte Lipopeptide (34,35,36). Die Rezeptoren TLR1 und TLR6 sind sich dennoch strukturell sehr ähnlich (37). Ein Ligand des TLR2/6-Dimers ist z.B. das Lipopeptid *mycoplasmal macrophage activating Lipopeptide-2* (MALP-2, Abb. 4a), ein TLR2/1-Ligand dagegen das N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-(S)-seryl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysine (Pam₃CysSK₄, Abb. 4b). Das diacylierte MALP-2 wird von den zellwandlosen Bakterien *Mycoplasma fermentans* exprimiert. Bei Mycoplasmen handelt es sich um zellwandlose Bakterien, welche je nach Art und Wirt Pathogene oder Kommensalen darstellen. Bei Pam₃CysSK₄ handelt es sich um ein triacyliertes artifizielles Lipopeptid, welches ein Analog der N-terminalen bakteriellen Lipopeptide darstellt.

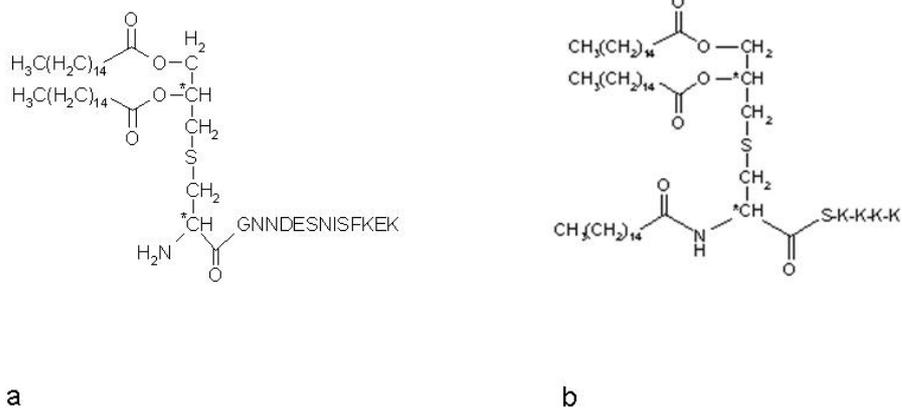


Abb. 4 Strukturformel von MALP-2 (a) und Pam₃CysSK₄ (b).

1.3.2 CD14 und CD14-Promotorpolymorphismus

Bei CD14 handelt es sich um einen Rezeptor der zum einen membranständig (mCD14) auf Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert wird (38), zum anderen auch als lösliches Serumprotein (sCD14) vorliegt (39). Dabei wird sCD14 hauptsächlich von Monozyten und von Hepatozyten freigesetzt. Das mCD14 ist über ein Phospholipid in der Zellmembran verankert, aber nicht an einen Signaltransduktionsweg angeschlossen (38). Daher bindet es zur Signalweiterleitung an andere Rezeptoren, wie TLR2 und TLR4 (40). Das CD14-Glycoprotein ist ein Mustererkennungsrezeptor (PRR) für einen Komplex aus LPS und dem LPS bindenden Protein (LBP) (41). Aber auch verschiedene andere mikrobielle Bestandteile wie Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglycan und Lipoarabinomannan (LAM) können von CD14 gebunden werden (42,43,44). Die Sensitivität der Zelle für CD14-vermittelte Signale kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden. So ermöglicht das Abtrennen membrangebundener CD14-Rezeptoren von der Oberfläche eine Desensibilisierung der Zelle. Hingegen können Zellen, welche kein membranständiges CD14 exprimieren, wie Endothelzellen, über den löslichen Rezeptor CD14-vermittelte Signale verarbeiten (31,45).

Hinsichtlich der CD14-Promotorregion wurde kürzlich ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) C→T an der Position -159 beschrieben (46,47) (Abb. 5).

```
CC
C
-167 TGTTACGG CGCCGTCGCTGAA -146
T
TT
```

Abb. 5 CD14-Promotorpolymorphismus -159 C→T.

Es konnte bei dem TT-Genotyp eine erhöhte transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden (48). Die CC-Allele korrelieren mit erhöhten IgE-Werten, die TT-Allele mit einer erhöhten Todesrate bei Patienten mit septischem Schock als auch mit einem erhöhten sCD14-Serumspiegel (46, 49). Zwischen erhöhten Werten von sCD14 und

inflammatorischen infektiösen Erkrankungen und deren negativen Verläufen werden Verbindungen postuliert (47,49,50).

Ein Molekül, welches von CD14 gebunden wird, ist die Lipoteichonsäure (LTA). Sie ist ein Bestandteil aus der Zytoplasmamembran grampositiver Bakterien. Es werden ihr immunstimulatorische Fähigkeiten zugeschrieben (51,52). Auch das aus gramnegativen Bakterien stammende Lipopolysaccharid (LPS) wird von CD14 gebunden. Daher eignen sich LTA und LPS zur Untersuchung der Bedeutung des CD14 Promotorpolymorphismus 159C→T für die Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten auf PAMPs grampositiver und gramnegativer Bakterien.

1.4 Leishmanien

Leishmanien sind obligate intrazelluläre parasitische Protozoen. Zu ihnen gehören die Erreger der Leishmaniasis. Die Leishmanien werden von den Schmetterlingsmücken (*Phlebotomus* spp.) auf Menschen übertragen. In den Mücken leben sie als promastigote Stadien, also mit einem Flagellum, im Darmlumen. Im Menschen kommen sie als amastigote Form, also ohne Flagellum, in Zellen des Immunsystems vor. Makrophagen sind die Hauptwirte der Leishmanien. Durch sie entkommen diese Parasiten dem toxischen, extrazellulären Milieu (53). Allerdings nutzen die Leishmanien auch PMN als Wirte, um schneller Schutz zu finden und über die PMN später einen Weg in die Makrophagen zu finden (54).

1.5 Die Antigenpräsentation

Während die Strategien der angeborenen Immunantwort auf der Erkennung hochkonservierter molekularer Strukturen (PAMPs) beruhen, welche verschiedenen Pathogenen gemeinsam sind, basiert die adaptive Immunantwort auf Rezeptoren, welche hochspezifisch für bestimmte Bestandteile (Antigene) von Pathogenen sind. Die Antigene können von sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC) den T-Zellen präsentiert werden, so dass die spezifisch passende T-Zelle aktiviert und zur Proliferation gebracht wird. Dabei werden zellinterne Antigene, z.B. von intrazytoplasmatischen Erregern über MHC I-Moleküle präsentiert, während exogene Antigene, also Antigene aus dem proteolytischen Abbau von Pathogenen, über MHC II-

Moleküle präsentiert werden. Jeder Mensch besitzt auf Chromosom 6 drei Genorte für MHC II-Moleküle, die für die drei Isotypen HLA-DR, -DQ, -DP kodieren. Die Präsentation von Antigenen über MHC-II-Moleküle reicht jedoch zur Induktion einer T-Zellproliferation nicht aus. Kostimulatorische Moleküle, die auf der Zellmembran der APCs exprimiert sind, geben den T-Zellen das zur Aktivierung durch den MHC-II-Antigen-Komplex notwendige zweite Signal. Antigene, welche keine Proteine sind, wie z.B. Lipide und Glycolipide, werden über die Gruppe der CD1-Moleküle präsentiert (Abb. 6) (55,56). Lipidmoleküle sind, anders als Peptidmoleküle, nicht wasserlöslich. Sie assoziieren mit den Zellmembranen und anderen lipidbindenden Strukturen. Auch für die Erkennung von Lipiden sind akzessorische Moleküle, wie Saposin C (57), notwendig. Der Lipid-CD1-Komplex wird von spezifischen CD1-restringierten T-Zellen erkannt (58). Die Familie der CD1-Moleküle besteht aus fünf Mitgliedern. Bei ihnen handelt es sich um die glykosylierten Proteine der Gruppe 1 CD1a, CD1b, CD1c und der Gruppe 2 CD1d. CD1e fällt sowohl strukturell als auch durch seine intrazelluläre Lokalisation aus beiden Gruppen heraus. Alle CD1-Moleküle werden von den professionellen APCs exprimiert. Die T-Zellen, welche Lipide auf CD1-Molekülen erkennen, lassen sich ebenfalls in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe besitzt ähnliche Fähigkeiten wie die peptidspezifischen T-Zellen und erkennt Lipidmoleküle und Glykolipide über die CD1-Moleküle der Gruppe 1. Die andere Gruppe besteht aus den invarianten natürlichen Killer T-Zellen (iNKT)-Zellen, welche Lipide erkennen, die über CD1d präsentiert werden. Die CD1-restringierten T-Zellen reagieren dabei nur auf kreuzreaktive Antigene (59).

Zu den professionellen APCs werden B-Lymphozyten, Makrophagen und insbesondere dendritischen Zellen gezählt. Jedoch sind auch einige Endothelzellen dafür bekannt, Antigene unter bestimmten Bedingungen zu präsentieren. Zudem gibt es Hinweise, dass die Funktion der neutrophilen Granulozyten nicht allein auf das angeborene Immunsystem beschränkt ist. PMN wurden auch schon als Zellen beschrieben, welche Charakteristika von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass PMN in Patienten mit der Wegenerschen Granulomatose, einer chronischen, entzündlichen Erkrankung, sowohl MHC-II-Moleküle (60,61) als auch die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 exprimieren (61). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Neutrophilen peptidspezifische T-Zellen stimulieren,

und dies nicht nur unspezifisch über Superantigene, sondern auch spezifisch über das Tetanustoxoid (62).

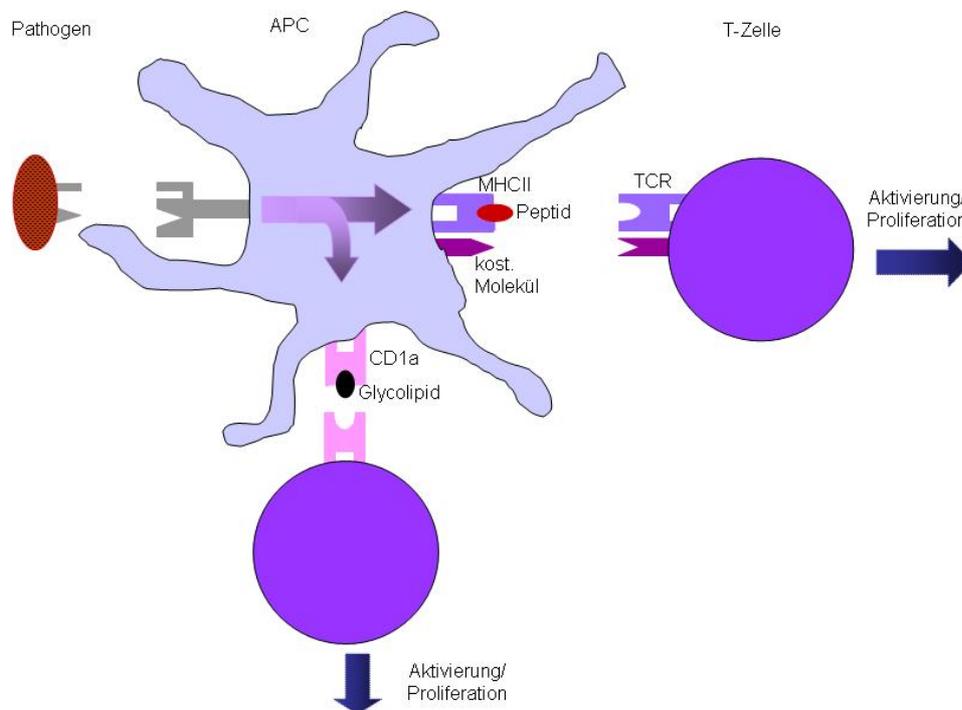


Abb. 6 Antigenpräsentation durch eine professionelle antigenpräsentierende Zelle. Nur eine Darbietung von fremden Peptiden über MHCII zusammen mit einem kostimulatorischen Molekül oder aber eines Glykolipides über CD1-Moleküle führt zu einer Aktivierung der naiven T-Zellen (TCR=T-Zell Rezeptor, kost. Molekül= kostimulatorisches Molekül).

1.6 Ziele der Studie

Neutrophile Granulozyten sind in erster Linie Phagozyten, welche nach der transendothelialen Migration im infizierten Gewebe Bakterien bekämpfen. Ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation ist jedoch noch umstritten. In der hier vorliegenden Studie sollten ihre Fähigkeiten als „Gewebsgranulozyten“, ihre Aktivierbarkeit durch bakterielle Bestandteile, sowie ihre Fähigkeiten bezüglich der Antigenpräsentation genauer untersucht werden.

I. Die in den *in vitro*-Versuchen zumeist verwendeten Granulozyten werden aus Blut isoliert und unterscheiden sich noch recht stark von den *in vivo* bei einer Infektion im Gewebe vorliegenden „Gewebsgranulozyten“. Die Gewebsgranulozyten haben bereits Signale zur Einwanderung in das Gewebe bekommen und sind durch eine ebenfalls aktivierende Endothelzellschicht in das Gewebe migriert. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, ein Transmigrationssystem für die Granulozyten zu etablieren, um für *in vitro*-Versuche Gewebsgranulozyten zu generieren.

II. Es ist bekannt, dass PMN gewisse Lipopeptide über unterschiedliche Rezeptorkombinationen erkennen. Zur Erkennung des Lipopeptides Pam₃CysSK₄ ist die Rezeptorkombination aus TLR2/1 und zur Erkennung des Lipopeptides MALP-2 TLR2/6 notwendig. Dabei ist noch nicht gezeigt worden, inwiefern neutrophile Granulozyten in ihrem Aktivierungsverhalten die Nutzung dieser recht ähnlichen Rezeptorkombinationen zur Erkennung von Lipopeptiden reflektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Aktivierung der PMN durch MALP-2 und Pam₃CysSK₄ untersucht.

III. Bei der Stimulation von Granulozyten zeigen sich häufig Spenderabhängigkeiten. Vorangegangene Projekte gaben Hinweise darauf, dass die Stimulierbarkeit der PMN durch LTA spenderabhängig ist. Da für die Aktivierung der Zellen mit LTA CD14 eine Rolle spielt, wurde eine Gruppe von freiwilligen gesunden Spendern auf den CD14-Promotorpolymorphismus getestet und ihre PMN und Monozyten auf ihre Aktivierbarkeit untersucht.

IV. Zur Untersuchung des intrazellulären Parasiten *Leishmania major* in seinen Wirtszellen wurden Leishmanien mit rot und grün fluoreszierenden Proteinen transfiziert.

V. Verschiedene *in vitro* Studien konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten zur Peptidantigenpräsentation in der Lage sind. Allerdings wurden Expressionen der entsprechenden antigenpräsentierenden Moleküle nur auf 2-4 Tage alten Neutrophilen nachgewiesen. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Neutrophilen sollte hier untersucht werden, ob die Expression eines solchen Moleküls nur auf apoptotischen Zellen zu finden ist. Zusätzlich sollte geprüft werden, inwieweit Neutrophile zur T-Zell-Aktivierung durch Lipidantigene beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Leishmanien

Das *Leishmania major* (*Lm*) Isolat MHOM/IL/81/FEBNI zur Transfektion von Leishmanien über Elektroporation mit GFP- und DSRed-haltigen Plasmiden stammte ursprünglich aus der Hautbiopsie eines israelischen Patienten und wurde freundlicherweise von Dr. F. Ebert (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Es stand ein dauerhaft infektiöser Pool an Parasiten zur Verfügung, welcher ursprünglich aus BALB/c-Mäuse stammte, die von Zeit zu Zeit mit Promastigoten aus der *in vitro* Kultur in ihrer stationären Phase infiziert worden waren. Amastigote die aus der Niere oder der Fußsohle isoliert worden waren, wurden in Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert und standen für die hier durchgeführten Versuche zur Verfügung.

2.1.2 Staphylococcus aureus

Es wurden *S. aureus* des Stammes DSM 20233 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) als lebende Bakterien verwendet.

2.1.3 Kulturmedien und Puffer

Annexin-V-buffer	Puffer (1): 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 + 140 mM NaCl Puffer (2): 1 M CaCl ₂ (frisch angesetzt) 1 ml Puffer (1) + 7 µl Puffer (2) mischen
Blockierungslösung	
(IL-8 ELISA)	1 x PBS + 5 mg/ml BSA (Fraktion V), pH 7,4
(IFN- γ ,	
MIP-1 β ELISA)	1 x PBS + 10 % FCS, pH 7

Blutagarplatten

(Novy-Nicolle-McNeal) 50 ml Kaninchenblut + 50 ml PBS + 2 ml Penicillin/Streptomycin + 200 ml Brain Heart Infusion (BHI) Medium (10,4 g BHI Agar in 200 ml destilliertem Wasser)

Coating Puffer

(IL-8-ELISA) 1 x PBS, pH 7,4

(IFN- γ ,

MIP-1 β ELISA) 1 x PBS, pH 9,4

ELISA-Puffer (IL-8) 1x PBS + 5 mg/mL BSA + 0,1 % Tween 20, pH 7,4

(IFN- γ) 1 x PBS, 10 % FCS

(MIP-1 β) 1 x PBS, 10 % FCS, 0,05 % Tween

ELISA Waschpuffer PBS + 0.05 % Tween 20

Elektroporationspuffer 21 mM HEPES (pH 7,5), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂PO₄, 6 mM Glucose

Erylysepuffer NH₄Cl 8,92 g/l + EDTA 0,029 g/l + KHCO₃ 1 g/l, pH 7,5

FACS-Puffer PBS + 1 % humanes Serum + 1 % BSA + 0,01 % Natriumazid

Glucuronidase-Test Puffer 1 6,8 g CH₃COONa•3H₂O ad 500 ml dH₂O, pH 4,0

Glucuronidase-Test Puffer 2 15 g Glycin 0,4 M ad 500 ml dH₂O, pH 10,3

Komplettmedium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium + 50 μ M 2-Mercaptoethanol + 2 mM L-Glutamin + 10 mM HEPES + 100 u/ml penicillin + 100 μ g/ml Streptomycin + 10 % niedrig Endotoxin FCS

LB-Medium

(Luria-Bertani-Broth) 1,0 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 1 % NaCl in dH₂O

PBS 8,0 g NaCl, 1,42 g Na₂HPO₄•H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl ad 1l dH₂O, pH 7,2

Permeabilisierungslösung 0,1 % Triton X-100 in 0,1 % Natriumcitrat

SDM-Agarplatten 1 % Agar, 1 x SDM, 10 % FCS

SDM-Medium	S-MEM 7 g/l, M199 2 g/l, MEM Aminosäuren 8 ml/l, MEM nicht essentielle Aminosäuren 6 ml/l, Glucose 1 g/l, Hepespuffer 8 g/l, MOPS-Puffer 5 g/l, Natriumpyruvat 0,1 g/l, L-Alanin 0,2 g/l, L-Glutamin 0,3 g/l, L-Arginin 0,1 g/l, L-Methionin 0,07 g/l, L-Phenylalanin 0,08 g/l, L-Prolin 0,6 g/l, L-Serin 0,06 g/l, L-Taurin 0,16 g/l, L-Threonin 0,35 g/l, L-Tyrosin 0,1 g/l, L-Adenosin 0,01 g/l, L-Guanosin 0,01g/l, Glucosamin-HCl 0,05 g/l, Folsäure 0,004 g/l, P-Aminobenzoessäure 0,002 g/l, Biotin 0,0002 g/l, NaHCO ₃ 2 g/l, PH 7,3
Stopp-Lösung	2 N H ₂ SO ₄
5 x TBE-Puffer	450 mM Tris, 1,5 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, pH 8,0

2.1.4 Laborausüstung

Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
ELISA-Flachbodenplatte mit Deckel, Medium binding für L.m.-Kultur	Greiner bio-one, Frickenhausen
Finntip 300	Thermo Electron, Oy Vantaa, Finnland
Objektträger "Superfrost"	Menzel, Braunschweig
Mikrotestplatte und Deckel (96-well, V-Boden)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten MaxiSorb™, Polysorb™ (96-well, Flachboden)	Nunc, Wiesbaden
Transwellplatten, 6-, 24- und 96-well, mit Polyester membran Transwell- clear Insert 3,0 µm Porengröße	Corning Life Sciences, NY, USA

2.1.5 Geräte

Analysewaage BP61S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator IG-150	Jouan, Unterhaching
β-Counter Wallac 1409 DSA liquid scintillation counter	Perkin-Elmer, Jügesheim
Densimat	Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Flow-Cytometer: FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg

Genpulser mit Kapazitätsextender	Biorad, CA, USA
Hygromycin b	Sigma, Deisenhofen
Laminar-flow-Werkbank	Biohit, Kölln
Magnetrührer	IKA [®] Labortechnik, Staufen
Mikroskop	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
AxioStar plus	Carl Zeiss, Jena
AxioCam HRc (Digital	
Immunfluoreszenz Mikroskop)	Carl Zeiss, Jena
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
PH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Photometer	
Ultraspec 1000	Amersham Biosciences, Freiberg
Tecan sunrise	Tecan, Crailsheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Power supply EPS 3500XL	Amersham Biosciences, Freiberg
Power supply P25	Biometra, Göttingen
Ricoh HR-10m Kamera	Ricoh, Tokyo, Japan
Scanner Typhoon 8600	Amersham Bioscience, Freiburg
Scanner Umax Astra 6700	Umax Systems GmbH, Willich
Thermostatblock HB130	Peqlab, Erlangen
Tiefkühltruhen, -20, -70°C	Liebherr, Ochsenhausen
Transferpipette	Brand, Wertheim
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze (Hänigsen)
Zellzählkammern	Neubauer, Marienfeld
Zentrifugen	
Biofuge fresco	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Megafuge 2.0R	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Multifuge 3 und SR	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge (Cytospin3)	Shandon, Frankfurt

2.1.6 Chemikalien und Laborreagenzien

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
Agarose PeqGold Universal	Peqlab, Erlangen
L-Alanin	Gibco, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 568 Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Annexin-V- FITC	Roche Diagnostics, Mannheim
L-Arginin	Gibco, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	DeltaSelect, Pfullingen
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Brain Heart Infusion (BHI)	Becton Dickinson, Heidelberg
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Brefeldin A GolgiPlug [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Bromophenol blue dye	Serva, Heidelberg
Calcium chloride	Sigma, Deisenhofen
Chloroform minimum 99 %	Sigma, Deisenhofen
COS Blutagarplatten	Bio Mérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Dihydrorhodamin 123 (DHR)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Dithiotreitol	Sigma, Deisenhofen
DNA Molecular Weight marker	Peqlab, Erlangen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Endothelzellmedium (+supplement pack)	PromoCell, Heidelberg
Erythromycin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol absolute pro analysi	Merck, Darmstadt
Ethidium bromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	

(LPS content 0.523 ng/ml)	Gibco, Karlsruhe
FITC-BSA	Sigma, Deisenhofen
fMLP	Sigma, Deisenhofen
Folsäure	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyde sol. (> 35 %)	Merck, Darmstadt
Geldokumentation	Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammer	
mini SubTM DNA Cell	Bio-Rad, Munich
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Giemsa staining solution, modified	Sigma, Deisenhofen
Glucosamin-HCL	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl- β D-Glucuronid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
β -Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
rekombinant humanes GM-CSF	PeptoTech, Offenbach
Guanosin	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Biochrom, Berlin
Histopaque [®] 1119	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin B	Sigma, Deisenhofen
rekombinant humanes IFN- γ	PeptoTech, Offenbach
rekombinant humanes IL-8	PeptoTech, Offenbach
IMAGEN [®] Mounting Fluid	Dako, Hamburg
Immersion Öl	Carl Zeiss, Jena
Lipopolysaccharid <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma, Deisenhofen
Lymphozytenseparationsmedium 1077	PAA, Pasching, Österreich

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
L-Methionin	Gibco, Karlsruhe
M199, Pulver f. Medium	Sigma, Deisenhofen
MALP-2	Alexis, Lausen, Schweiz
MEM aa	Sigma, Deisenhofen
MEM non essential aa	Sigma, Deisenhofen
rekombinantes humanes MIP-1 β	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumcitrat Dihydrat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	GibcoBRL
Pam ₃ CysSK ₄	emc microcollections, Tübingen
p-Aminobenzoessäure	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyde	Sigma, Deisenhofen
PBS (1 \times) sterile solution	Pharmacy of University of Lübeck, Lübeck
PBS (10 \times) sterile solution	Gibco, Karlsruhe
PBS, Instamed, Dulbecco w/o Mg, Ca	Biochrom, Berlin
L-Phenylalanin	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin-A	Sigma, Deisenhofen
Percoll [®]	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PMSF	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl- β D-Glucuronid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

L-Prolin	Gibco, Karlsruhe
Protein G Sepharose 4 fast flow	Amersham Bioscience, Heidelberg
Rabbit blood	Elocin-lab GmbH, Mülheim
RPMI 1640 Medium	Sigma, Deisenhofen
<i>S. aureus</i> -Alexa 594	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
L-Serin	Gibco, Karlsruhe
S-MEM	Sigma, Deisenhofen
TAE (10x)	Amersham Bioscience, Heidelberg
L-Taurin	Sigma, Deisenhofen
L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
L-Tyrosin	Gibco, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblaulösung 0.4 %	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 für Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen
Urea	Sigma, Deisenhofen

2.1.7 Radiochemikalien

[3H]Thymidin	ICN Biomedicals, Eschwege
--------------	---------------------------

2.1.8 Antikörper

monoklonal Maus anti human

CD1a (RD1; IgG1 κ , Klon T6-RD1)	Beckmann Coulter, Fullerton, US
CD1b (RPE; (IgG1 κ , Klon K5-1B8)	BD Biosciences, Heidelberg
CD11b (PE; IgG1, Klon 2LPM19c)	Dako, Hamburg
CD14 (PE; IgG2a, Klon TÜK4)	Dako, Hamburg
CD14 (IgG1, Klon 18D11)	Diatec, Hamburg
CD62L (PE; IgG1, Klon Dreg-56)	BD Biosciences, Heidelberg

CD66b (FITC; IgG1, Klon 80H3)	Immunotech, Hamburg
CD69 (RPE; IgG1 κ , Klon FN50)	DAKO, Hamburg
HLADR (PE; IgG2a κ , Klon L263)	BD Biosciences, Heidelberg
MIP-1 β (IgG2b, Klon 24006) (Coating antibody)	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
TLR2 (IgG2a, Klon TL2.1)	eBioscience, San Diego, CA, USA
TLR4 (IgG2a, Klon HAT125)	Imgenex, San Diego, CA, USA
weitere Antikörper	
Mouse IgG1, Isotypkontrolle (FITC; Klon 18D11)	Diatec, Hamburg
Mouse IgG1, Isotypkontrolle (FITC; Klon 18D11)	Diatec, Hamburg
Mouse IgG2a κ , Isotypkontrolle (RPE; Klon eBM2a)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2b, Isotypkontrolle (PE; Klon eBM2a)	eBioscience, San Diego, CA, USA
MIP-1 β (Ziege IgG) (biotinylierter Antikörper)	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt

2.1.9 Kits

EndoFree Plasmid Maxi Prep	Qiagen, Valencia, CA, USA
h-IL-8 ELISA CytoSet™	Biosource, Camarillo, CA, USA
NucleoSpinExtract	Macharey-Nagel, Easton, PA, USA
sCD14 ELISA Quantikine® HS immunoassay	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
OptEIA™ h-IFN- γ Set	BD Biosciences, Heidelberg
TMB substrate reagent set	BD Biosciences, Heidelberg
Phagotest®	ORPEGEN Pharma

2.1.10 Software

Statistical analysis

GraphpadPrism®, Version 4.01	San Diego, CA, USA
------------------------------	--------------------

SPSS™, Version 13

SPSS Inc., Chicago USA

Instrument Software

CellQuest® (cytometry)

Becton Dickinson, Heidelberg

WinMDI (cytometry)

Freeware, Copyright© Joseph Trotter

Magellan® (ELISA)

Tecan, Crailsheim

2.1.11 Primärzellen und Zelllinien

HUVEC

Oligene GmbH, Berlin

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus humanem Vollblut

Vollblut wurde von gesunden freiwilligen Spendern mit Hilfe von Lithium-Heparin S-Monovetten abgenommen.

2.2.1.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Heparinisiertes Vollblut wurde auf einen Gradienten aus Histopaque® 1119 (untere Schicht) und Lymphozytenseparationsmedium 1077 (obere Schicht) geschichtet und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, gefolgt von einer 20 min dauernden Zentrifugation bei 800 x g. Nach der Zentrifugation wurde zunächst das Plasma abgenommen, dann die oberste Zellschicht, hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten (PBMCs) bestehend, abgenommen und für die Monozytenaufreinigung weiter verwendet. Die granulozytenreiche Phase über der Erythrozyten-Phase (Abb. 7) wurde anschließend entnommen und mit PBS bei ca. 380 x g für 10 min gewaschen und das Zellpellet in Zellkultur-Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf einen geschichteten Percoll®-Gradienten mit den Dichten (absteigend von unten nach oben) 1,105 g/mL (85%), 1,100 g/mL (80%), 1,093 g/mL (75%), 1,087 g/mL (70%) sowie 1,081 g/mL (65%) aufgetragen und 30 min bei 800 x g zentrifugiert. Nur der Bereich zwischen 70% und 80% Percoll wurde abgenommen und mit PBS bei ca. 220 x g für 10 min gewaschen. Die Isolation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellzahl und

Zellviabilität wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und der Vitalfärbung mit Trypanblau bestimmt. Dabei betrug die Zellviabilität >99%.

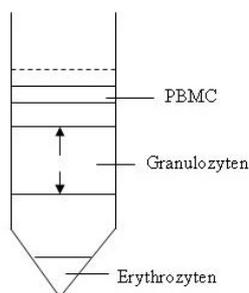


Abb. 7 Dichtegradient einer Vollblutprobe.

2.2.1.2 Monozyten

Zur weiteren Aufreinigung der Monozyten wurden die PBMC vom Histopaque-Gradienten 3 x bei 150 g in PBS (37°C) gewaschen und dann für 1,5 h in RPMI-Medium in Zellkulturflaschen bei 37°C adhären gelassen. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen weitere 3 x mit PBS (37°C) gewaschen.

2.2.2 Analyse der Reinheit der Zellen

Die Reinheit der isolierten PMNs wurde durch ein Zytopspin bestimmt. Dazu wurden auf einen Objektträger 100.000 Zellen bei 400 x g für 5 min in der Zytozentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen luftgetrocknet und 5 min in Methanol fixiert. Der Objektträger mit den fixierten Zellen wurde für 45 min mit 1:20 (Aqua dest.) verdünnter Giemsa-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden ca. 200 Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und anhand morphologischer Eigenschaften als Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten klassifiziert. Ca. 1000 Zellen wurden insgesamt ausgezählt, um den Anteil der Monozyten und Lymphozyten zu bestimmen. Die Zellpräparationen enthielten >99,9 % Granulozyten. Der Anteil der Eosinophilen betrug je nach Spender zwischen 0,1 % und 20 %.

2.2.3 DNA-Isolation

Es wurden 1×10^6 PBMC/100 μ l PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert. Später wurden die Proben aufgetaut und eine DNA-Isolation mit dem NucleoSpinExtract-Kit nach Angaben des Herstellers für das Standardprotokoll für Human-oder Tiergewebe

durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Integritäts- und Reinheitsprüfung der DNA. Dazu wurde die DNA im Photometer bei 260 nm gemessen und die Verunreinigung durch Proteine bei 280 nm gemessen. Anschließend wurde eine PCR auf GAPDH durchgeführt.

2.2.4 Erythrozytenlyse

Es wurden 200 µl Vollblut in 45 ml Lysispuffer gegeben. Nach 2-3 min wurden 5 ml PBS (10 x) hinzugefügt und der Ansatz bei 800 g 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,5 ml PBS noch einmal bei 800 g zentrifugiert. Es wurde die Zellzahl auf 1 Mio/ml eingestellt und eine FACS-Färbung durchgeführt.

2.2.5 Kultur von HUVEC

Es wurden Primärzellen von Oligene genutzt. HUVECs wurden in Endothelzellmedium in unbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert und jeweils bei ca. 75% igem Bewuchs passagiert. Es wurden keine Passagen älter als die 10. benutzt. Zum Ablösen der Zellen wurde Accutase nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.2.5.1 Kultur von HUVEC in Transwelleinsätzen

Costar-Transwell-Einsätze wurden 18 h mit 0,5 % Gelatine bei 37°C beschichtet. 500.000 HUVEC/ml in Endothelzellmedium wurden in die mit Gelatine beschichteten Transwells nach Angaben des Herstellers gegeben. 5 Tage wurden die HUVECs auf dieser Gelatine-beschichteten Membran zu einem konfluenten Monolayer gezogen. Mit Hilfe einer Phalloidinfärbung bzw. eines FITC-BSA- Tests wurde die Konfluenz des Monolayers überprüft.

2.2.5.2 Phalloidinfärbung

Um die Konfluenz der HUVEC-Monolayer zu bestimmen, wurden die HUVEC nach 5 Tagen Kultur in einem mit Gelatine beschichteten Transwelleinsatz mit Alexa Fluor® 568 Phalloidin gefärbt. Es wurde dabei vorgegangen, wie vom Hersteller des Farbstoffes für formaldehydfixierte Zellen empfohlen. So wurden die HUVEC in Formaldehyd fixiert und mit Triton x 100 lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Farbstoff inkubiert und danach mit PBS gewaschen und unter dem

Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Der phalloidingefärbte Ansatz stellte einen Kontrollansatz dar und wurde nicht in den Experimenten eingesetzt.

2.2.5.3 FITC-BSA-Test

Vor jedem Transmigrationsassay wurde die Konfluenz des HUVEC-Monolayers über den FITC-BSA-Test bestimmt. Es wurden 100 µl einer Lösung aus FITC-BSA (6,5 mg/ml) in PBS in das obere Kompartiment einer Transwellplatte gegeben („Test“), in dem unteren befanden sich bereits 600 µl PBS. Zudem wurden in ein Loch der 24-well-Platte 700 µl PBS („0%“), in ein anderes 600 µl PBS + 100 µl FITC-BSA („100 %“) gegeben. Die Testplatte wurde 60 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Transwelleinsatz herausgenommen und verworfen. Der Inhalt der drei wells wurde in 100 µl Portionen in eine unbehandelte 96-well-Platte gegeben. Die OD wurde im ELISA-Reader bei 495 nm gemessen. Die Durchmischung zwischen oberem und unterem Kompartiment wurde über folgende Formel berechnet:

$(mw^{„Test“} - mw^{„0 \%“}) / (mw^{„100 \%“} - mw^{„0 \%“})$, dabei ist mw= Mittelwert

Nur bei einer Durchmischung von 5 % oder weniger wurde ein Transmigrationsexperiment durchgeführt.

2.2.6 Kultur von Leishmanien

Amastigote Leishmanien wurden *in vitro* auf Blutagarplatten (Novy-Nicoll-McNeal) gehalten, bzw. nach Transfektion mit den Plasmiden in SDM-Flüssigmedium mit 20 µg/ml Hygromycin bei 26°C.

2.2.7 Bakterienkultur

S. aureus des Stammes DSM 20233 wurden auf Columbia Sheep- Blutagarplatten (COS) bei 37°C gehalten. Die Bakterien wurden für die Versuche in Kompletmedium ohne Pen/Strep resuspendiert und mit Hilfe eines Densimeters quantifiziert. Dazu wurde der McFarland Standard genutzt (McF von 0,5 entsprach ca. $1,5 \times 10^8$ Bakterien/ml).

2.2.8 Koinkubation der PMN mit Leishmanien und anderen Stimuli

PMN und PBMC wurden im Kompletmedium bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂, die PMN in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro ml und die

PBMC in einer Konzentration von 2×10^6 , in Gewebekulturplatten gehalten. Die Morphologie der PMN wurde unter einem Inversionsmikroskop begutachtet und z.T. mit einer Axiocam HRC Kamera photographiert.

2.2.8.1 Leishmanien

Leishmanien, die sich in der stationären Phase befanden, wurden mit PMN in einem Verhältnis Parasit:PMN von 5:1 bei 37°C und 5 % CO₂ koinkubiert. Anschließend wurde sowohl eine Giemsa-Färbung als auch eine FACS-Färbung durchgeführt.

2.2.8.2 Andere Stimuli

Es wurden jeweils die unterschiedlichen Mengen verschiedener Stimuli zu den PMN bzw. zu den PBMC in das RPMI-Medium gegeben und die Zellen je nach Versuch für 1 h bis zu 72 h, bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. PMN wurden u.a. mit hochaufgereinigtem endotoxinfreiem LTA (freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. T. Hartung und Dr. S. Morath, Abteilung für Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt) in Konzentrationen von 10 µg/ml (PBMC und PMN) und 30 µg/ml (PMN) stimuliert.

Die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wurden in den folgenden Konzentrationen bei den PMN eingesetzt: MALP-2 in den Konzentrationen von 10 pg/ml bis hin zu 100 µg/ml in Vorversuchen und anschließend immer in 10 ng/ml. Pam₃CysSK₄ wurde in Vorversuchen in 100 pg/ml-100 µg/ml und anschließend immer in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

LPS wurde in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml (300 u/ml) für PMN und 100 pg/ml für PBMC eingesetzt.

GM-CSF und IFN γ wurden in der Konzentration von 100 u/ml bei den PMN eingesetzt.

2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf den verschiedenen Zellen wurden 5×10^5 Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, 2 x in einer 96-well-V-Boden-Platte mit je 150 µl FACS-Puffer gewaschen, 20 Minuten lang mit dem entsprechenden mAb zusammen auf Eis inkubiert und schließlich noch 2 x gewaschen und in 1% Paraformaldehyd aufgenommen bzw. fixiert. Die Analyse der

Zellen erfolgte mit Hilfe vom FACSCalibur[®] Flowcytometer unter Nutzung von CellQuest[®] Software. Dabei wurde zur Bestimmung des Mittelwertes der Oberflächenexpression x immer das geometrische Mittel (m_G) genommen, da es, verglichen mit dem üblichen Mittelwert, für logarithmische Skalen die bessere Annäherung bietet.

2.2.10 Bestimmung der Apoptoserate der PMN

2.2.10.1 Morphologische Bestimmung der Apoptoserate

Die Zellkernlappen apoptotischer Neutrophiler Granulozyten trennen sich zu separaten Kernteilen auf. Da diese pyknotischen Kerne von apoptotischen PMN dunkler anfärben (Payne et al, 1994; Squier et al 1995) wurde hier zur Bestimmung der Apoptoserate unter den PMN eine Giemsa-Färbung der verschiedenen Zytospins unterschiedlich behandelter PMN angefertigt. Es wurden unter der Öl-Immersionslichtmikroskopie jeweils ca. 200 Zellen ausgewertet.

2.2.10.2 Annexin-V-Binding

Apoptotische Zellen bringen in einer Art Membran-Flip-Flop Phosphatidylserin (PS) aus ihrer inneren Zellmembranschicht auf ihre Oberfläche (Homburg, 1995). Annexin-V bindet nun an dieses Phosphatidylserin. Wir haben Annexin-V-Fluos genutzt, um Zellen, die PS auf ihrer Oberfläche besitzen (PS-positive Zellen), zu markieren. Der Anteil dieser PS-positiven Zellen wurde daraufhin mit Hilfe des FACSCalibur[®] unter Nutzung der CellQuest[®] Software bestimmt. Da die Annexin-Bindung an das PS Ca_2^+ -abhängig ist, wurde in diesem Fall anstelle des normalen FACS-Puffers und Paraformaldehyds ein spezieller Ca_2^+ -haltiger Annexin-Puffer verwendet.

2.2.11 Spenderpool und Bestimmung des CD14 Promotorpolymorphismus

Es wurde von 26 freiwilligen Spendern Blut abgenommen und die Monozyten isoliert. Anschließend wurde die DNA aus den Zellen isoliert. Der Polymorphismus wurde in Kooperation mit Dr. J. Rupp, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck, über eine PCR und einen anschließenden Restriktionsverdau bestimmt. Insgesamt wurden 26 Spender auf den CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T untersucht. Homozygote Träger des T-Allels werden mit TT, homozygote

Träger des C-Allels mit CC bezeichnet. Innerhalb der einzelnen Experimente wurden die CC- mit den TT-Genotypen verglichen.

2.2.12 Bestimmung von Zytokinen in Zellüberständen

Zur Bestimmung der von den PMN freigesetzten Zytokinen wurden ELISA jeweils nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Dazu wurden zellfreie Überstände der unterschiedlich stimulierten PMN-Ansätze mit jeweils 5×10^5 PMN/ml nach den entsprechenden Zeitpunkten gesammelt und bei -20°C bis zum Einsatz im ELISA eingefroren. Zur IL-8-Bestimmung wurde der IL-8 CytoSet™ ELISA eingesetzt. Das Detektionslimit betrug hier 30 pg/ml. IFN- γ wurde in dne Überständen mit Hilfe des OptEIA™ human IFN- γ -Sets mit einem Detektionslimit von 50 pg/ml bestimmt. MIP-1 β wurde in den Überständen mit Hilfe der *Capture*-Antikörper und der Detektionsantikörper nach Angaben des Herstellers für einen ELISA eingesetzt. Das Detektionslimit lag hier unter 200 pg/ml .Das lösliche CD14 (sCD14) wurde wiederum mit Hilfe des Quantikine® HS Immunoassays mit einem Detektionslimit von 120 pg/ml bestimmt.

2.2.13 Transmigrationstest

Es wurden PMN (5×10^6 /ml) in 100 μl Medium in einen mit einem HUVEC-*Monolayer* beschichteten Transwelleinsatz gegeben und dieser in eine 24-Lochplatte mit 600 μl Medium mit 200 ng/ml IL-8 eingehängt. Teilweise wurde n das untere kompartment des Transwells auch noch LPS (100 ng/ml oder 10 ng/ml) oder MALP-2 (10 ng/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden 3-5 h bei 37°C inkubiert und anschließend der Transwelleinsatz entfernt. Die transmigrierten PMN wurden auf 2×10^6 /ml eingestellt, dazu wurde das Medium aus dem unteren Transwelleinsatz verwendet. Die transmigrierten PMN wurden für veschiedene Tests weiterverwendet.

2.2.14 Chemotaxistest, Chemokinesetest

Zur Bestimmung der chemotaktischen Eigenschaften von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ auf humane neutrophile Granulozyten wurden MALP-2 (10 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (10 μg /ml) oder fMLP (0,1 μM), welches als Positivkontrolle diente, in unterschiedlichen Konzentrationen in die untere Kammer eines 24-Loch-Transwell Systems entsprechend

den Anweisungen des Herstellers gegeben. Die obere Kammer wurden mit PMN (5×10^6 /ml) befüllt. Zur Kontrolle wurde in einigen Experimenten auch MALP-2 (20 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (20 µg/ml) oder fMLP (0,2 µM) in die obere Kammer zu den PMN gegeben, um zu testen, ob es sich bei der Durchwanderung der Granulozyten vom oberen Kompartiment in das untere Kompartiment tatsächlich um Chemotaxis und nicht nur um Chemokinese handelte. Beide Kammern (obere und untere) wurden jeweils durch eine Membran mit Poren des Durchmessers von 3,0 µm voneinander getrennt. Die Kammern wurden 90 min bei 37°C in einer humiden Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellzahl der in dieser Zeit durch die Membran gewanderten PMN im unteren Kompartiment wurde mit Hilfe des β-Glucuronidase-Tests bestimmt (63).

2.2.15 β-Glucuronidase-Test

Zur Bestimmung der Zellzahl der Zellen aus dem Chemotaxis bzw. dem Chemokinese-Test wurde der β-Glucuronidase-Test durchgeführt. Dazu wurden die PMN aus dem unteren Kompartiment des Transwells in 600 µl Medium mit 100 µl 0,1 % TritonX-100 in 5 min lysiert. Es wurden die Ansätze mit 600 µl 4°C Glucuronidase-Test-Puffer 1, der 25 mg/10 ml p-Nitrophenyl-βD-Glucuronid enthielt, versetzt. Die Ansätze wurden für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden den einzelnen Ansätzen 600 µl des Glucuronidase-Test-Puffer 2 hinzugefügt. Die einzelnen Ansätze wurden nun zu je 2 x 300 µl in eine 96-Wellplatte gegeben und die OD bei 405 nm im Photometer bestimmt. Standardkurven wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Ansätzen mit bekannten Zellzahlen erstellt und mit ihnen die Zellzahl gewanderter PMN kalkuliert.

2.2.16 Analyse der Phagozytoserate der PMN

2.2.16.1 Phagozytostest mit lebenden *Staphylococcus aureus*

Zur Bestimmung der phagozytotischen Aktivität der PMN in Reaktion auf die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wurden lebende *S. aureus* des Stammes DSM 20233 genutzt. Es wurden 5×10^6 PMN/ml für 75 min bei 37°C in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit verschiedenen Stimuli koinkubiert. Anschließend wurden $1,5 \times 10^7$ Bakterien hinzugefügt. Diese wurden 8 min bei 210 g herunterzentrifugiert und die Ansätze für 25 min bei 37°C koinkubiert. Die Phagozytose wurde durch Zugabe von

eiskaltem PBS gestoppt und die Zahl derjenigen PMN, welche Bakterien phagozytiert hatten, mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Zytospins bestimmt.

2.2.16.2 Phagozytostest mit toten *S. aureus*

Die Untersuchung der Phagozytoseaktivität von PMN im Rahmen der Untersuchung des CD14-Promotorpolymorphismus wurde mit abgetöteten, rot-fluoreszierenden Alexa 594-markierten *S. aureus* durchgeführt. Die Fluoreszenz der phagozytierten Bakterien erlaubt die Detektion der neutrophilen Granulozyten mit Bakterien im Durchflusszytometer. PMN wurden isoliert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Bakterien:PMN wurden im Verhältnis 10:1 eingesetzt. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die gleichen Ansätze als „Doppelansatz“ für 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die weitere Phagozytose durch Kühlung aller Ansätze auf Eis gestoppt. Durch Zugabe von 100 µl eiskalter Quenching-Lösung wurde die Fluoreszenz von in Lösung befindlichen, nicht phagozytierten oder an der Zelloberfläche klebenden Bakterien unterdrückt. Im Anschluss wurde zu den Ansätzen Waschlösung hinzugegeben und diese bei 4°C und 250 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in Waschlösung resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und die Zellen letztendlich in PBS wieder resuspendiert. Anschließend wurde der Anteil der PMN, welcher Bakterien phagozytiert hatte, am Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.17 Oxidativer Burst-Test

Die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde über die Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zu dem grün fluoreszierenden Rhodamin 123 (64) gemessen. Dazu wurden $1 \times 10^6/200$ µl PMN bei 37°C mit verschiedenen Stimuli für 90 min in RPMI + 1 % FCS inkubiert. Danach wurde DHR für 5 min hinzugefügt und entweder gleich weiterverarbeitet oder für weitere 5 min mit 1 µM fMLP inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und direkt im Anschluß daran die Fluoreszenz-Intensität der Zellen mit dem FACSCalibur® unter Nutzung der CellQuest® Software bestimmt.

2.2.18 Blockierung von CD14, TLR2 und TLR4 auf PMN

Blockierungsexperimente wurden durchgeführt, um die Bedeutung von CD14 für MALP-2 und Pam₃CysSK₄ zu ermitteln. Die PMN wurden mit 10 µg/ml anti-CD14 mAb oder mit einem Isotypkontrollantikörper bei 26°C und 5 % CO₂ für 30 min inkubiert und anschließend für 20 h mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ koinkubiert.

2.2.19 T-Zell-Proliferationstest

Es wurden die CD1b-spezifischen T-Zellen LDN4 (*) aufgetaut und für 20 h in RPMI-Medium mit 10 % humanem AB-Serum gehalten. Anschließend wurden sie in RPMI-Medium mit 10 % FCS gewaschen. Ebenso wurden CD1-positive mit 5000 rad bestrahlte heterologe DC (*) am Versuchstag aufgetaut und in RPMI-Medium mit 10 % FCS gegeben. PMN wurden aus Frischblut isoliert. Die mykobakteriellen Antigene (*) wurden 1:1000 eingesetzt. Von den T-Zellen, den DC und den PMN wurden jeweils 10.000 Zellen in 200 µl gegeben. Die Ansätze wurden in eine 96-Loch-Zellkulturplatte gegeben und für 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde für 6 h [³H]Thymidin (1 µCi/ml) hinzugefügt. Über den Cell-Harvester wurden die Zellen danach gewaschen und ihr Gehalt an [³H]Thymidin im β-Counter gemessen. (* die T-Zellen, DCs und die mykobakteriellen Antigene wurden freundlicherweise von Dr. P. Sieling und Prof. Dr. Modlin, Universität Kalifornien, Los Angeles (UCLA) zur Verfügung gestellt).

2.2.20 Plasmidpräparation aus einer Bakterienexpressionskultur

Um eine ausreichende Menge an Plasmiden für die Transfektion der Leishmanien zu erhalten, wurden Bakterien die bereits mit Plasmiden (*) transfiziert waren, in LB-Medium in Kultur genommen. Zur Selektion war das LB-Medium mit 20 µg/ml Hygromycin versetzt. Anschließend wurden die Plasmide aus ihnen mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Prep-Kits isoliert. Die Isolation erfolgte nach Anweisung des Herstellers für Plasmide mit hoher Kopienzahl. Die DNA wurde anschließend auf einem 0,8 %igen Agarosegel in TBE überprüft. Dazu wurde 1 µl DNA aufgetragen. (* freundlicherweise von Dr. T. Aebischer zur Verfügung)

2.2.21 Linearisierung der DNA

Die Plasmide wurden einem Restriktionsverdau unterzogen. Dazu wurden sie mit 0,2 u/µg *pacI* und 2,9 u/µg *pmeI* koinkubiert. Der Verdau wurde auf einem 0,8 % Agarosegel mit TBE überprüft und die Plasmidfragmente über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurden sie aus dem Gel isoliert und mit Hilfe des NucleoSpinExtract Kits aufgereinigt. Die Reinheit wurde mit Hilfe eines Photometers über die OD bestimmt.

2.2.22 Erstellung transgener fluoreszierender L.m. über homologe Rekombination in einen rRNA-Lokus

Zur Erstellung transgener fluoreszierender Leishmanien standen zwei Vektoren zur Verfügung (*). Der eine kodierte für eine Hygromycinresistenz und für das grün fluoreszierende Protein *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), der andere kodierte für das rot fluoreszierende Protein „DsRed“. Es wurden $2,5 \times 10^8$ Leishmanien der Art *Leishmania major* (*L.m.*) 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und anschließend in 5-10 ml Elektroporationspuffer (EPB) gewaschen. Die L.m. wurden in einer Dichte von 10^8 /ml im EPB aufgenommen. Anschließend wurde die für GFP- oder DsR kodierenden linearisierten DNA (5 µg) über Elektroporation mit 500 µF und 450 V (2,25 kV/cm in einer 0,2 cm Kuvette) in die Leishmanien eingebracht. Die Leishmanien wurden danach 10 min auf Eis inkubiert und für weitere 24 h in Kultur ohne Antibiotika gehalten, um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Danach wurden die Leishmanien bei 3600 rpm zentrifugiert, in 200 µl SDM aufgenommen und schließlich je 100 µl auf SDM-Agarplatten mit 40 µg/ml Hygromycin ausplattiert. Die Platten wurden über drei Wochen täglich auf wachsende Leishmanien-Kolonien überprüft. Eine solche Kolonie wurde, sobald sie sichtbar wurde, in eine SDM-Flüssigkultur mit 20 µg/ml Hygromycin B überimpft. (* freundlicherweise von Dr. T. Aebischer zur Verfügung gestellt).

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch transendotheliale Migration

Bei Infektionen wandern Neutrophile aus der Blutbahn durch die Endothelzelleinzelschicht der Gefäße in das infizierte Gewebe. Die Einwanderung von der Blutbahn in das Gewebe wird auch als transendotheliale Migration (TEM) oder Diapedese bezeichnet. Bei der Diapedese kommt es zu einem regen Signalaustausch zwischen Leukozyten und Endothelzellen (66). Der Durchtritt durch die Zellschicht und die Basalmembran verändert dabei die Neutrophilen, indem es zu ihrer Aktivierung führt (67).

In diesem Teil der Arbeit wurde ein *in vitro* Transmigrationssystem etabliert, um neutrophile Granulozyten zu generieren, welche den in einer Entzündung relevanten „Gewebsgranulozyten“ ähneln. Anschließend wurden die transmigrierten Granulozyten charakterisiert.

3.1.1 Die Nutzung Gelatine-beschichteter Transwellsysteme führt zu einer konfluenten Endothelzelleinzelschicht

Bei der Diapedese durchwandern PMN die Endothelzellschicht der Blutgefäße. Um eine Endothelzelleinzelschicht (Monolayer) *in vitro* zu generieren wurde ein Transwellsystem mit humanen Nabelschnurzellen (HUVEC) etabliert. Zunächst wurde in diesem System getestet, welche Trägersubstanz für die HUVEC-Zellschicht am geeignetsten ist, um eine Basalmembran zu simulieren. Dazu wurden 50.000 HUVEC in 100 µl Endothelzellmedium in einen mit Gelatine oder mit Kollagen beschichteten Transwelleinsatz mit 3,0 µm-Poren gegeben. In dem unteren Kompartiment des Transwells befanden sich 600 µl Endothelzellmedium. Nach 5-tägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Alexa Fluor 568 Phalloidin gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop photographiert. Phalloidin ist ein Pilztoxin, welches eine hohe Affinität zum F-Actin aufweist. Die Kopplung von Phalloidin an den

Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 568 erlaubt es, das Zytoskelett von Zellen anzufärben und sie im Fluoreszenzmikroskop auch auf der Trägermembran sichtbar zu machen, auf der sie ohne Färbung nicht sichtbar sind. Nach fünf Tagen Kultur von HUVEC auf beiden Substanzen zeigte sich nur auf den mit Gelatine beschichteten Transwelleinsätzen ein konfluenten HUVEC-Monolayer (Abb. 9a), nicht aber auf den mit Kollagen beschichteten Transwelleinsätzen (Abb. 9b). Somit eignete sich in unserem System nur die Gelatine als Bewuchsmaterial für die HUVEC. Es wurden alle folgenden Versuche bezüglich der *in vitro* TEM in dem hier mit Gelatine etablierten System durchgeführt.

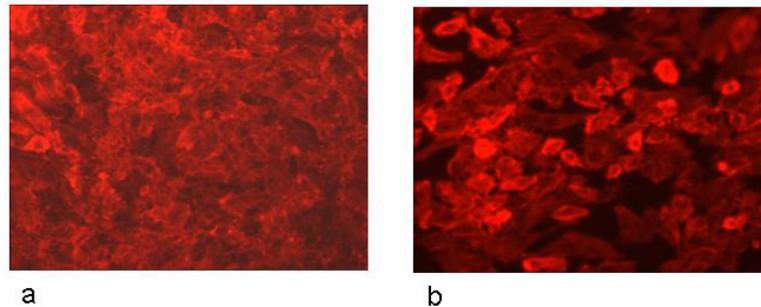


Abb. 9 HUVEC-Monolayer lassen sich auf einer Gelatine-beschichteten Membran kultivieren. Es wurden 50.000 HUVEC in 100 μ l Endothelzellmedium in einen mit Gelatine beschichteten Polyester membran-Transwelleinsatz mit 3,0 μ m-Poren (a) oder in einen mit Kollagen beschichteten Transwelleinsatz mit 3,0 μ m-Poren (b) gegeben. Nach 5-tägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Alexa Fluor 568 Phalloidin gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Originalvergrößerung 400x.

3.1.2 Die Transmigration aktiviert neutrophile Granulozyten

Um zu testen, inwieweit die Transmigration in dem hier genutzten System die PMN aktiviert, wurden PMN auf die Oberflächenexpression von gängigen Aktivierungsmarkern untersucht. CD62L ist ein Molekül, welches auf nicht aktivierten PMN exprimiert wird. Nach Aktivierung der Zellen wird CD62L jedoch mit Hilfe von Proteasen entfernt (*Shedding*) und so herunterreguliert (68). CD11b ist ein weiteres Oberflächenmolekül auf PMN. Die Hochregulation von CD11b ist ein Zeichen für die

Exozytose von Granula (69). Da diese Exozytose eine wichtige Funktion aktivierter PMN darstellt (70), ist die Hochregulation von CD11b auf PMN ebenfalls ein Zeichen für die Aktivierung der Zellen. Es wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) mit IL-8 (200 ng/ml) zur Transmigration angeregt. Das Transmigrationssystem ist in Abb. 10 dargestellt. Nach 3 h war knapp die Hälfte der ursprünglich in das obere Kompartiment gegebenen Zellen in das untere Kompartiment migriert, wie nach Auszählung der im unteren Kompartiment vorhandenen PMN ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es wurden die transmigrierten PMN für weitere 5 h bei 37°C in Medium mit IL-8 (200 ng/ml) inkubiert. Die nicht-transmigrierten PMN wurden die gesamten 8 h in Medium oder in Gegenwart von IL-8 (200 ng/ml) inkubiert. Die PMN wurden mit einem anti-CD11b-PE- oder mit einem anti-CD62L-PE-Antikörper oder mit Isotypkontrollantikörpern gefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Nach der Transmigration war eine starke Oberflächenexpression von CD11b auf den PMN vorhanden, im Gegensatz zu den nicht-transmigrierten PMN (Abb. 11a). Die CD62L-Oberflächenexpression der PMN wurde nur nach Transmigration herunterreguliert (Abb. 11b). Somit konnte über beide Aktivierungsmarker eine Aktivierung der PMN nach Transmigration festgestellt werden.

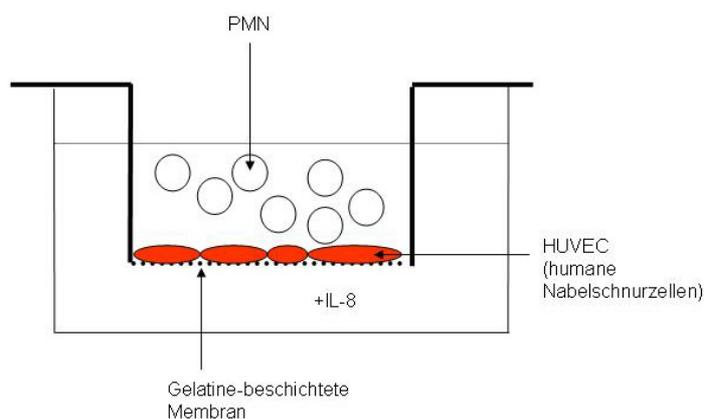


Abb. 10 *In vitro* Transmigrationssystem. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in die obere Kammer des Transwellsystems gegeben. Das Transwellsystem bestand aus einem konfluenten HUVEC-Monolayer auf einer Gelatineschicht. Die Trägermembran besaß $3,0 \mu\text{m}$ -Poren. Eine Transmigration wurde durch Zugabe von IL-8 (200 ng/ml) induziert. Nach 3 h wurde der Transwelleinsatz mit dem HUVEC-Monolayer entfernt und die im unteren Kompartiment des Transwells vorliegenden PMN wurden für die verschiedenen Versuche weiterverwendet.

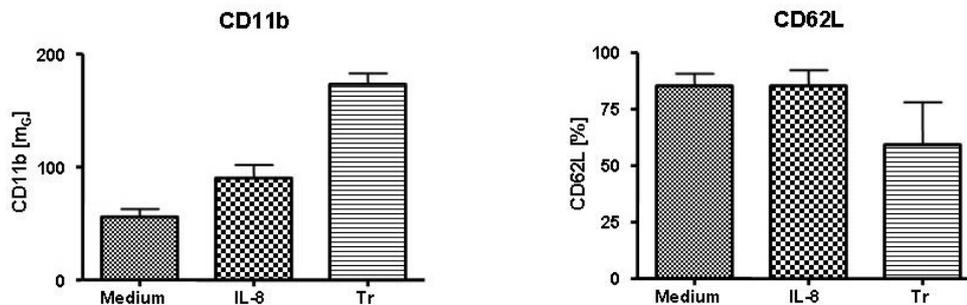


Abb. 11 Transendotheliale Migration führt zu einer starken Oberflächenexpression von CD11b, sowie zu einer Herunterregulation von CD62L auf PMN. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) transmigrierten 3 h durch IL-8 (200 ng/ml) induziert. Anschließend wurden die PMN noch für 5 h bei 37°C inkubiert oder sie wurden die gesamten 8 h in Medium oder mit IL-8 (200 ng/ml) inkubiert. Die PMN wurden mit einem anti-CD11b-PE- oder mit einem anti-CD62L-PE- Antikörper gefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Es ist die mittlere Oberflächenexpression von CD11b angegeben [mC] und der Prozentanteil der CD62L-positiven Zellen [%]. Bei den Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte \pm SD der CD11b-Expression auf PMN aus drei Experimenten bzw. der CD62L-Expression auf PMN aus vier Experimenten.

3.1.3 Die Transmigration führt zu einer Vorstimulation der neutrophilen Granulozyten für eine LPS-induzierte Oberflächenexpression von CD69

Wie unter 1.1.2 gezeigt, aktiviert transendotheliale Migration neutrophile Granulozyten. Zusätzlich zu den Aktivierungsmarkern CD11b und CD62L (Abb. 11) wurde hier die Expression des frühen Leukozytenaktivierungsmoleküls CD69 untersucht. CD69 wird zumindest *in vitro* eine proinflammatorische Wirkung, wie z.B. durch die Induktion der Exozytose von Granula bei PMN, zugeschrieben (71). Neuerdings gibt es allerdings auch Hinweise auf eine regulatorische Funktion von CD69 durch Induktion der Freisetzung des antiinflammatorischen Moleküls TGF- β (72). Um zu prüfen, ob die Transmigration auch die Oberflächenexpression von CD69 induziert, wurden zuerst PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) durch IL-8 (200 ng/ml) zur Transmigration angeregt. Dabei befand sich in einem Transmigrationsansatz im unteren Kompartiment LPS (100 ng/ml)

zusammen mit IL-8 (200 ng/ml), in einem anderen nur Medium. Nach 3 h wurde der Transwelleinsatz herausgenommen und die Zellen für weitere 18 h in Medium oder mit LPS inkubiert. Zur Kontrolle wurden PMN auch ohne Transmigration für 18 h in Medium oder mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der CD69-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Transmigration konnte ohne nachfolgende Stimulation keine CD69-Oberflächenexpression auf den PMN hervorrufen, ebenso wenig wie die alleinige Stimulation mit LPS. CD69 wurde nur nach Transmigration mit anschließender Stimulation mit LPS auf den Neutrophilen exprimiert (Abb. 12). Dies bedeutet, dass die Transmigration neutrophile Granulozyten für eine LPS-induzierte Expression von CD69 vorstimuliert.

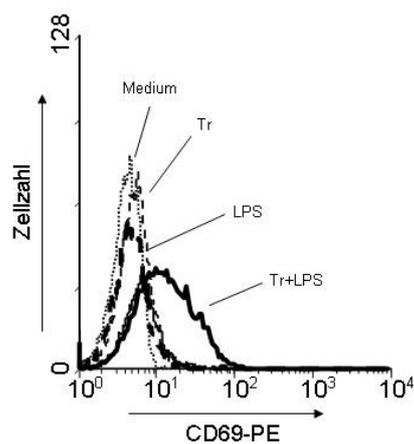


Abb. 12 Transendotheliale Migration mit anschließender Stimulation durch LPS führt zu einer Oberflächenexpression von CD69 auf PMN. PMN (5×10^6 /ml) transmigrierten für 3 h durch IL-8 (200 ng/ml) induziert und wurden anschließend 18 h in Medium oder mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Färbung im Durchflusszytometer ausgewertet und in einem Histogramm graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente. (Tr = Transmigration)

3.1.4 Die Transmigration stimuliert neutrophile Granulozyten für eine fMLP-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor

Als Phagozyten sind die PMN verantwortlich dafür, eingedrungene Pathogene zu bekämpfen. Eine Möglichkeit Pathogene, wie Bakterien oder Pilze, zu bekämpfen, besteht darin, sie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auszusetzen. Viele Agenzien, die PMN aktivieren, sind in der Lage die Produktion von ROS durch PMN zu induzieren (70). Eine schwache Aktivierung, die nicht ausreicht, um selber die Produktion von ROS durch PMN zu induzieren, kann dennoch als Vorstimulation (*Priming*) zu einer Produktion der ROS durch PMN dienen (73). Es sollte in diesem Experiment geprüft werden, ob die Transmigration eine Wirkung auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die neutrophilen Granulozyten hat oder ob die Transmigration zumindest zu einer Vorstimulation der PMN für die fMLP-induzierte Produktion der ROS führt. Dazu wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) für 3 h in Medium inkubiert oder durch Gabe von IL-8 (200 ng/ml) in der Transmigrationskammer zur Transmigration angeregt. Anschließend wurden die Zellen mit fMLP (1 μM) stimuliert. Als Kontrolle wurden transmigierte und nicht-transmigrierte Zellen verwendet, die nicht mit fMLP stimuliert wurden. Die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde über die Umsetzung von Dihydrorhodamin (DHR) zu dem fluoreszierenden Produkt Rhodamin am Durchflusszytometer gemessen. Dieser Versuch zeigte, dass die Transmigration alleine, ohne nachfolgende Stimulation durch fMLP, keine Produktion von ROS induziert (Abb. 13c), jedoch die PMN für eine fMLP-induzierte ROS-Produktion vorstimuliert (Abb. 13d). Die durch fMLP in den transmigrierten PMN ausgelöste ROS-Produktion war viel höher, als die durch fMLP bei den in Medium inkubierten PMN ausgelöste ROS-Produktion (Abb. 13b,d). Die Kontrollen zeigen, dass die in Medium inkubierten PMN keine ROS produzieren (Abb. 13a). Auch die Koinkubation von PMN mit IL-8 und nachfolgender Stimulation mit fMLP induzierte keine höhere ROS-Produktion als fMLP alleine (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die IL-8 induzierte Transmigration in dem verwendeten System PMN für eine fMLP-induzierte ROS-Produktion vorstimuliert.

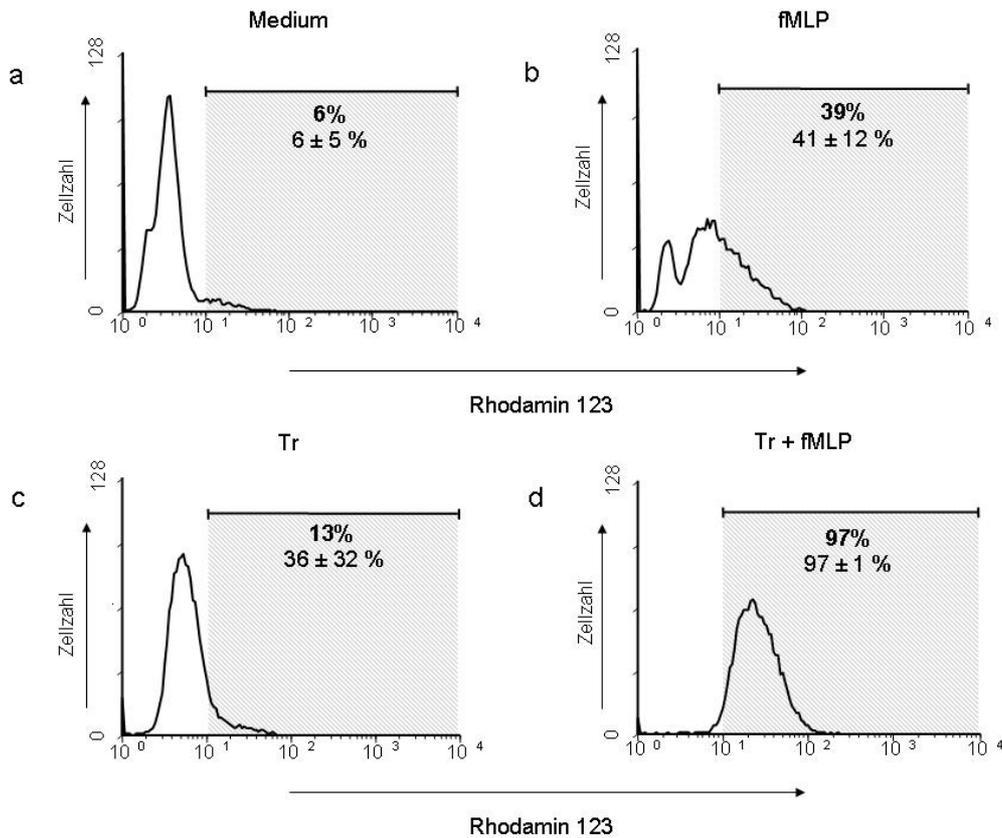


Abb. 13 Transendotheliale Migration stimuliert PMN für die fMLP-induzierte Produktion von ROS vor. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 3 h in Medium inkubiert (a) und wurden anschließend mit $1 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert (b), oder sie transmigrierten für 3 h ohne (c) und mit (d) anschließender Stimulation durch $1 \mu\text{M}$ fMLP. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrats Dihydrorhodamin am Durchflusszytometer gemessen. Es ist der Prozentanteil der ROS-produzierenden PMN angegeben. Die Histogramme a,b,d sind repräsentativ für drei Versuche, c für zwei Versuche.

3.1.5 Die Transmigration führt zu einer apoptoseverzögernden Wirkung von bakteriellen Bestandteilen auf neutrophile Granulozyten

Bei Neutrophilen handelt es sich um kurzlebige Zellen, bereits nach wenigen Stunden im Blut gehen sie spontan in die Apoptose über. Auch *in vitro* ist ein Übergang in die Apoptose bei ihnen nach einigen Stunden typisch. Sie weisen dann Anzeichen der Apoptose auf, wie z.B. Zellschrumpfung und Kondensation des nukleären Heterochromatins (74,75). Dementsprechend gibt es verschiedene Möglichkeiten die Apoptoserate zu bestimmen. Eine Methode zur Bestimmung der Apoptose von Zellen

ist die Färbung mit FITC-markiertem AnnexinV. AnnexinV besitzt eine Ca-Ionen-abhängige natürliche Affinität zum Phosphatidylserin (PS). PS wird in der frühen Apoptose durch den Membran-Flip-Flop von der inneren Seite der Lipid-Doppelmembran auf die äußere Seite und so auf die Zelloberfläche gebracht. Proinflammatorische Stimuli können zu einer Verzögerung der Apoptose der PMN führen (74). Da die Diapedese die PMN wie unter 1.1.2 gezeigt aktiviert, ist anzunehmen, dass sie auch die Apoptose der PMN verzögert. Um zu prüfen, inwieweit die Transmigration in unserem System einen Einfluss auf die Apoptose der PMN hat, wurde die Apoptoserate bei transmigrierten PMN im Vergleich zu nicht transmigrierten, auch bei Anwesenheit des bakteriellen Lipopeptids MALP-2 und des Lipopolysaccharids (LPS) im unteren Kompartiment, bestimmt. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 20 h in Medium oder in Gegenwart von IL-8 (200 ng/ml) inkubiert, jeweils mit und ohne Stimulation durch LPS oder MALP-2. In anderen Ansätzen transmigrierten sie durch IL-8 (200 ng/ml) induziert und wurden sofort im unteren Kompartiment zusammen mit MALP-2 oder LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen genommen, welche nach der Transmigration nicht weiter stimuliert wurden. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Zellen anschließend mit AnnexinV-FITC gefärbt. Der Anteil der Annexin-positiven Zellen wurde über die Durchflusszytometrie bestimmt. Dieser Versuch zeigte, dass die bakteriellen Bestandteile MALP-2 und LPS (Tab. 1) erst nach Vorstimulation durch eine Transmigration nach 20 h eine apoptoseverzögernde Wirkung auf PMN haben. Die Transmigration alleine, ebenso wie die Inkubation der PMN mit MALP-2 und LPS zusammen mit IL-8, führten nur zu einer leichten Verzögerung der Apoptose bei den PMN. Dagegen zeigte die alleinige Inkubation mit IL-8, sowie die alleinige Inkubation mit MALP-2 oder LPS keine Verzögerung der Apoptose bei den PMN im Vergleich zum Medium.

Somit konnte in diesem Transmigrationssystem gezeigt werden, dass erst die Transmigration eine Verzögerung der Apoptose der PMN durch die bakteriellen Bestandteile MALP-2 und LPS nach 20 h ermöglichte.

Tab. 1 Transmigration mit anschließender Stimulation durch bakterielle Bestandteile führt zu einer deutlichen Apoptoseverzögerung der PMN.

Anteil der apoptotischen PMN nach 20 h [%]			
	Medium	IL-8	Transmigration
Medium	79 ± 10	76 ± 7	66 ± 8
MALP-2	82 ± 12	75 ± 7	49 ± 14
LPS	86 ± 10	71 ± 10	50 ± 12

PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 20 h in Medium oder in IL-8 (200 ng/ml) inkubiert oder sie transmigrierten durch IL-8 (200 ng/ml) induziert. Zugleich befanden sich in einigen Ansätzen schon während der Transmigration auch MALP-2 oder LPS im unteren Kompartiment der Transwellkammer. Anschließend wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC gefärbt und der Anteil der Annexin-positiven Zellen über die Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind Mittelwerte \pm SD von drei (MALP-2 und LPS in Medium) bzw. vier Versuchen angegeben.

Ergebnisse Teil I

Es konnte in diesem ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten durch die Transmigration in dem hier etablierten System mit HUVEC und Gelatine aktiviert werden, wie das *Shedding* von CD62L zeigte. Allerdings werden die PMN durch die Transmigration für ihre Effektorfunktion nur vorstimuliert, wie hier für die Produktion der ROS gezeigt werden konnte. Eine Vorstimulation durch die Transmigration war auch für die Verzögerung der Apoptose der PMN zu erkennen. Die Transmigration führte zudem, bei nachfolgender Stimulation mit LPS, zur Oberflächenexpression des Moleküls CD69 auf den PMN.

3.2 Die bakteriellen Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wirken auf PMN in unterschiedlichen Konzentrationen

Neutrophile Granulozyten erkennen Pathogene u.a. über Mustererkennungsrezeptoren (PRR). Zu ihnen gehört die Familie der Toll-like-Rezeptoren. Der TLR2 bindet u.a. Lipopeptide, wie MALP-2 und Pam₃CysSK₄. Um dabei funktionell wirksam zu sein, dimerisiert TLR2 mit TLR1 oder mit TLR6 (76). MALP-2 wird über TLR2/6, Pam₃CysSK₄ dagegen über TLR2/1 erkannt (34). Bisher gibt es keine Studie, welche die Wirkung von MALP-2 und von Pam₃CysSK₄ über ein größeres Spektrum von *Read-Out*-Systemen auf PMN untersucht und gleichzeitig miteinander verglichen hat. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Wirkung der beiden Lipopeptide auf PMN untersucht, auch um möglicherweise Rückschlüsse auf die Bedeutung der Nutzung von TLR2/1 im Gegensatz zu TLR2/6 ziehen zu können.

3.2.1 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ induzieren die Sekretion von IL-8 durch PMN in unterschiedlicher Wirksamkeit

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt zu der Sekretion einer Reihe von Zytokinen. Als Prototyp wurde hier das Chemokin IL-8 ausgewählt, dessen Hauptquelle die neutrophilen Granulozyten sind (77). Bei der Messung der IL-8-Abgabe handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zur Darstellung des Aktivierungsgrades der Neutrophilen. Sie kann auch dann eine Aktivierung der PMN nachweisen, wenn die Stimulation nicht ausreicht hat um die Produktion von ROS zu induzieren (78). Um herauszufinden, in welcher Konzentration MALP-2 und Pam₃CysSK₄ PMN aktivieren können, wurden PMN von je zwei Spendern (5×10^6 /ml) mit verschiedenen Konzentrationen von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ inkubiert. Nach 20 h wurde in den Zellüberständen der IL-8-Gehalt über einen ELISA bestimmt. Die Stimulation mit jedem der beiden Lipopeptide führte zu einer dosisabhängigen starken Erhöhung der IL-8-Abgabe durch die PMN. Dabei war zwischen beiden Lipopeptiden ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Es zeigte sich, dass 10 ng/ml MALP-2 eine starke IL-8-Freisetzung bewirkte, 1 ng/ml MALP-2 dagegen nicht mehr. Bei Pam₃CysSK₄ lag diese Schwelle zwischen 10 µg/ml und 1 µg/ml (Abb. 14a,b). Daraufhin wurde in den

folgenden Versuchen MALP-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, Pam₃CysSK₄ dagegen in einer Konzentration von 10 µg/ml.

Die Durchführung des gleichen Versuchs, allerdings nur unter Einsatz von 10 ng/ml MALP-2 und 10 µg/ml Pam₃CysSK₄, mit den PMN von zwei weiteren Spendern, zeigte wie in dem vorigen Versuch eine deutliche und miteinander vergleichbare IL-8-Freisetzung. Die IL-8-Abgabe nach Stimulation mit 10 ng/ml MALP-2 war dabei ähnlich hoch, wie die durch 10 µg/ml Pam₃CysSK₄ induzierte (Abb. 14d). Dagegen hatten PMN im Medium nach 20 h nur geringe Mengen an IL-8 abgegeben (Abb. 14c,d). Es zeigte sich, dass bei dem gleichen Versuchsaufbau, ohne Einsatz von Pam₃CysSK₄ und bei einer zusätzlichen Stimulation mit LPS, die durch 10 ng/ml MALP-2 induzierte Abgabe von IL-8 durch PMN ähnlich stark war, wie diejenige, welche durch 10 ng/ml LPS induziert wurde (Abb. 14c).

Somit induziert MALP-2 eine IL-8-Freisetzung durch PMN bereits in einer 10⁻³-fachen Konzentration wie Pam₃CysSK₄.

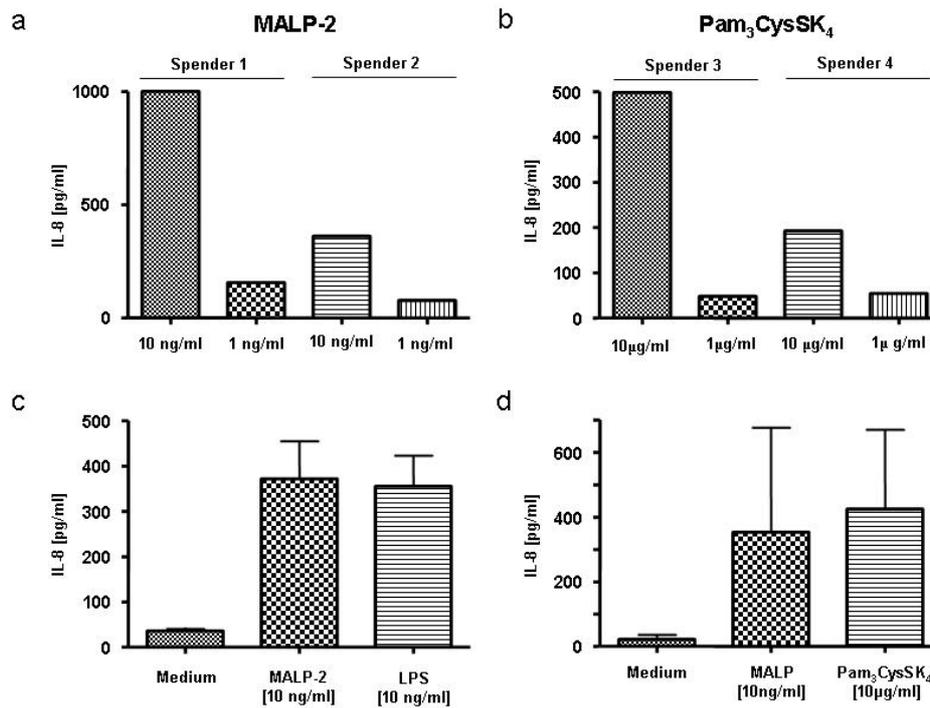


Abb. 14 PMN sekretieren IL-8 nach Stimulation mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄. PMN (5×10^6 /ml) von zwei Spendern wurden für 20 h mit verschiedenen Konzentrationen von MALP-2 (a) oder Pam₃CysSK₄ (b) inkubiert. PMN (5×10^6 /ml) von vier Spendern wurden 20 h mit MALP-2 (10 ng/ml) oder LPS (10 ng/ml) inkubiert (c). PMN (5×10^6 /ml) von vier Spendern wurden 20 h mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) inkubiert (d). Dabei stammen die Werte von b aus den Versuchen, die unter d gezeigt sind. Der IL-8-Gehalt wurde in den Zellüberständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SD der IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen aus vier Experimenten (c, d).

Da Neutrophile in der Lage sein sollen, nach einer Stimulation mit IL-12 und LPS IFN γ zu produzieren (Ethuin et al, 2004), sollte in dieser Arbeit die Fähigkeit von MALP-2 überprüft werden, zusammen mit IL-12 IFN- γ zu produzieren. Es konnte jedoch weder nach Inkubation mit IL-12 und LPS noch nach Inkubation mit IL-12 und MALP-2 eine Freisetzung von IFN- γ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ verändern die Zellmorphologie von neutrophilen Granulozyten

Aktiviert neutrophile Granulozyten verändern ihre Zellmorphologie. Bereits kurz nach ihrer Aktivierung werden sie zu länglichen, motilen Zellen (68,79). Zudem führt eine Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen zu der Formation von Aggregaten (80). Zur Überprüfung der Aktivierung von PMN durch MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wurden PMN (5×10^6 /ml) 2,5 h in Medium oder unter Zugabe von 10 ng/ml MALP-2 oder 10 µg/ml Pam₃CysSK₄ inkubiert. Anschließend wurden Durchlichtaufnahmen am Mikroskop gemacht. PMN die 2,5 h in Gegenwart von 10 ng/ml MALP-2 oder 10 µg/ml Pam₃CysSK₄ inkubiert wurden, zeigten eine verlängerte Zellform und eine rauhe Oberfläche (Abb. 15b,c). Dagegen wiesen PMN, welche die gleiche Zeit in Medium inkubiert wurden, eine runde Zellform und eine glatte Oberfläche auf (Abb. 15a). Die Daten zeigen deutlich, dass MALP-2 und Pam₃CysSK₄ neutrophile Granulozyten stimulieren.

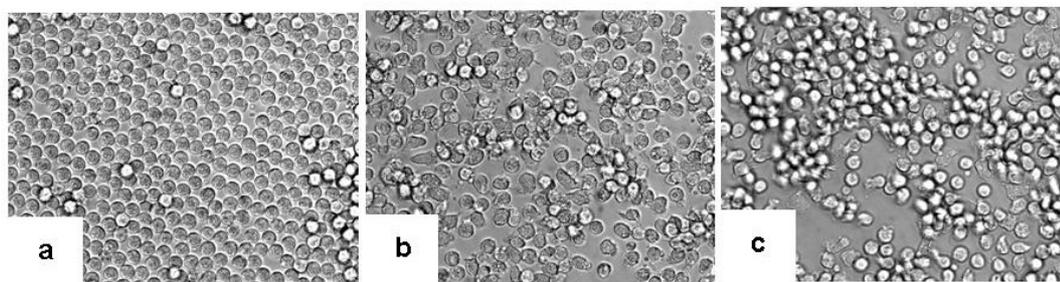


Abb. 15 Stimulation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄ führt zu einer aktivierten Zellform der PMN. PMN (5×10^6 /ml) wurden 2,5 h in Medium (a), mit MALP-2 (10 ng/ml) (b) oder mit Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) (c) inkubiert. Durchlichtaufnahmen. Originalvergrößerung 400 x.

3.2.3 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ stimulieren neutrophile Granulozyten, gemessen an der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern

Bei CD11b und CD66b handelt es sich um Marker der Granula-Membran. Sie werden nach der Exozytose der Granula auf der Membran der Neutrophilen exponiert. Dies stellt eine wichtige Funktion der Aktivierung der Neutrophilen dar (70) und kann daher

sehr gut als Zeichen für die Aktivierung der Neutrophilen genutzt werden. Zur Untersuchung, ob es Unterschiede zwischen MALP-2 und Pam₃CysSK₄ bezüglich ihrer Fähigkeit gibt, eine Exozytose bei den PMN zu induzieren, wurden PMN (5×10^6 /ml) entweder frisch oder nach Inkubation für 6 h in MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) mit einem anti-CD11b-PE-Antikörper, einem anti-CD66b-FITC-Antikörper oder mit einem Isotypkontrollantikörper-PE oder -FITC gefärbt. Die Färbungen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Frisch isolierte PMN exprimierten bereits CD11b und CD66b auf ihrer Zelloberfläche. Nach 6 h zeigte sich, dass die ursprüngliche CD11b-Oberflächenexpression durch Inkubation mit 10 ng/ml MALP-2 oder 10 µg/ml Pam₃CysSK₄ erhalten blieb, während sie nach Inkubation im Medium herunterreguliert wurde. Die Wirkung beider Lipopeptide war dabei ähnlich stark. Die Inkubation der PMN mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ führte zu einer Hochregulation von CD66b auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Expression auf den unstimulierten PMN (Abb. 16b). Die Wirkung von 10 ng/ml MALP-2 war dabei etwas schwächer als die von 10 µg/ml Pam₃CysSK₄.

CD62L wird auf ruhenden PMN exprimiert. Die Aktivierung der Zellen führt zu einem *Shedding* des CD62L von der Zelloberfläche (81). Bei der Messung von CD62L handelt es sich um eine übliche Methode zur Bestimmung des Aktivierungsgrades neutrophiler Granulozyten (68). Um die in dieser Arbeit gewonnenen morphologischen Daten zu überprüfen, wurde die Expression von CD62L auf den unstimulierten bzw. mit MALP-2 oder mit Pam₃CysSK₄ stimulierten PMN gemessen. Zu diesem Zweck wurden PMN (5×10^6 /ml) entweder frisch oder nach 6 h Inkubation mit 10 ng/ml MALP-2 oder mit 10 µg/ml Pam₃CysSK₄ mit einem anti-CD62L-PE oder mit einem Isotypkontrollantikörper-PE gefärbt. Die Färbungen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die frisch isolierten PMN wiesen eine hohe CD62L-Expression auf. Die meisten der allein in Medium kultivierten PMN waren auch nach 6 h noch CD62L-positiv. Dagegen führte die 6-stündige Inkubation mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ zu einem *Shedding* des CD62L von der Oberfläche der meisten Zellen (Abb. 16c). Eine Konzentration von 10 ng/ml MALP-2 war ebenso effektiv wie 10 µg/ml Pam₃CysSK₄.

Die Inkubation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄ führt also zu einem Erhalt der Oberflächenexpression von CD11b sowie zu einer Hochregulation von CD66b und zu

einem *Shedding* von CD62L bei PMN. Dies zeigt, dass beide Lipopeptide die PMN aktivieren und zu einer Degranulation stimulieren.

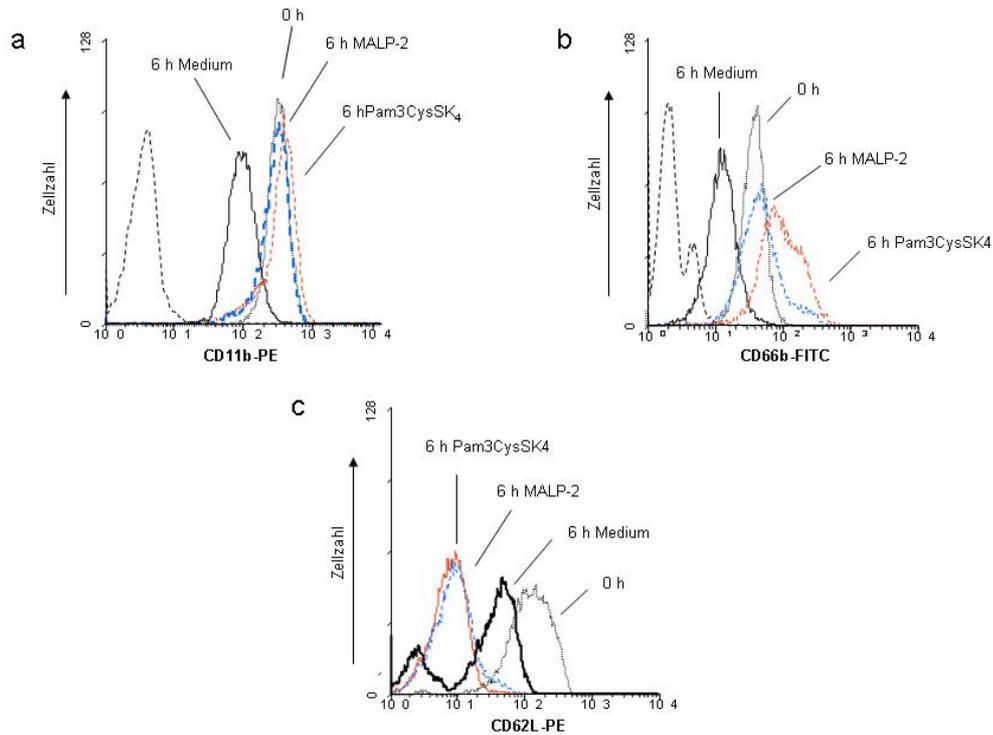


Abb. 16 Oberflächenexpression von CD11b und CD66b sowie von CD62L auf PMN nach Inkubation mit MALP-2 und mit Pam₃CysSK₄. PMN (5×10^6 /ml) wurden entweder frisch oder nach Inkubation für 6 h in MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 μ g/ml) mit einem anti-CD11b-PE (a), einem anti-CD66b-FITC (b) oder einem anti-CD62L-PE Antikörper gefärbt. Die Färbungen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Histogramme sind repräsentativ für drei Experimente (MALP-2 = blau; Pam₃CysSK₄ = rot, gestrichelte Linie (a,b) = Isotypkontrollantikörper).

3.2.4 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ verstärken die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten

Eine der Hauptantworten auf mikrobielle Eindringlinge besteht in der Phagozytose der Pathogene durch PMN (82). Daher wurde die Phagozytoseaktivität als Parameter der PMN-Funktion nach ihrer Stimulation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄ genutzt. PMN (5×10^6 /ml) wurden nach 75 min Inkubation mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 μ g/ml) oder nach Inkubation in Medium für weitere 30 min mit der 5-fachen Menge

lebender grampositiver Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* koinkubiert. Die Prozentanteile der PMN, die Bakterien phagozytiert hatten, wurden über die Auszählung von Zytocentrifugenpräparaten am Mikroskop bestimmt. Es konnte in allen Ansätzen eine Phagozytose der Bakterien beobachtet werden. Dabei wurde eine erhöhte Phagozytose in den mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ vorinkubierten Zellen im Vergleich zu den im Medium vorinkubierten gemessen (Abb. 17). Somit führt also die Vorbehandlung von PMN mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ zu einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität der PMN.

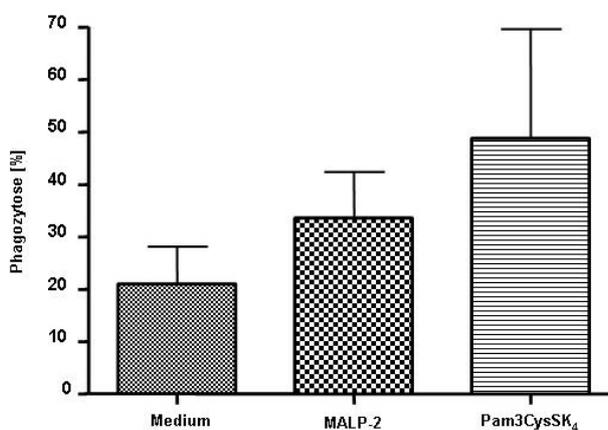


Abb. 17 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ stimulieren PMN für eine erhöhte Phagozytoseaktivität vor. PMN (5×10^6 /ml) wurden nach Inkubation für 75 min mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) oder in Medium für weitere 30 min mit lebenden *S. aureus* koinkubiert. Die Prozentanteile der PMN, die Bakterien phagozytiert hatten, wurden über die Auszählung von Zytocentrifugenpräparaten am Mikroskop bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SD von fünf Experimenten.

3.2.5 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ stimulieren neutrophile Granulozyten für eine fMLP-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor

Um die phagozytierten Erreger zu bekämpfen, besitzen die PMN verschiedene Mechanismen den Erreger zu zerstören. Einer von ihnen besteht in der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. In diesem Versuch wurde die Fähigkeit der beiden Lipopeptide zur Vorstimulation der PMN für eine durch fMLP-induzierte Produktion von ROS gemessen. Die intrazelluläre Produktion der ROS wurde über die Umsetzung

von DHR zu Rhodamin gemessen. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden nach 90 min Inkubation in Medium oder zusammen mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) jeweils für 5 min mit fMLP (1 µM) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die für 90 min in Medium inkubierten, jedoch nicht mit fMLP nachstimuliert wurden. Anschließend wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie der Anteil der ROS produzierenden Zellen bestimmt. Keines der beiden Lipopeptide war in den genutzten Konzentrationen von 10 ng/ml bzw. 10 µg/ml in der Lage, alleine die Produktion der ROS auszulösen (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit MALP-2 oder Pam₃CysSK₄ führte jedoch zu einer Vorstimulation für eine fMLP-induzierte Produktion der ROS (Abb. 18).

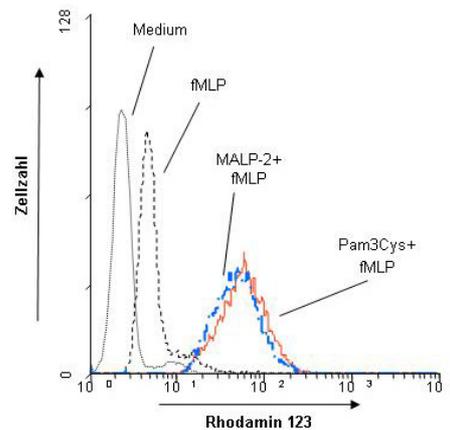


Abb. 18 Sowohl MALP-2 als auch Pam₃CysSK₄ stimulieren PMN für eine fMLP-induzierte Produktion von ROS vor. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden nach Inkubation für 90 min mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) oder in Medium jeweils für 5 min mit 1 µM fMLP stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die für 90 min in Medium inkubiert, jedoch nicht mit fMLP nachstimuliert wurden. Anschließend wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Produktion der ROS durch die Oxidation von DHR gemessen. Das Histogramm zeigt einen repräsentativen Versuch aus vier Experimenten (MALP-2 = blau; Pam₃CysSK₄ = rot).

3.2.6 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wirken chemokinetisch auf neutrophile Granulozyten

In einer Studie wurde gezeigt, dass MALP-2 indirekt chemotaktisch auf Monozyten und neutrophile Granulozyten wirkt (83). Hier sollte untersucht werden, ob beide Lipopeptide eine ähnliche chemotaktische Wirkung auf PMN haben. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$)

wurden in die obere Kammer des Transwell-Systems gegeben (Abb. 10), während sich in der unteren Kammer entweder MALP-2 (10 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) oder fMLP (0,1 µM) befanden. Nach 90 min wurde die Anzahl der migrierten Zellen über einen β-Glucuronidase-Test bestimmt. Das Enzym β-Glucuronidase ist in den Lysosomen der PMN lokalisiert. Die Messung der β-Glucuronidase-Enzymaktivität erlaubt die Quantifizierung der PMN. Es zeigte sich, dass sowohl MALP-2 als auch Pam₃CysSK₄ ebenso wie das chemotaktische fMLP eine Migration der PMN induzierten (Abb. 19).

Eine Aktivierung von Zellen kann jedoch auch zu einer ungerichteten Eigenbewegung der Zellen führen. Um diese sog. Chemokinese von der Chemotaxis zu unterscheiden, wurden die Stimuli in beide Kammern des Transwell-Systems gegeben, wodurch es kein Konzentrationsgefälle mehr gab. Die PMN migrierten durch MALP-2 und Pam₃CysSK₄ induziert ohne Konzentrationsgradient ähnlich stark wie mit einem Konzentrationsgradienten (Abb. 19b). Im Gegensatz dazu bewirkte fMLP nur dann eine starke Wanderung der Zellen in das untere Kompartiment, solange ein Konzentrationsgradient vorlag. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei MALP-2 und Pam₃CysSK₄ im Gegensatz zu fMLP nicht um chemotaktisch wirksame Substanzen, sondern um chemokinetisch wirksame Substanzen in Bezug auf die PMN handelt.

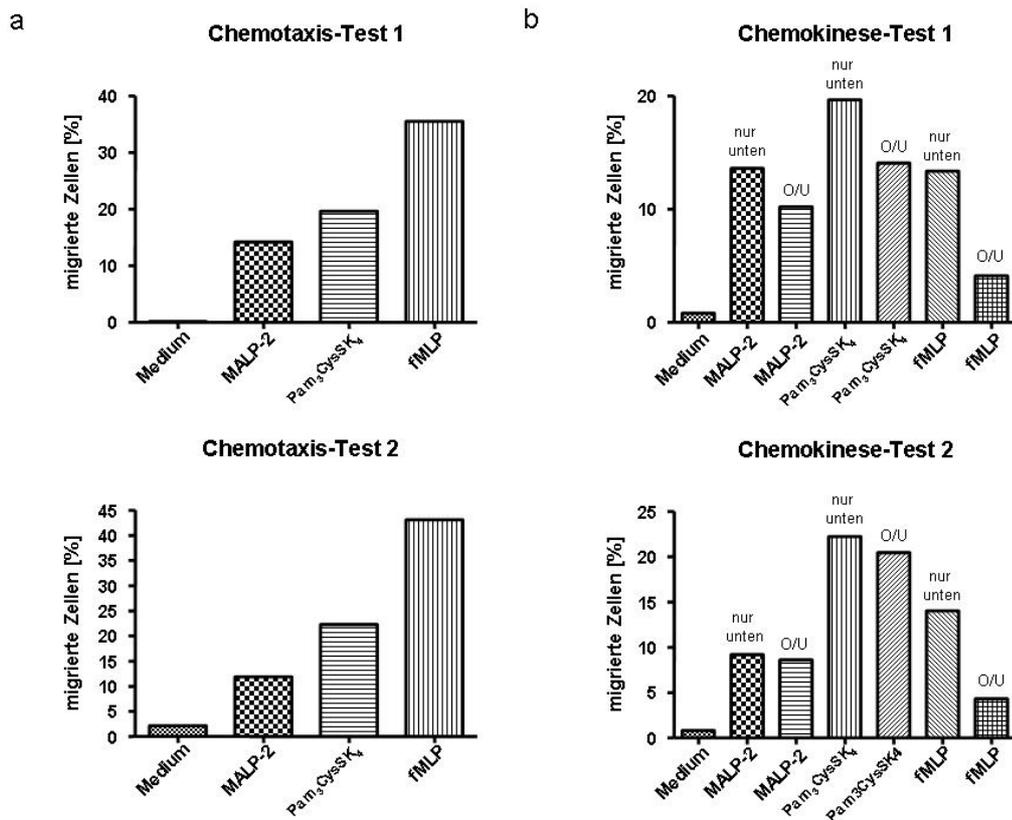


Abb. 19 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wirken chemokinetisch auf PMN. a: Chemotaxisassay: PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in die obere Kammer eines Transwell-Systems gegeben, während sich in der unteren Kammer entweder nur Medium oder MALP-2 (10 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder 0,1 μM fMLP befanden. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde über einen Glucuronidase-Assay bestimmt. Es ist der Prozentanteil der migrierten Zellen von der Gesamtzellzahl angegeben der sich ursprünglich im oberen Einsatz des Transwell-Systems befand. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm SD aus 2 Experimenten. b: Test zur Unterscheidung zwischen Chemotaxis und Chemokinese: PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in die obere Kammer eines Transwell-Systems gegeben. In der oberen Kammer befanden sich entweder MALP-2 (20 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0,2 μM fMLP („O/U“) oder nur Medium („nur unten“). In der unteren Kammer befanden sich entsprechend des Inhaltes der oberen Kammer entweder MALP-2 (10 ng/ml), Pam₃CysSK₄ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 μM fMLP oder nur Medium. Der Anteil der migrierten Zellen wurde über einen Glucuronidase-Assay bestimmt. Es sind die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.2.7 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ aktivieren neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von MIP-1 β

Nach Stimulation mit MALP-2 setzen PMN, wie unter Abb. 14 gezeigt, IL-8 frei. Monozyten setzen nach Stimulation mit MALP-2 u.a. auch MIP-1 β frei (83). MIP-1 β wirkt chemotaktisch auf Monozyten und besonders auf CD4⁺T-Zellen. Hier sollte untersucht werden, ob MALP-2 und Pam₃CysSK₄ in der Lage sind, PMN zur Freisetzung des Chemokins MIP-1 β , zu stimulieren, um zu prüfen, ob die Lipopeptide die PMN anregen, zur spezifischen Immunantwort mit beizutragen. PMN (5×10^6 /ml) wurden 20 h entweder in Medium oder zusammen mit MALP-2 (10 ng/ml) oder mit Pam₃CysSK₄ (10 μ g/ml) inkubiert. Der MIP-1 β -Gehalt wurde in den Überständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. Beide Lipopeptide stimulierten die PMN in den Konzentrationen von 10 ng/ml MALP-2 bzw. 10 μ g/ml Pam₃CysSK₄ zu einer starken Freisetzung von MIP-1 β (Abb. 20). MALP-2 und Pam₃CysSK₄ induzieren also beide die Freisetzung des für CD4⁺T-Zellen chemotaktischen MIP-1 β durch PMN. Somit können beide Lipopeptide zur Induktion der spezifischen Immunantwort mit beitragen.

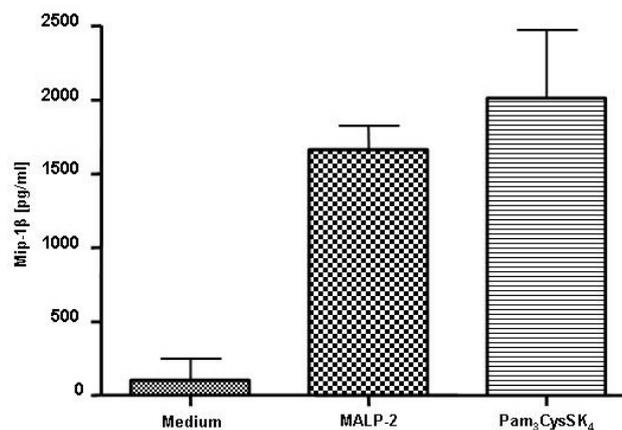


Abb. 20 PMN sekretieren MIP-1 β nach Stimulation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄. PMN (5×10^6 /ml) wurden in Medium, mit MALP-2 (10 ng/ml) oder mit Pam₃CysSK₄ (10 μ g/ml) für 20 h inkubiert. Der MIP-1 β -Gehalt wurde in den Überständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. Angegeben sind die MIP-1 β -Konzentrationen der Zellüberstände. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SD aus drei Experimenten.

3.2.8 Die Stimulation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄ führt zu einer Verzögerung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten

In einem inflammatorischen Milieu bzw. während einer Infektion wird die Lebensspanne der Neutrophilen verlängert. Als Bestandteile von Mikroben erlauben es MALP-2 und Pam₃CysSK₄, eine Infektion zu simulieren. Beide haben eine apoptoseverzögernde Wirkung auf PMN (84,85). Da in der hier vorliegenden Arbeit jedoch MALP-2, wie in Tab. 1 gezeigt, nach 20 h alleine zu keiner Apoptoseverzögerung der PMN führte, sollte nun die Fähigkeit von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ auf eine apoptoseverzögernde Wirkung zu einem früheren Zeitpunkt getestet werden. Dazu wurden frisch isolierte PMN als auch 6 h in Medium kultivierte oder zusammen mit MALP-2 (10 ng/ml) oder mit Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) inkubierte PMN mit AnnexinV-FITC gefärbt. Die Apoptose wurde, wie unter 1.1.5, über die Menge des an der Oberfläche exponierten PS bestimmt. Die frischen PMN waren noch AnnexinV-negativ (Daten nicht gezeigt), dagegen waren ca. 30 % der in Medium kultivierten PMN nach 6 h bereits apoptotisch. Die Stimulation mit jeweils einem der beiden Lipopeptide führte demgegenüber nach 6 h zu einer starken Reduktion der Apoptose im Vergleich zu den in Medium kultivierten Zellen (Abb. 21). Dies sind Hinweise darauf, dass die Aktivierung von PMN durch bakterielle Bestandteile eine kurzzeitige Verzögerung der Apoptose bewirken.

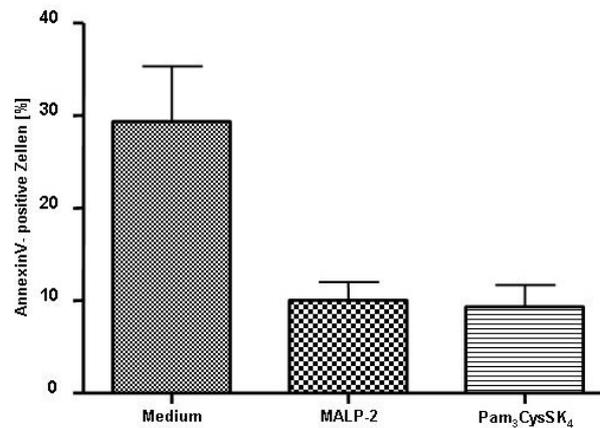


Abb. 21 MALP-2 und Pam₃CysSK₄ verzögern die Apoptose der PMN. PMN (5×10^6 /ml) wurden für 6 h in Medium, mit MALP-2 (10 ng/ml) oder mit Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Färbung mit AnnexinV-FITC durchgeführt und der Anteil der fluoreszierenden Zellen mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen PMN in Prozent. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten.

3.2.9 MALP-2 wirkt auf neutrophile Granulozyten über CD14

Das Oberflächenmolekül CD14 bindet einige bakterielle Bestandteile, wie z.B. LPS, mit Hilfe des LPS bindenden Proteins (LBP) (Giambartolomei, 1999; Power 20004, Sellati1998). CD14 ist ein Rezeptor ohne transmembrane Domäne, also ohne direkte Anbindung an Signaltransduktionswege (40). Um Signale weitergeben zu können, muss es mit anderen Molekülen, wie z.B. mit TLR2 zusammenwirken. Da noch fraglich ist, inwieweit CD14 eine Rolle bei der Erkennung von MALP-2 durch PMN spielt, wurde der CD14-Rezeptor mit einem anti-CD14 Antikörper blockiert. Anschließend wurde die Aktivierbarkeit der PMN durch MALP-2 und Pam₃CysSK₄ über die IL-8-Freisetzung gemessen. PMN (5×10^6 /ml) wurden zunächst für 30 min bei RT mit einem anti-CD14 Antikörper (10 µg/ml) oder einem Isotypkontrollantikörper (10 µg/ml) inkubiert und anschließend mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) oder in Medium für 20 h inkubiert. Die Blockierung von CD14 führte zu einer starken Reduktion der durch MALP-2 induzierten IL-8-Freisetzung (Tab. 2). Die durchschnittliche Hemmung der IL-8-Freisetzung betrug im Vergleich zu der IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit dem

Isotypkontrollantikörper im Mittel ca. 50 %. Dagegen war die durch Pam₃CysSK₄ induzierte IL-8-Freisetzung durch den Antikörper bei zwei der drei Spender reduziert (Tab. 2). Die Ergebnisse zeigen, dass die MALP-2 induzierte IL-8-Freisetzung durch PMN CD14-abhängig ist, für Pam₃CysSK₄ liegen keine eindeutigen Daten vor.

Tab. 2 IL-8 Sekretion durch PMN nach Blockierung von CD14 und Inkubation mit MALP-2 und Pam₃CysSK₄.

Spender	IL-8 -Gehalt [pg/ml] in Überständen der PMN					
	Behandlung der PMN					
	MALP-2			Pam ₃ CysSK ₄		
	ohne mAb	Isotyp-kontrolle	anti CD14mAb	ohne mAb	Isotyp-kontrolle	anti CD14mAb
I	269	n.d.	51	n.d.	n.d.	n.d.
II	2662	2500	1394	n.d.	n.d.	n.d.
III	942	1486	423	n.d.	n.d.	n.d.
IV	778	560	361	480	379	103
V	388	240	154	841	1.148	1.667
VI	243	174	123	177	196	118

PMN (5×10^6 /ml) wurden zunächst für 30 min bei RT mit einem anti-CD14 mAb (10 µg/ml) oder einem Isotypkontrollantikörper (10 µg/ml) inkubiert und anschließend mit MALP-2 (10 ng/ml) oder Pam₃CysSK₄ (10 µg/ml) oder nur in Medium für 20 h inkubiert. Es ist der IL-8-Gehalt der Zellüberstände angegeben. (n.d. = nicht durchgeführt).

Ergebnisse Teil II

Dieser zweite Teil der Arbeit zeigt, dass MALP-2 in einer 1000 x niedrigeren Konzentration eine IL-8-Freisetzung bewirkt als Pam₃CysSK₄. Diese Wirkung ist nur bei MALP-2 deutlich CD14-abhängig. Dabei induzierten beide Lipopeptide dennoch die gleichen Aktivierungserscheinungen bei den PMN.

3.3 Bedeutung des CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T für die Aktivierbarkeit von neutrophilen Granulozyten durch bakterielle Bestandteile

Das Oberflächenmolekül CD14 ist wichtig für die Aktivierbarkeit von neutrophilen Granulozyten durch LTA, LPS (41,52) und, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch MALP-2 (Tab. 2). Es gibt Hinweise darauf, dass der Promotorpolymorphismus 159C→T mit der Suszeptibilität von Menschen für bakterielle Pathogene korreliert. So zeigt der TT Genotyp eine erhöhte Prävalenz für chronische Chlamydieninfektionen (50). Dennoch gibt es noch keine Studien die zeigen, ob dieser Polymorphismus eine Auswirkung auf die Funktion von Phagozyten wie PMN und Monozyten hat. Daher wurde in dieser Arbeit die Funktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten von Spendern untersucht, die homozygot für 159C (CC-Genotyp) oder homozygot für 159T (TT-Genotyp) sind.

3.3.1 Bestimmung des Genotyps bezüglich des CD14-Promotorpolymorphismus in einem Pool von freiwilligen Spendern

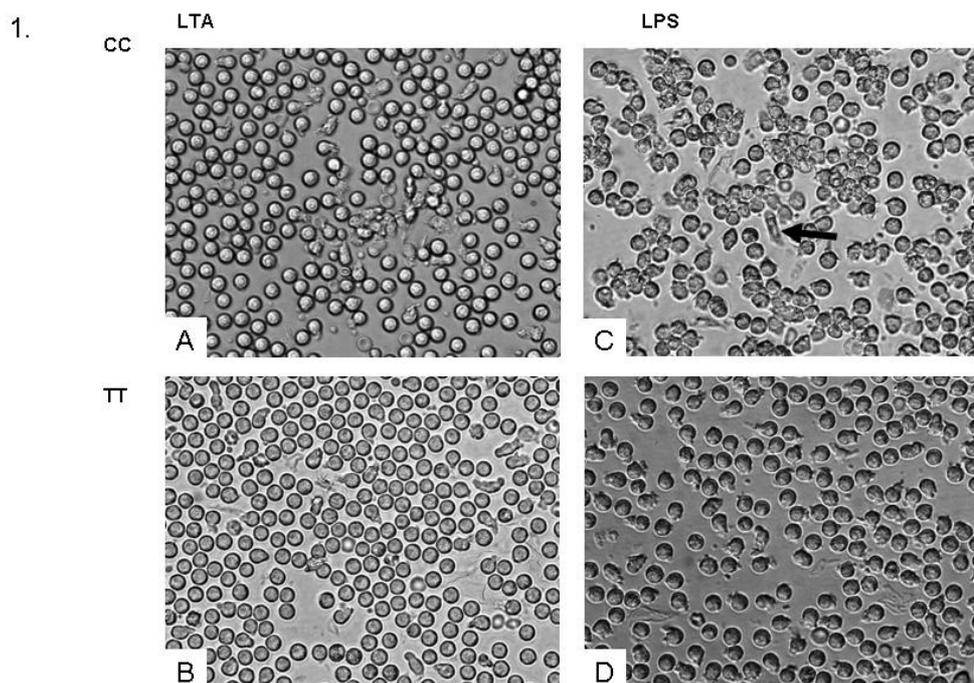
Es wurde die DNA von 26 freiwilligen Spendern aus PBMC isoliert. Anschließend wurden eine PCR und ein Restriktionsverdau durchgeführt, um den Genotyp der einzelnen Spender bezüglich des CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T zu bestimmen. Identifiziert wurden 9 Spender des Genotyps CC, 9 Spender des Genotyps CT und 8 Spender des Genotyps TT.

3.3.2 Untersuchung der zwei Genotypen CC und TT auf mögliche Unterschiede bezüglich der Funktion neutrophiler Granulozyten

Es sollte untersucht werden, ob PMN des CC- und des TT-Genotyps durch bakterielle Bestandteile unterschiedlich stark aktiviert werden. Dazu wurden PMN mit LTA als Bestandteil grampositiver und mit LPS als Bestandteil gramnegativer Bakterien inkubiert und der Grad ihrer Aktivierung bestimmt.

3.3.3 Zellmorphologische Veränderungen der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LTA und LPS

Die Zellmorphologie erlaubt eine Beurteilung des Aktivierungsgrades von PMN. Aktivierte PMN weisen eine typisch verlängerte Zellform auf und bilden Aggregate (68,79). Daher wurde in diesem Versuch die Zellmorphologie der PMN nach Inkubation mit LTA und LPS bestimmt. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in Medium oder zusammen mit LTA ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) für 1 h inkubiert. Die Morphologie der PMN wurde unter dem Mikroskop begutachtet und bewertet (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde sie photographisch festgehalten. Nach der Inkubation mit LTA waren die PMN nur sehr schwach aktiviert (Abb. 22,1A,B). Nach der Inkubation mit LPS zeigte sich dagegen eine deutliche Aktivierung der Zellen (Abb. 22,1.C,D). Da das hochdosierte LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) eine sehr starke Wirkung zeigte und eine zu starke Aggregatbildung das Auszählen der Zellen unmöglich macht, wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) von je drei Spendern mit nur $1 \text{ ng}/\text{ml}$ LPS inkubiert. Nach 2 h wurden Photos gemacht. Anschließend wurden auf den Photos 200 Zellen ausgezählt und über die verlängerte Zellform der Anteil der aktivierten Zellen bestimmt. Die PMN des CC-Genotyps reagierten auf LPS stärker mit morphologischen Veränderungen als die neutrophilen Granulozyten des TT-Genotyps (Abb. 22,2).



2.

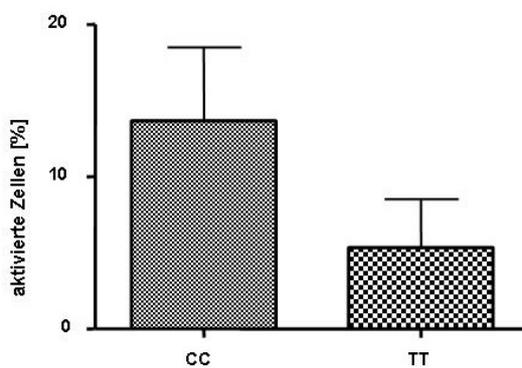


Abb. 22 PMN des CC-Genotyps zeigen bei der Stimulation mit LPS einen Unterschied zu den PMN des TT-Genotyps. 1. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in Medium oder mit LTA ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) (A,B) oder LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) (C,D) für 1h inkubiert. Aktivierte PMN zeigen eine typisch verlängerte Zellform (\rightarrow), sowie eine leichte Aggregatbildung. (Vergrößerung 400-fach). 2. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit $1 \text{ ng}/\text{ml}$ LPS für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die aktivierten PMN ausgezählt. Es ist der Prozentanteil der aktivierten Zellen dargestellt. Mittelwerte \pm SD von je drei Spendern sind angegeben.

3.3.4 Expression von CD62L auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LPS

Zur Überprüfung der gewonnen morphologischen Daten wurde in diesem Versuch die Aktivierung der PMN des CC- und des TT-Genotyps an der CD62L-Oberflächenexpression gemessen. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden, frisch oder nach 4 h mit und ohne Stimulation mit LPS (100 ng/ml), mit einem anti-CD62L-PE Antikörper gefärbt und der Anteil der CD62L-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Nach Inkubation der PMN mit LPS war die CD62L-Oberflächenexpression deutlich verringert. Es sind keine Unterschiede zwischen den CC- und TT-Genotypen zu erkennen (Abb. 23).

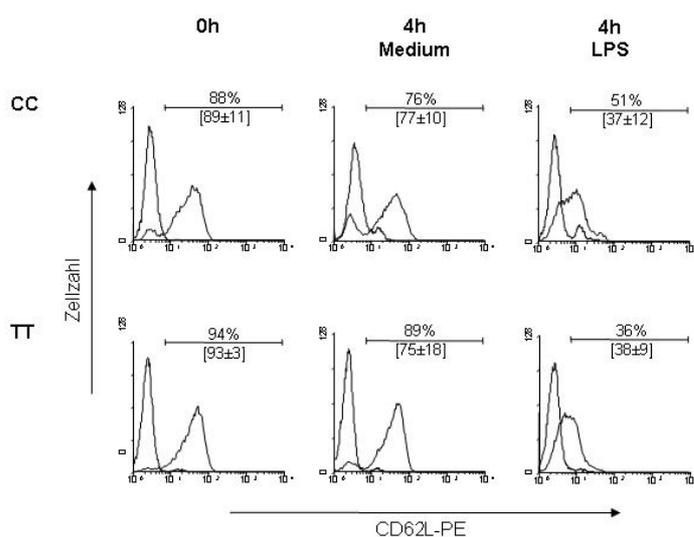


Abb. 23 Es gibt keine Unterschiede in dem Shedding von CD62L auf PMN zwischen den Genotypen CC und TT. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden frisch oder nach 4 h mit oder ohne Stimulation mit LPS (100 ng/ml) mit einem anti-CD62-PE Antikörper gefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Die Histogramme zeigen die CD62L-Oberflächenexpression von einem repräsentativen Spender. Es sind die Mittelwerte \pm SD von 9 Spendern des CC- und 8 Spendern des TT-Genotyps der für CD62L-positiven Zellen angegeben.

3.3.5 IL-8-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten oder Monozyten nach Stimulation mit LTA oder LPS

Um Unterschiede in der Aktivierung der PMN beider Genotypen sichtbar zu machen, welche bezüglich LTA durch die Morphologie nicht deutlich geworden waren und auch, um die Aktivierung der Monozyten zu erfassen, wurde in diesem Experiment die IL-8-Freisetzung beider Zelltypen nach Stimulation mit LTA und LPS bestimmt. Da IL-8 chemotaktisch auf PMN wirkt, konnte dadurch gleichzeitig die Fähigkeit der PMN beider Genotypen, weitere PMN anzulocken, untersucht werden. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 18 h in Medium, mit LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) inkubiert. Der IL-8-Gehalt in den Überständen wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die Daten stammen von 9 Spendern des CC- und 8 Spendern des TT-Genotyps. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt (Abb. 24, Exp. 1, Exp. 2). Bei den PMN des CC-Genotyps ist im Durchschnitt eine etwas höhere IL-8-Freisetzung durch Inkubation mit LPS in Experiment 1 zu erkennen (Abb. 24). Auch Experiment 2 weist in diese Richtung.

Die IL-8-Freisetzung der Monozyten wurde in der Gesamtpopulation der peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) gemessen. Zu den PBMC gehören Monozyten, und Lymphozyten. Da Lymphozyten IL-8 nur in kaum messbaren Mengen freisetzen, kann der IL-8-Gehalt in den Überständen der PBMC den Monozyten zugeschrieben werden. Daher konnten in diesem Versuch die PBMC eingesetzt werden, ohne dass die Monozyten isoliert werden mussten. PBMC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 18 h in Medium, zusammen mit LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit LPS ($100 \text{ pg}/\text{ml}$) inkubiert. Der IL-8-Gehalt in den Überständen wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die IL-8-Freisetzung durch die Monozyten des CC-Genotyps lag nach Stimulation mit LPS im Mittel etwas höher als die des TT-Genotyps (Abb. 25).

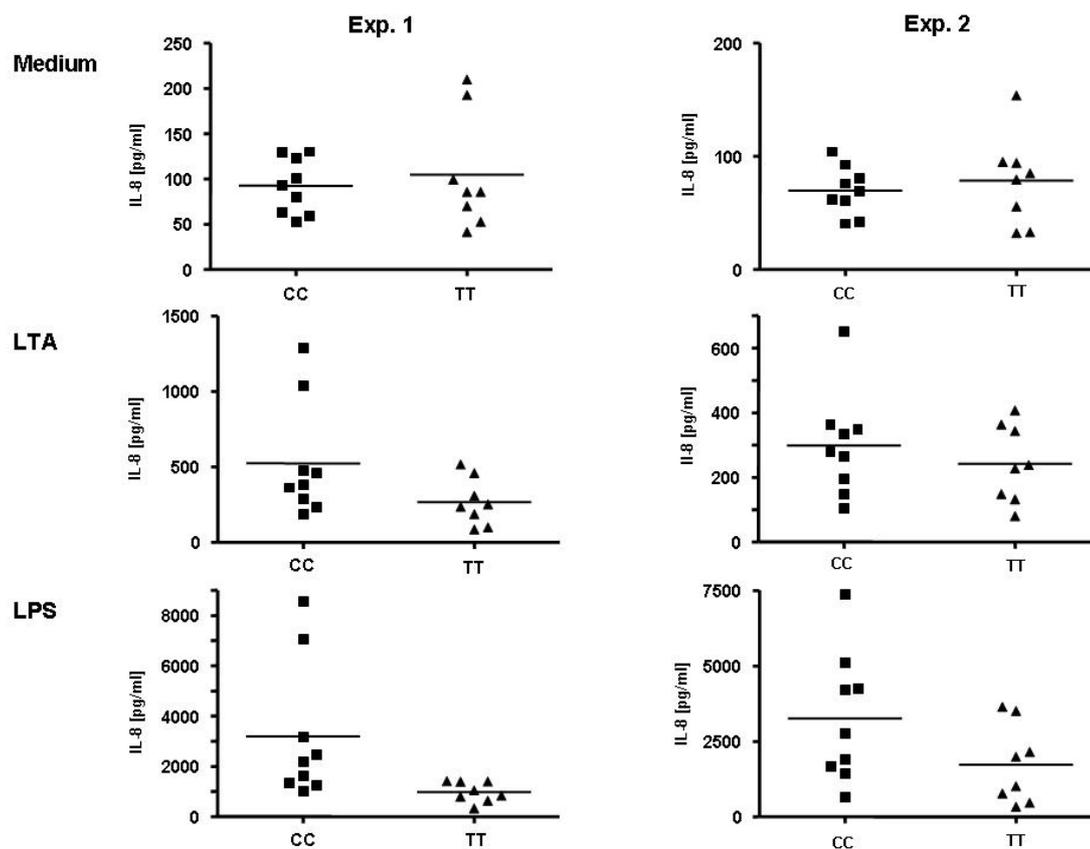


Abb. 24 PMN des CC-Genotyps setzen nach Stimulation im Mittel mehr IL-8 frei als die PMN des TT-Genotyps. PMN (5×10^6 /ml) wurden für 18 h in Medium, mit LTA ($10 \mu\text{g/ml}$) oder mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Der IL-8-Gehalt in den Überständen wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen. Es sind die IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen angegeben. Die Daten stammen von neun Spendern des CC- und acht Spendern des TT-Genotyps. Exp. 2 ist eine Reproduktion von Exp. 1. Der Mittelwert ist markiert (-).

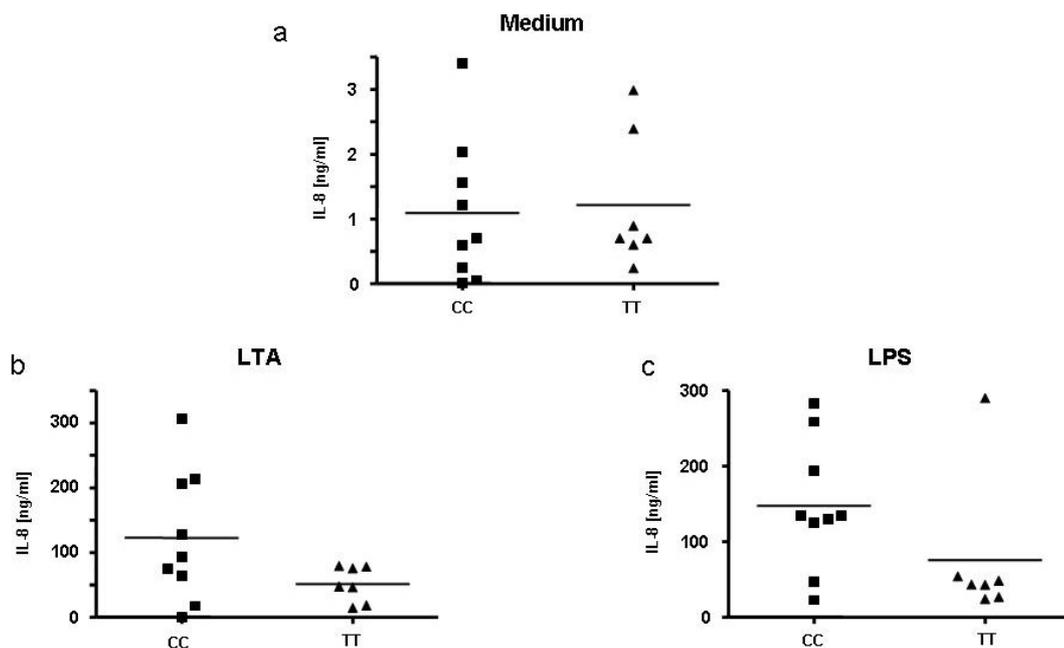


Abb. 25 PBMC des CC-Genotyps setzen nach Stimulation im Mittel mehr IL-8 frei als die PBMC des TT-Genotyps. PBMC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 18 h in Medium (a), mit LTA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (b) oder mit LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (c) inkubiert. Der IL-8-Gehalt in den Überständen wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen. Es sind die IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen angegeben. Die Daten stammen von neun Spendern des CC- und sieben Spendern des TT-Genotyps. Der Mittelwert ist markiert (-).

3.3.6 CD14-Expression auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Wie in Abb. 22 gezeigt, reagieren die PMN des CC- und des TT-Genotyps unterschiedlich auf LPS. So zeigt, im Vergleich zum TT-Genotyp, ein größerer Teil der PMN des CC-Genotyps eine aktivierte Zellform. Zudem zeigen sich Trends in Richtung einer erhöhten IL-8-Freisetzung nach Stimulation der mit LTA und LPS durch PMN und durch PBMC des CC- Genotyps im Vergleich zum TT-Genotyp. In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob diese Unterschiede eventuell mit einem unterschiedlichen Expressionsniveau von CD14 auf der Zelloberfläche einhergehen. Daher wurde die Oberflächenexpression von CD14 auf PMN und PBMC im Vollblut der CC- und der TT- Genotypen untersucht. Es wurde Vollblut nach einer Lyse der Erythrozyten (Erylyse) mit einem anti-CD14-PE Antikörper gefärbt und anschließend der Anteil der gefärbten PMN mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Die unterschiedlichen Zellpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, PMN) konnten dabei

voneinander getrennt betrachtet werden (Abb. 26). Es konnte kein Unterschied zwischen den PMN der zwei Genotypen bezüglich ihrer CD14-Expression festgestellt werden (Abb. 27a).

Da Monozyten deutlich mehr CD14 auf ihrer Oberfläche exprimieren als PMN (86) und so eventuelle Unterschiede der CD14-Oberflächenexpression bei ihnen deutlicher werden könnten als sie bei PMN sind, wurde diese Untersuchung auf Monozyten erweitert. Dabei zeigte sich, dass im Mittel die CD14 Expression auf den Monozyten des TT-Genotyps im Mittel leicht erhöht ist (Abb. 27b).

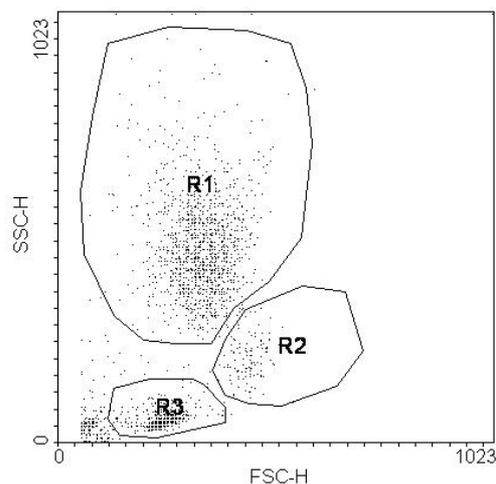


Abb. 26 Leukozytenpopulationen im Vollblut. Leukozyten im Vollblut wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) vermessen und in einem *Dot Blot* dargestellt. R1 = Granulozyten, R2 = Monozyten, R3 = Lymphozyten; unten links befindet sich Zelldebris.

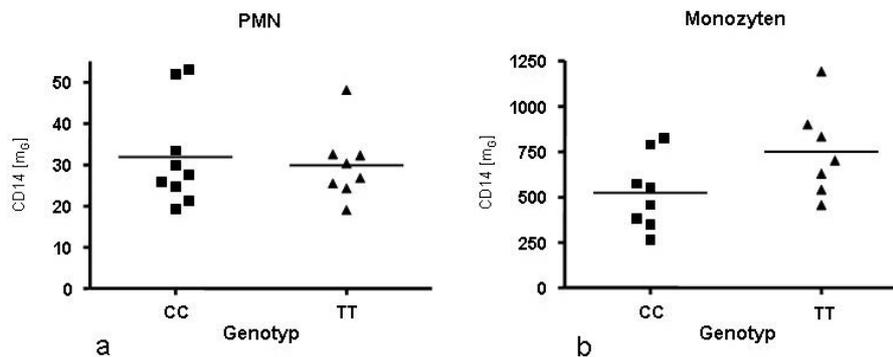


Abb. 27 CD14-Oberflächenexpression auf PMN und Monozyten im Vollblut des CC-Genotyps und des TT-Genotyps. Es wurde Vollblut nach Erylyse von Spendern des CC- bzw. des TT-Genotyps mit einem anti-CD14-PE Antikörper gefärbt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Populationen der PMN (a) und der Monozyten (b) getrennt erfasst und die CD14-Oberflächenexpression gemessen. Es ist der Mittelwert (m_G) der CD14-Oberflächenexpression auf den Zellen angegeben. Die Daten stammen von neun (a) bzw. acht (b) Spendern des CC- und acht (a) bzw. sieben (b) Spendern des TT-Genotyps.

3.3.7 CD14 Expression auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach Stimulation mit LTA und LPS

Die Stimulation von Monozyten mit LPS führt zu einer verstärkten Transkription des CD14-Gens der TT-Genotypen (48). Da sich bei den Monozyten dennoch nur eine im Mittel leicht erhöhte Expression bei dem TT-Genotyp im Vergleich zum CC-Genotyp zeigte und bei den PMN im Vollblut kein Unterschied in der CD14-Oberflächenexpression zwischen dem CC- und dem TT- Genotyp nachgewiesen werden konnte, sollte hier geprüft werden, ob ein Unterschied der CD14-Oberflächenexpression bei Monozyten und bei PMN erst durch Stimulation, wie z.B. mit LPS oder LTA, deutlich wird. Dazu wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) für 4 und 18 h, PBMC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) für 18 h in Medium oder zusammen mit LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$ für PMN, $100 \text{ pg}/\text{ml}$ für PBMC) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-CD14-PE Antikörper gefärbt und die Stärke der CD14-Oberflächenexpression auf den PMN und Monozyten im Durchflusszytometer bestimmt. Die Monozyten konnten dabei von den restlichen Leukozyten getrennt betrachtet werden (Abb. 26). Die frischen PMN

exprimierten CD14 nur schwach auf ihrer Oberfläche, dafür aber gleich schwach bei beiden Genotypen (Tab. 3a). Nach 4 h zeigten die PMN nur eine minimale Herunterregulation von CD14, dabei wurde kein Unterschied zwischen den stimulierten und den unstimulierten Zellen sichtbar. Auch war hier kein Unterschied zwischen den zwei Genotypen sichtbar. Nach 18 h war nur noch ein Teil der PMN CD14-positiv (Daten nicht gezeigt). Auf den CD14-positiven PMN war die Menge der CD14-Oberflächenmoleküle weiter reduziert. Dabei zeigte sich nur bei dem TT-Genotyp im Mittel eine etwas stärkere Reduktion der Oberflächenexpression von CD14 auf den in Medium inkubierten Zellen, im Vergleich zu den mit LPS stimulierten. Bei dem CC-Genotyp zeigte sich kein Unterschied zwischen den in Medium kultivierten oder den mit LTA oder LPS inkubierten PMN. Somit induzierten weder LTA noch LPS eine Hochregulation von CD14 auf der Oberfläche der PMN.

Bei den frischen Monozyten zeigte sich im Durchschnitt eine stärkere CD14-Oberflächenexpression auf den PMN des TT-Genotyps (Tab. 3b). Dies bestätigt die im Vollblut gemessenen Daten. Im Gegensatz zu den PMN nimmt bei den Monozyten die CD14-Expression nach 18 h nicht weiter ab. Dabei liegt jedoch eine ebenso große Standardabweichung innerhalb der Genotypen vor, wie zwischen ihnen. Daher gibt es keine statistisch nachweisbaren Unterschiede in der CD14-Expression auf PMN oder Monozyten zwischen den CC- und den TT-Genotypen .

Tab. 3 CD14-Expression auf PMN und Monozyten nach Stimulation mit LTA oder LPS.

a

Genotypen	CD14-Expression auf Neutrophilen Granulozyten [m _G]						
	Behandlung der Zellen						
	0 h	4 h Medium	4 h LTA	4 h LPS	18 h Medium	18 h LTA	18 h LPS
CC	86 ± 10	72 ± 10	77 ± 10	70 ± 11	17 ± 10	22 ± 12	22 ± 10
TT	88 ± 5	67 ± 7	73 ± 8	62 ± 9	11 ± 4	17 ± 9	23 ± 10

b

Genotypen	CD14-Expression auf Monozyten [m _G]			
	Behandlung der Zellen			
	0 h	18 h Medium	18 h LTA	18 h LPS
CC	470 ± 335	554 ± 355	501 ± 379	600 ± 300
TT	836 ± 510	791 ± 909	593 ± 559	618 ± 657

PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) (a) und PBMC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) (b) wurden in Medium oder mit LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) (a, b) oder LPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$, (a) und $100 \text{ pg}/\text{ml}$, (b)) für 4 h (a) oder 18 h (a, b) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem anti-CD14-PE Antikörper gefärbt und der Anteil der CD14-positiven Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Monozyten konnten dabei von den restlichen Leukozyten getrennt betrachtet werden (Abb. 26). Die CD14-Oberflächenexpression auf den PMN (a) und Monozyten (b) ist als Mittelwert [m_G] dargestellt (Tab. 3a, 3b). Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung von je neun (CC) oder acht (TT) Spendern angegeben.

3.3.8 Freisetzung von löslichem CD14 durch neutrophile Granulozyten

CD14 kommt nicht nur membranständig auf Zellen vor, es liegt auch als lösliches CD14 (sCD14) im Plasma vor. Dabei nimmt man zum einen an, dass CD14 von Zellen durch Peptidasen abgetrennt wird (87), zum anderen, dass es von Hepatozyten sezerniert werden kann (88). In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob die PMN der zwei Genotypen CC und TT einen Unterschied in ihrer sCD14-Abgabe zeigen. Dazu wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) in Medium mit und ohne LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 20 h inkubiert und die Überstände mit Hilfe eines ELISA auf seine sCD14-Menge untersucht. In den

Zellüberständen war sCD14 vorhanden. Die sCD14-Werte im Medium ohne Zellen lagen unterhalb des Detektionslimits (Daten nicht gezeigt). PMN setzten sCD14 sowohl im Medium als auch nach Inkubation mit LTA frei. Die Menge des sCD14 war bei den CC-Genotypen im Vergleich zu dem TT-Genotyp im Mittel leicht erhöht (Abb. 28 a,b). LTA zeigte aber nur eine sehr schwache Wirkung in Richtung einer leichten Erhöhung der sCD14-Abgabe im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Es ist bekannt, dass Spender des TT-Genotyps im Schnitt höhere sCD14-Werte im Plasma haben (B.). Um zu festzustellen, ob auch in dieser Untersuchung die Spender des TT-Genotyps im Plasma die erhöhten sCD14-Werte aufwiesen, wurde auch das Plasma dieser Spendergruppe untersucht. Die Menge an sCD14 im Plasma war tatsächlich bei dem TT-Genotyp im Trend erhöht (Abb. 28 c).

Diese Daten zeigen, dass zwar der TT-Genotyp tendenziell im Plasma höhere sCD14-Werte aufweist, jedoch die PMN des CC-Genotyps in der Zellkultur im Mittel die größeren Mengen sCD14 abgeben. Daher ist anzunehmen, dass die erhöhten sCD14-Werte im Plasma nicht von den PMN stammen.

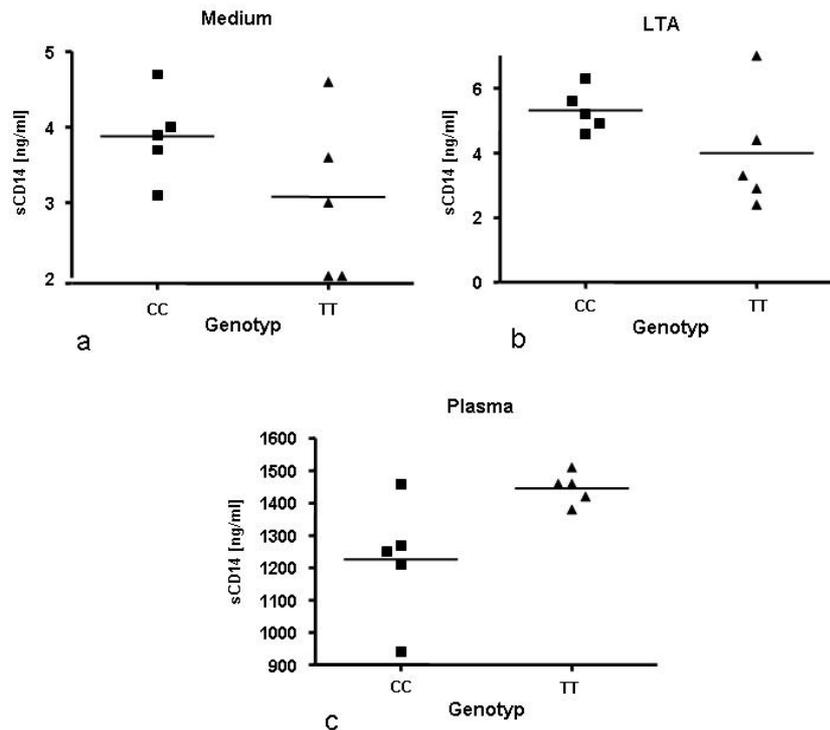


Abb. 28 Freisetzung von sCD14 durch PMN sowie Konzentration von sCD14 in Plasma. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 20 h in Medium (a) oder mit (b) LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Der sCD14-Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde der sCD14-Gehalt im Plasma bestimmt (c). Es sind die Konzentrationen von sCD14 in den Zellüberständen angegeben. Die Daten stammen von je fünf Spendern des CC- und des TT-Genotyps. Es sind die Mittelwerte markiert (-).

3.3.9 Untersuchung der Phagozytoseaktivität von PMN

Um Hinweise auf die funktionelle Bedeutung des Polymorphismus für die PMN während einer Infektion zu bekommen, wurde als *in vitro* Modell die Phagozytosefähigkeit der PMN von beiden Spendertypen untersucht. Es wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) von je drei Spendern für 1 h mit abgetöteten Bakterien (*S. aureus*) koinkubiert. Die Bakterien waren mit dem rot fluoreszierenden Alexa-Fluor-568 markiert. Die Bestimmung der Phagozytoserate erfolgte über die Durchflusszytometrie, wobei der Anteil der rot fluoreszierenden PMN an der Gesamtpopulation bestimmt wurde. Die PMN des CC-Genotyps wiesen hierbei eine signifikant stärkere Phagozytoseaktivität auf (Abb. 29).

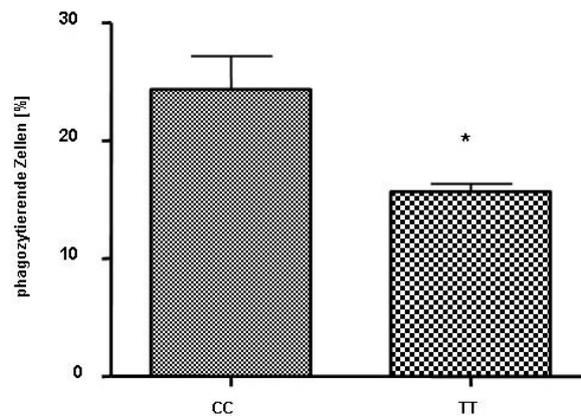


Abb. 29 Phagozytoseaktivität der PMN. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 1 h mit Alexa-Fluor-568-markierten Bakterien (*S. aureus*) koinkubiert. Die Bestimmung der Phagozytoserate erfolgte über die Auszählung der infizierten PMN auf Zytocentrifugenpräparaten am Mikroskop. Es ist der Prozentanteil der Zellen angegeben welche Bakterien phagozytiert haben. Es sind die Mittelwerte \pm SD von je drei Spendern eines Genotyps angegeben. Signifikante Unterschiede sind markiert (*), (Man-Whitney U Test).

3.3.10 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten

Zur Abtötung von Pathogenen besitzen die PMN in der Produktion von ROS eine wirksame Waffe. LPS und LTA sind in der Lage die PMN für eine fMLP-induzierte Produktion der ROS vorzustimulieren (7,52). Da die PMN des CC-Genotyps eine erhöhte Phagozytoserate zeigten (Abb. 29), sollte nun überprüft werden, ob auch Unterschiede in der Produktion der ROS zwischen dem CC- und dem TT-Genotyp vorhanden sind. Dazu wurde die Fähigkeit der PMN, nach Inkubation mit LTA oder LPS mit einer fMLP-induzierten Produktion von ROS reagieren zu können, untersucht. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) von je drei Spendern eines Genotyps wurden 90 min in Medium, mit LTA (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit LPS (20 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Produktion der ROS durch 5 min Inkubation mit fMLP (1 μM) ausgelöst. Die Menge der ROS-Produktion wurde über die Oxidation von DHR am Durchflusszytometer ermittelt. Es zeigt sich, dass die Inkubation mit LPS (Abb. 30b) einen größeren Anteil der PMN zu einer fMLP-induzierten ROS-Produktion vorstimulierte als die Inkubation mit LTA (Abb. 30a). Da 90 % und 100 % der PMN, durch LPS induziert, ROS produzierten,

wurde hier nicht der Anteil der ROS-produzierenden PMN, sondern die Stärke der ROS-Produktion im Mittelwert dargestellt. Es konnten in einem Spenderpool von jeweils 3 Spendern jedoch keine Unterschiede zwischen den CC- und den TT-Genotypen in der Produktion von ROS nach Aktivierung festgestellt werden (Abb. 30).

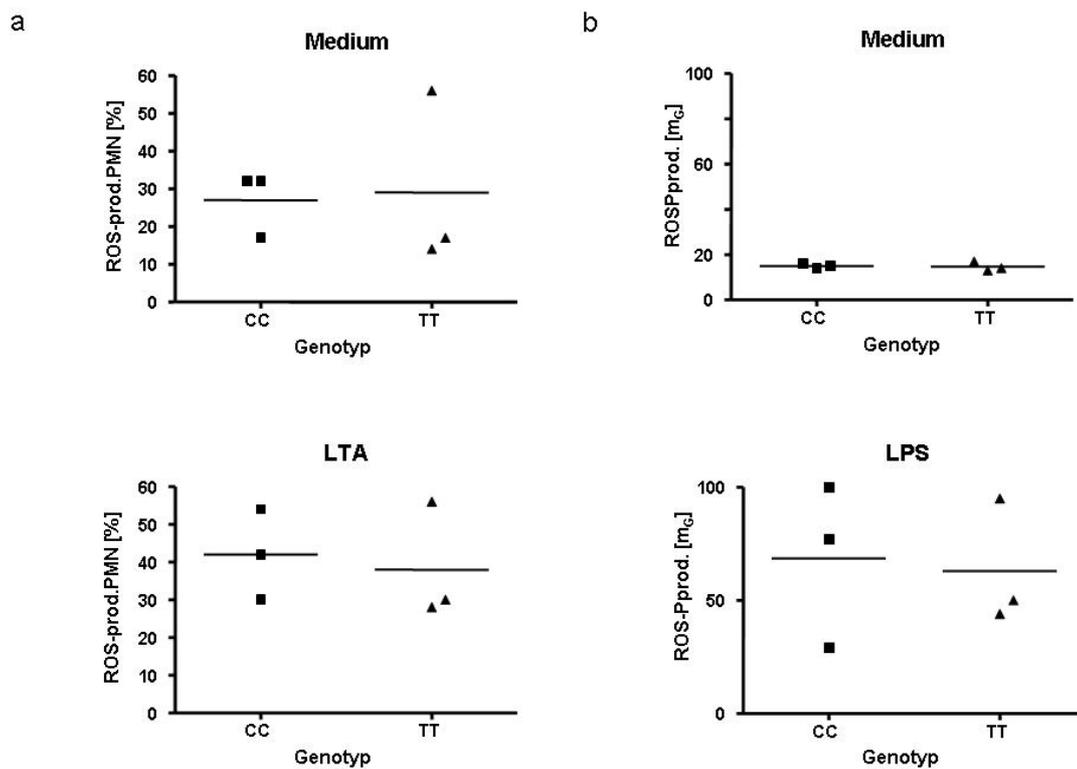


Abb. 30 Produktion von ROS durch PMN nach Vorstimulation mit LTA oder LPS und induziert durch fMLP. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 90 min in Medium, mit LTA ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit LPS ($20 \text{ ng}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend wurde die Produktion der ROS durch 5 min Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ fMLP ausgelöst. Die Stärke der ROS-Produktion wurde über die Oxidation von Dihydrorhodamin zum fluoreszierenden Rhodamin am Durchflusszytometer bestimmt. Es ist der Prozentanteil der ROS-produzierenden PMN angegeben (a) bzw. der Mittelwert der produzierten Rhodaminmenge (μg) (b). Es sind die Werte von je drei Spendern des CC und des TT-Genotyps angegeben, Mittelwerte sind markiert (-).

Ergebnisse Teil III

In diesem Teil der Arbeit konnten Hinweise auf eine verstärkte Aktivierbarkeit von PMN und Monozyten der CC-Genotypen im Vergleich zu den TT-Genotypen gefunden werden. So wies im Mittel ein größerer Anteil der PMN-Population des CC-Genotyps nach Inkubation mit LPS eine deutlich aktivierte Zellform auf als der des TT-Genotyps. Auch zeigten die PMN und PBMC des CC-Genotyps eine stärkere IL-8-Abgabe nach Stimulation mit LTA oder LPS als die des TT-Genotyps. Zudem zeigten die PMN des CC-Genotyps eine signifikant stärkere Phagozytoseaktivität auf, als die des TT-Genotyps.

3.4 Erstellung transgener Leishmanien

3.4.1 Integration einer für GFP- und DsRed-kodierenden „DNA-Cassette“ in das Genom von *Leishmania major*

Bei den zur Untersuchung des CD14-Promotorpolymorphismus eingesetzten Bakterien (*S. aureus*) handelt es sich um ein extrazellulär lebendes Pathogen. Um zusätzlich die Wirkung intrazellulärer Pathogene auf PMN untersuchen zu können, wurden rot- und grün-fluoreszierende Leishmanien erstellt. Leishmanien sind intrazellulär lebende Protozoen, die auch in PMN zu finden sind (89). Zur besseren Bestimmung der Menge intrazellulärer Leishmanien sowie um die Leishmanien nicht nur in fixierten und toten Zellen beobachten zu können, sollten die Leishmanien mit dem Gen für ein grün fluoreszierendes Protein, dem *enhanced green fluorescent Protein* (EGFP) bzw. für ein rot fluoreszierendes Protein, dem „DsRed“, (DsR) transfiziert werden. Bei EGFP handelt es sich um eine gentechnisch veränderte Mutante des GFP, einem Protein aus einer Qualle (*Aequoria victoria*), bei DsR handelt es sich um eine rot fluoreszierendes Protein aus einer Koralle der Art *Discosoma*. Zur stabilen Transfektion der Leishmanien mit den entsprechenden Genen, wurde eine „DNA-Cassette“ (65) mit einem Selektionsmarker und einer für EGFP oder DsR kodierenden DNA-Sequenz über Elektroporation in das Genom von *Leishmania major*, den Erreger der kutanen Leishmaniasis, integriert. Die Leishmanien, die erfolgreich transfiziert waren, wurden

über ihre Hygromyzinresistenz selektioniert und anschließend kloniert. Die transgenen Leishmanien zeigten im Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Fluoreszenz (Abb. 31). Dabei war die Expression der fluoreszierenden Proteine über ein Jahr stabil, die gesamte Zeit, in der sie in Dauerkultur gehalten wurden. Dabei wurden sie alle 10-14 Tage passagiert, also von einer Blutagarplatte auf die nächste überimpft.

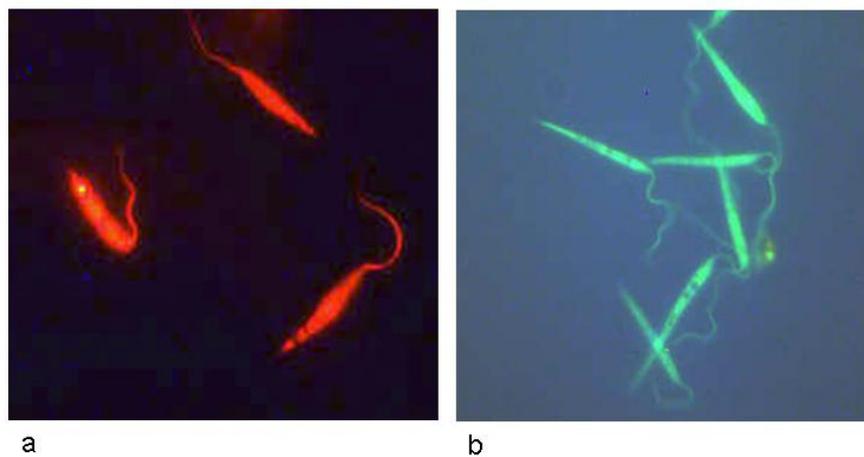


Abb. 31 Rot und grün fluoreszierende Leishmanien. *Leishmania major* (10^8 /ml) wurden über Elektroporation eine DsRed (a) oder eine EGFP- (b) tragende „DNA-Cassette“ in das Genom integriert. Fluoreszenzmikroskop, UV-Licht. Originalvergrößerung x1000.

3.4.2 Charakterisierung transgener Leishmanien

3.4.2.1 Wachstumsrate der transgenen Leishmanien

Um die genetisch veränderten Leishmanien mit dem ursprünglichen Stamm zu vergleichen, wurde eine Wachstumskurve des Ursprungsstammes und der beiden transfizierten Stämme erstellt (Abb. 32). Dazu wurde über eine Woche die Menge der Wildtyp-Leishmanien und der transgenen Leishmanien in den einzelnen Kulturen ausgezählt. Die transgenen Leishmanien zeigten keine Beeinträchtigung in ihrer Wachstumsrate. Sie wiesen sogar eine etwas höhere Wachstumsrate auf als der Wildtyp.

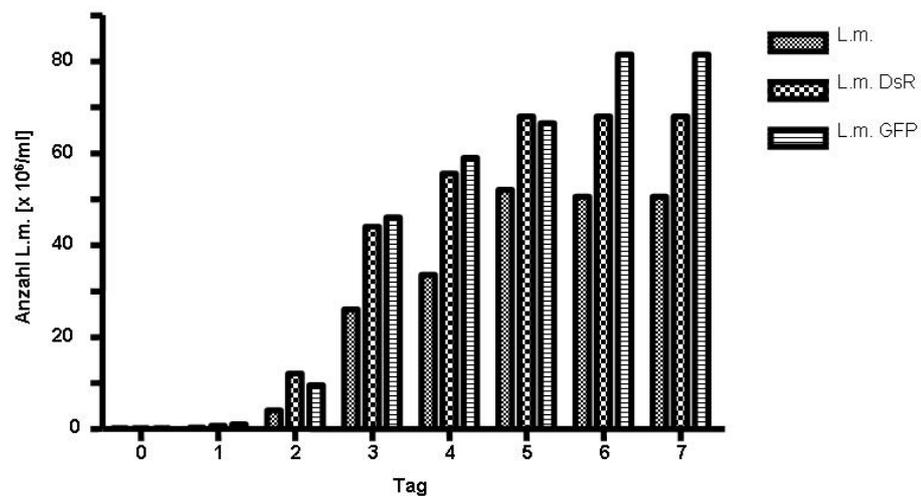


Abb. 32 Wachstumskurve der Wildtyp- und der transgenen Leishmanien. Leishmanien wurden in SDM kultiviert und über eine Woche täglich in einer Boyden-Kammer ausgezählt.

3.4.2.2 Transgene L.m. in neutrophilen Granulozyten

Leishmanien, die von PMN phagozytiert wurden, können in den PMN überleben (53,89). Um den Anteil der von den PMN aufgenommenen Leishmanien bestimmen zu können, ohne die Zellen fixieren und färben zu müssen, sollte die Fluoreszenz der Leishmanien in den PMN im Durchflusszytometer gemessen werden. Dazu wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) mit der 5-fachen Menge transgener DsR-Leishmanien koinkubiert. Nach 18 h wurden die PMN mit einem anti-CD66b-FITC-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer der Anteil der fluoreszierenden neutrophilen Granulozyten bestimmt. Um zu prüfen, ob die Rotfluoreszenz auch tatsächlich von Leishmanien in den PMN stammte und nicht von solchen, die an der Oberfläche der PMN adhären waren, wurden Zytopins angefertigt. Es zeigte sich, dass zumindest noch ein Teil der Leishmanien adhären und nicht phagozytiert war (Daten nicht gezeigt). Weitere Waschschrte könnten dieses Problem jedoch beheben. Da jedoch nur ein Teil der Leishmanien an den PMN adhären, kann , dass gefolgert werden, dass nach Abb. 33 rot fluoreszierenden Leishmanien auch in den Granulozyten gut im FACS sichtbar sind.

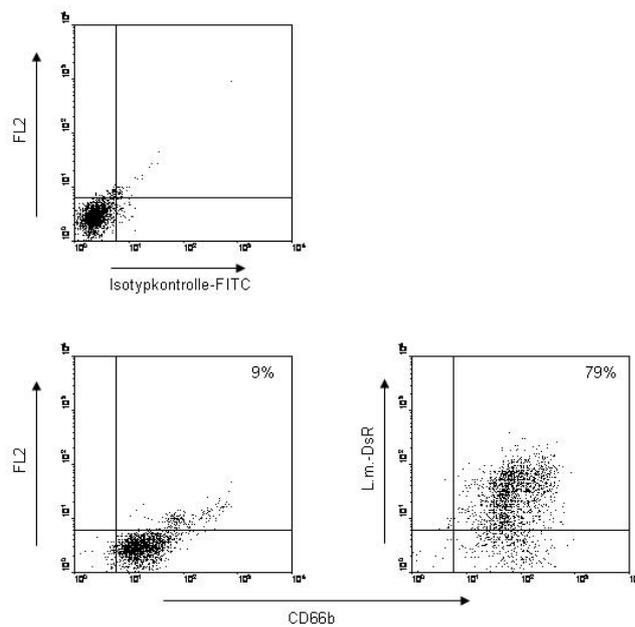


Abb. 33 DsRed-exprimierende Leishmanien. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit der 5-fachen Menge mit transgenen DsR-exprimierenden (roten) *L. major* bei 37°C koinkubiert. Nach 18 h wurden die Neutrophilen mit einem anti-CD66b-FITC-Antikörper gefärbt und die Fluoreszenzen der Granulozyten im Durchflusszytometer ausgewertet. Es ist der Prozentanteil der CD66b-gefärbten PMN angegeben der eine rote Fluoreszenz aufweist.

Ergebnisse Teil IV

Es wurden in diesem Teil der Arbeit transgene Leishmanien generiert, welche fluoreszierend auch in lebenden Granulozyten sichtbar sind.

3.5 Charakteristika antigenpräsentierender Zellen bei neutrophilen Granulozyten

Professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen, sind in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren. Dazu besitzen sie die zur Präsentation exogener Antigene notwendigen MHC-II-Moleküle sowie die zur Aktivierung der T-Zellen notwendigen kostimulatorischen Moleküle. Auch PMN können MHC-II-Oberflächenmoleküle exprimieren, welche für die Antigenpräsentation notwendig sind. Dies tun sie allerdings erst nach 2-4 Tagen (90). Dabei wurde nachgewiesen, dass

von den mit IFN- γ + GM-CSF stimulierten PMN nach 2 Tagen noch 70-90 % lebendig waren. Auf Einzelzellebene wurde jedoch nicht untersucht, ob die MHC-II-positiven PMN apoptotisch sind. Da es sich bei PMN jedoch um kurzlebige Zellen handelt, bei denen auch nach einer Stimulation mit IFN- γ + GM-CSF ein Teil der Zellen nach 18 h apoptotisch wird, stellte sich die Frage, ob die PMN, welche MHC-II-Moleküle exprimieren, apoptotisch sind.

Sollten die PMN eine Bedeutung für die Antigenpräsentation in den ersten Stunden einer Infektion haben, so wäre es sinnvoll, wenn sie neben den peptidpräsentierenden MHC-Molekülen auch die lipidpräsentierenden CD1-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten. Daher sollten die PMN in dieser Studie auch auf die lipid- und glykolipidpräsentierenden CD1-Moleküle CD1a und CD1b getestet werden und, sofern sie ein CD-1-Molekül exprimieren, ein T-Zell-Test durchgeführt werden, um die Funktionalität des Moleküls zu überprüfen.

3.5.1 Neutrophile Granulozyten exprimieren MHC-II-Moleküle nach Stimulation mit IFN γ und GM-CSF

Zuerst wurden die bekannten Daten reproduziert. Nach 72 h Inkubation zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine deutliche Oberflächenexpression des MHC-II Allels HLA-DR auf einigen der mit IFN γ und GM-CSF stimulierten PMN (Daten nicht gezeigt). Um zu prüfen, ob es sich bei den HLA-DR-exprimierenden PMN um apoptotische Zellen handelte, wurden PMN (5×10^6 /ml) über 48 h in Medium oder mit IFN- γ (100 u/ml) + GM-CSF (100 u/ml) inkubiert. Die PMN wurden anschließend mit einem anti-HLA-DR-PE Antikörper und zugleich mit AnnexinV-FITC gefärbt, um den Anteil der MHC-II-positiven und der zugleich apoptotischen PMN zu bestimmen. Die gefärbten PMN wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Bei einem Spender war schon nach 48 h eine Oberflächenexpression von MHC-II zu erkennen (Abb. 34). Die HLA-DR/AnnexinV-FITC-Doppelfärbung zeigte, dass ein Teil der PMN, die HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimierten, zugleich apoptotisch war. Ein anderer Teil der PMN, der HLA-DR auf seiner Oberfläche exprimierte, war jedoch nicht apoptotisch (ca. 11 % der Zellen).

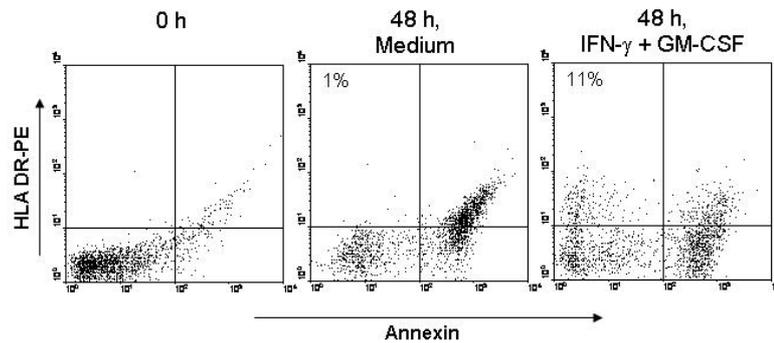


Abb. 34 PMN exprimieren HLA-DR nach Inkubation mit IFN γ + GM-CSF. PMN (5×10^6 /ml) wurden über 48 h in Medium oder mit IFN γ (100 u/ml)+GMCSF (100 u/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-HLA-DR-PE-Antikörper und mit AnnexinV-FITC gefärbt. Der Anteil der HLA-DR-positiven Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind die Prozentzahlen der HLA-DR-positiven und zugleich nicht-apoptotischen PMN angegeben.

3.5.2 PMN exprimieren CD1a- und CD1b- Moleküle auf ihrer Oberfläche

MHC-II-Moleküle präsentieren Peptidantigene. Lipid- und Glykolipidantigene dagegen werden über die Gruppe der CD1-Moleküle präsentiert. Die CD1-Moleküle sind typischerweise auf den dendritischen Zellen (DC) zu finden. Es gibt keine Daten, die eine CD1-Expression auf PMN nachweisen. In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob PMN in der Lage sind neben MHC-II-Molekülen auch die CD1-Moleküle CD1a und CD1b zu exprimieren. Dazu wurden PMN (5×10^6 /ml) frisch oder nach 20 h Inkubation in Medium oder mit IFN γ (100 u/ml) + GM-CSF (100 u/ml) mit einem anti-CD1a-RD1 oder einem anti-CD1b-PE Antikörper gefärbt sowie mit einem Isotypkontrollantikörper. Die Stimulation mit IFN- γ +GM-CSF wurde ausgewählt, da sie zu einer MHC-II-Oberflächexpression auf den PMN führt. CD1b war bei einem Teil der Spender sogar schon auf den frisch isolierten Zellen zu finden. Die PMN exprimierten CD1b nach 20 h, sowohl in Medium als auch nach Stimulation mit IFN- γ + GM-CSF, wobei die Expression auf den unstimulierten PMN höher als auf den stimulierten war (Abb. 35). CD1a war nur auf apoptotischen Zellen zu finden. Dies weist darauf hin, dass die zumindest die CD1a-Expression mit der Apoptose der PMN gekoppelt ist.

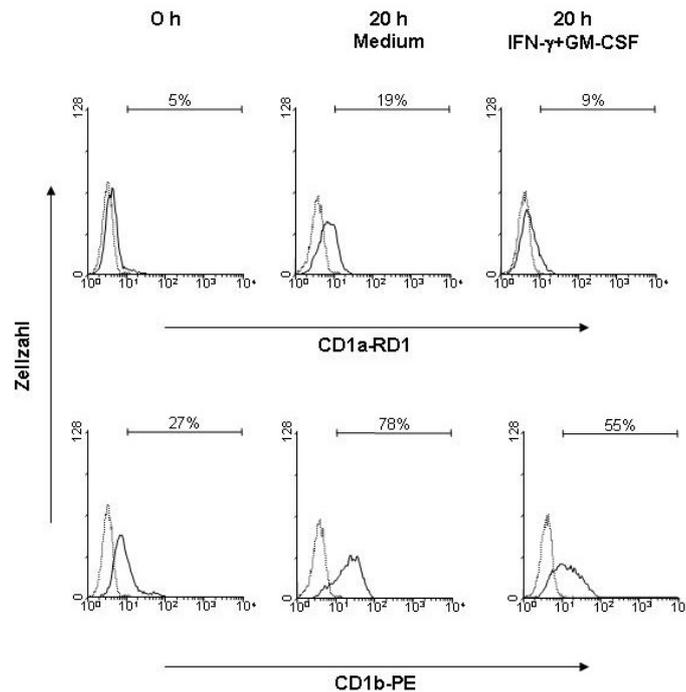


Abb. 35 PMN exprimieren CD1a und CD1b. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden frisch oder nach 20 h in Medium oder in $\text{IFN}\gamma$ (100 u/ml)+GM-CSF (100 u/ml) inkubiert und mit einem anti-CD1a-RD1 oder einem anti-CD1b-PE Antikörper gefärbt, sowie mit einem Isotypkontrollantikörper (PE) (gestrichelte Linie). Die Färbung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Histogramme sind repräsentativ für drei Versuche. Die Prozentzahlen geben an, wie viel Prozent der PMN CD1a bzw. CD1b auf ihrer Oberfläche exprimierten.

3.5.3 Expression von CD1-Molekülen auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten

Da die CD1a und die CD1b-Expression auf neutrophilen Granulozyten nach 20 h im Medium zunimmt (Abb. 27), sollte hier überprüft werden, ob die PMN, die CD1a oder CD1b exprimieren, apoptotisch sind. Dazu wurden PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) frisch oder nach 20 h in Medium oder mit GM-CSF (100 u/ml) + $\text{IFN}\gamma$ (100 u/ml) inkubiert und mit einem anti-CD1a-RD1 oder einem anti-CD1b-PE-Antikörper sowie mit AnnexinV-FITC gefärbt. Die Färbung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Es zeigte sich, dass die CD1a-exprimierenden PMN apoptotisch sind, wohingegen CD1b teilweise auch von nicht-apoptotischen PMN exprimiert wurde (Abb. 36).

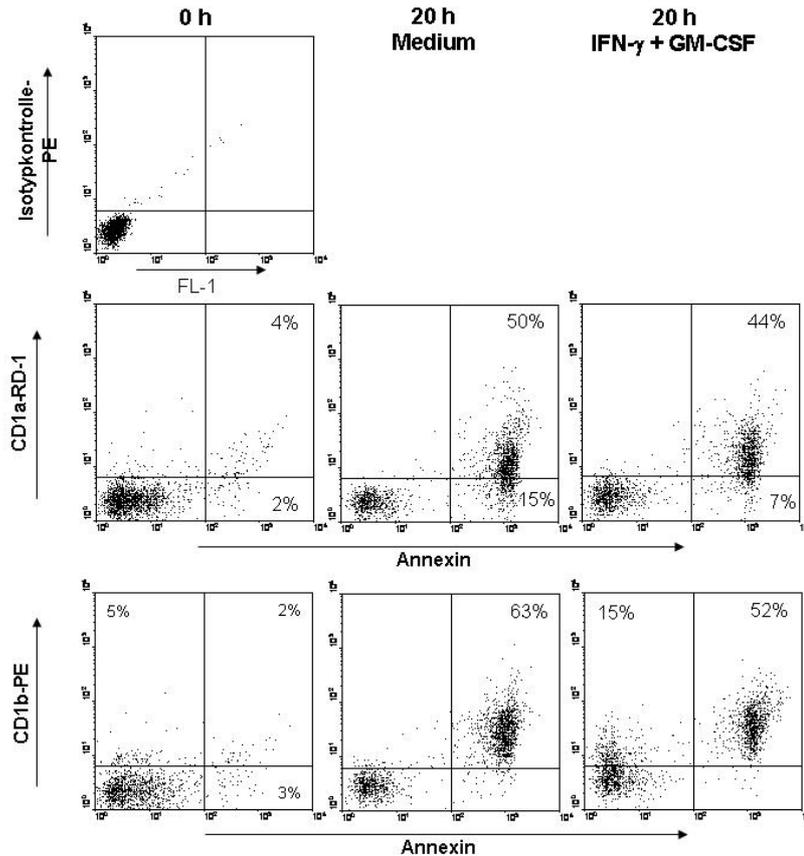


Abb. 36 CD1a- und CD1b- Oberflächenexpression auf apoptotischen PMN. PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden frisch oder nach 20 h in Medium oder in GM-CSF (100 u/ml) + IFN γ (100 u/ml) inkubiert und mit einem anti-CD1a-RD1 oder einem anti-CD1b-PE Antikörper und mit AnnexinV-FITC gefärbt. Die Färbung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Es sind die Prozentzahlen des Anteils der CD1a- bzw. der CD1b-positiven Zellen, die gleichzeitig apoptotisch bzw. nicht-apoptotisch waren, angegeben. Die Dot-Blots zeigen ein repräsentatives von zwei Experimenten.

3.5.4 CD1b-positive neutrophile Granulozyten aktivieren keine CD1b-spezifischen T-Zellen

PMN können peptidspezifische T-Zellen zur Proliferation anregen (62). Da bisher noch kein CD1b auf PMN nachgewiesen wurde, fehlen entsprechende Tests bezüglich der Aktivierung CD1b-restringierter T-Zellen. Da in dieser Arbeit CD1b auf der Oberfläche von PMN nachgewiesen werden konnte, sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob PMN auch CD1b-spezifische T-Zellen zur Proliferation aktivieren können. Es wurden PMN ($5 \times 10^4/\text{ml}$), transmigrierte PMN ($5 \times 10^4/\text{ml}$) oder mit 5000 rad bestrahlte heterologe CD1⁺DCs ($5 \times 10^4/\text{ml}$) für 72 h mit T-Zellen ($5 \times 10^4/\text{ml}$) einer CD1b-restringierten T-Zelllinie, die spezifisch für mykobakterielle Antigene war, in 200 μl

koinkubiert, jeweils mit und ohne mykobakterielle Antigene. Anschließend wurde ein [³H]-Thymidininkorporationsassay durchgeführt. Dabei dienten die DC als professionelle antigenpräsentierende Zellen der Positivkontrolle. Das Gemisch aus mykobakteriellen Antigenen lieferte die Antigene, welche über CD1b präsentiert werden können. Es zeigte sich, dass nur die dendritischen Zellen die T-Zellen aktivieren konnten, die Granulozyten vermochten dies nicht. Auch die transmigrierten PMN, welche schon zu Beginn des Experimentes zu 20 % positiv für CD1b waren, waren dazu nicht in der Lage (Tab. 4). Das CD1b auf der Zelloberfläche von PMN scheint nicht funktionell zu sein.

Tab. 4 PMN sind nicht in der Lage CD1b-restringierte T-Zellen zur Proliferation zu aktivieren.

Ansatz	TC	TC+AG	T+DC	T+DC+AG	T+PMN	T+PMN+AG	T+PMNTr	T+PMNtr+AG
cpm	22	21	52	1345	30	37	44	52

PMN ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$), transmigrierte PMN ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) oder mit 5000 rad bestrahlte heterologe CD1⁺APCs ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) wurden für 72 h mit T-Zellen (LDN4) ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) koinkubiert, mit oder ohne mykobakterielle Antigene. Anschließend wurde ein [³H]-Thymidininkorporationstest durchgeführt. Es sind hier die „Counts“ pro Minute (cpm) angegeben, welche die Proliferation der T-Zellen repräsentieren. (TC = T-Zellen, AG = Antigen, PMNtr = transmigrierte PMN).

Ergebnisse Teil V

Es konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten CD1a und CD1b auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dabei ist CD1a nur auf apoptotischen Zellen und CD1b zum großen Teil auf apoptotischen Zellen zu finden. Eine Funktionalität konnte CD1a und CD1b noch nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind von zentraler Bedeutung für die Abwehr von Pathogenen in der ersten Phase einer Infektion. Chemokine leiten die im Blut zirkulierenden Granulozyten („Gefäßgranulozyten“) zum Infektionsherd im Gewebe. Dort phagozytieren die PMN eingedrungene Pathogene und zerstören sie u.a. mit Hilfe proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten untersucht. Der erste Teil (I) dieser Arbeit diente der Etablierung eines Transmigrationssystems zur *in vitro* Generierung von Gewebsgranulozyten und ihrer Charakterisierung. In dem zweiten Teil (II) der Arbeit wurde die Aktivierbarkeit von PMN durch die bakteriellen Bestandteile MALP-2 und Pam₃CysSK₄ untersucht. In dem dritten Teil (III) wurde geprüft, ob der CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der PMN hat. In dem vierten Teil (IV) wurden Leishmanien mit für GFP bzw. für DsR kodierenden Genen transfiziert. Schließlich wurde im fünften Teil (V) die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten, Lipidantigene zu präsentieren, untersucht.

Die Daten zeigen, dass die transendotheliale Migration PMN für Effektorfunktionen vorstimuliert (I). Die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wirken in unterschiedlichen Konzentrationen aktivierend auf die PMN (II). Es gibt Hinweise darauf, dass der CD14-Promotorpolymorphismus die Aktivierbarkeit von PMN beeinflusst (III). Die transfizierten Leishmanien exprimieren GFP bzw. DsR (IV). PMN exprimieren die antigenpräsentierenden Moleküle CD1a und CD1b auf ihrer Oberfläche (V).

4.1 Transmigration

Die Migration durch die Endothelzellschicht der Blutgefäße in infiziertes Gewebe stellt ein Schlüsselereignis für die PMN dar, welches sie auf ihre Abwehrfunktionen vorbereitet. So weisen transmigierte PMN *in vivo* einen proinflammatorischen Phänotyp auf, der u.a. durch eine erhöhte Phagozytoseaktivität wie auch durch eine

verstärkte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies charakterisiert ist (67). In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Transmigrationssystem aus einer Einzelzellschicht humaner Nabelschnurzellen (HUVEC) auf einer Gelatineschicht etabliert. Konfluente *Monolayer* der Endothelzellen, wie sie *in vivo* vorhanden sind, konnten erfolgreich auf mit Gelatine beschichteten Transwelleinsätzen kultiviert werden. Die mit Kollagen beschichteten Transwelleinsätze eigneten sich nicht dafür. PMN enthalten Gelatinase B (91), diese verdaut denaturiertes Kollagen (Gelatine) ebenso, wie Typ IV Kollagen (92), welches auch in der Basalmembran vorhanden ist (93). Somit bietet das hier genutzte System neben einer Endothelzelleinzelschicht auch eine Basalmembran, deren Durchquerung, wie *in vivo*, mit Hilfe der Gelatinase B möglich ist. Zudem wurde zur Induktion der Transmigration IL-8 eingesetzt, welches auch *in vivo* ein für die PMN relevantes Chemokin ist. Daher erlaubte das hier verwendete *in vitro*-Transmigrationssystem eine Simulation der *in vivo* Transmigration zur Generierung von Gewebsgranulozyten. Da das Endothel im Bereich des Infektionsherdes *in vivo* bereits durch bakterielle Bestandteile, wie LPS oder auch inflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF- α , aktiviert ist, wurden in dieser Arbeit bei einigen Versuchen die HUVEC des *Monolayers* ebenfalls durch die bakteriellen Bestandteile MALP-2 oder LPS aktiviert.

Die Experimente zur Charakterisierung der Gewebsgranulozyten zeigten, dass die Transmigration eine aktivierende Wirkung auf die PMN hat. So bewirkte die Transmigration eine Degranulation der PMN sowie das *Shedding* von CD62L. Die Transmigration durch den mit LPS aktivierten HUVEC-*Monolayer* mit nachfolgender Stimulation der PMN durch LPS induzierte zudem die Oberflächenexpression von CD69. Außerdem führte die Transmigration zu einer Vorstimulation für die ROS-Produktion und für die Apoptoseverzögerung.

Die transmigrierten PMN wiesen ähnliche Formen der Aktivierung auf, wie sie auch in anderen *in vitro*-Transmigrationssystemen induziert werden. So zeigte sich, dass das für die Phagozytose wichtige Membranmolekül CD11b nach 8 Stunden auf den mit IL-8 behandelten PMN nur sehr schwach exprimiert war. Dagegen wiesen die transmigrierten PMN eine sehr starke Oberflächenexpression von CD11b auf. Ähnliche Ergebnisse bezüglich PMN zeigte Hofman *et al.* in einem Transmigrationssystem mit Pulmonalarterienzellen (HPAEC) (94). Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete *Shedding* von CD62L nach Transmigration der PMN ist ebenfalls in einem anderen

System mit HPAEC auf einer mit Typ-IV-Kollagen beschichteten Membran für PMN gezeigt worden (95). Dies deutet darauf hin, dass die grundlegende Aktivierung, die durch eine Transmigration ausgelöst wird, auch in unserem System induziert wird. Damit konnte hier ein System etabliert werden, welches die Generierung von Gewebsgranulozyten ermöglicht.

Das frühe Leukozyten-Aktivierungsmolekül CD69 wird aufgrund von *in vitro* Daten als proinflammatorisch eingestuft (72). So induzieren anti-CD69 mAbs in Gegenwart von Phorbolestern die TNF- α -Produktion durch T-Lymphozyten (96), sowie die NO-Sekretion durch Monozyten (97). Für CD69 auf PMN wird eine Rolle bei der Exozytose von Granula postuliert (71). Zudem exprimieren PMN von Patienten mit rheumatoider Arthritis CD69 (98). Für PMN ist die Induktion einer Oberflächenexpression von CD69 u.a. durch GM-CSF beschrieben (99). Die Induktion der Oberflächenexpression von CD69 nach Transmigration durch eine aktivierte Endothelzellschicht ist bereits für T-Zellen (100) und eosinophile Granulozyten (101) bekannt. Es zeigte sich in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen, dass die Transmigration durch eine mit LPS aktivierte Endothelzellschicht mit nachfolgender Stimulation durch LPS auch auf PMN zu einer Oberflächenexpression von CD69 führt. Die Bedeutung von CD69 ist noch schwer abzuschätzen, da sowohl sein Ligand als auch seine genauen Funktionen noch nicht bekannt sind. Es gibt inzwischen Hinweise, dass CD69 auf T-Zellen über die Induktion der Synthese des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β zumindest in Mäusen auch immunregulatorische Fähigkeiten besitzt (72). Die Vorstimulation der PMN durch Transmigration für die Oberflächenexpression von CD69 ist zumindest ein Hinweis auf die Vorstimulation der PMN für weitere, bislang noch unbekannte Funktionen.

Aufgrund der Fähigkeit von PMN durch die Produktion von ROS zu einer Gewebszerstörung zu führen, besteht ein Bedarf an regulatorischen Mechanismen. Einige sind bereits bekannt, wie z.B. die Freisetzung von NO durch Endothelzellen (HUVEC) (102). Dabei inhibiert das NO die transendotheliale Migration (TEM) der PMN. Kommt es dennoch, z.B. aufgrund einer Infektion, zu einer Transmigration, so ist ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen der Aktivierung der PMN und der Minimierung einer Gewebszerstörung notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass die Transmigration alleine keine Produktion von ROS induziert, wie nach

den Befunden von Nadeau *et al.* (103) zu erwarten war. Sie führte jedoch zu einer Vorstimulation, so dass eine nachfolgende Stimulation mit fMLP eine Produktion der ROS induzierte. Ebenso bewirkte die Transmigration alleine nur eine schwache Apoptoseverzögerung. Dagegen führte die Transmigration durch einen mit dem Lipopeptid MALP-2 oder mit LPS aktivierten HUVEC-Monolayer mit nachfolgender Inkubation der PMN mit MALP-2 oder LPS zu einer langfristigen Apoptoseverzögerung, die auch nach 20 Stunden noch sichtbar war. Weder MALP-2 noch LPS hatten ohne Transmigration eine langfristige apoptoseverzögernde Wirkung. Allerdings bewirkte MALP-2 eine kurzzeitige Verzögerung der Apoptose, erkennbar nach 6 Stunden aber nicht mehr nach 20 Stunden (s. Teil II). Somit verlängerte bzw. verstärkte die Transmigration die Wirkung von MALP-2 bzw. LPS. Die von Le'Negrate *et al.* beschriebene Apoptoseverzögerung nach 12 Stunden bei transmigrierten PMN ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen der PMN oder auch auf eine FCS-Charge mit aktivierender Wirkung auf die PMN zurückzuführen (104). Aufgrund der hohen Reinheit der von uns verwendeten Zellen sowie der Nutzung von für PMN nicht-aktivierendem FCS können die hier beobachteten Vorstimulationen direkt auf die Transmigration zurückgeführt werden. Dabei ist fraglich, inwieweit die Transmigration selber eine nur schwach aktivierende Funktion hat und inwieweit auch andere regulatorische Mechanismen eine Rolle spielen.

Zusammengefasst zeigen die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Versuche, dass die Transmigration PMN auf ihre Funktionen im Gewebe vorbereitet. Dabei sorgt sie zwar für eine Vorstimulation, aktiviert jedoch die Effektorfunktionen nicht selber. Diese könnten zum einen zu unnötigen Gewebszerstörungen führen und zum anderen die neutrophilen Granulozyten vorzeitig in ihren späteren Abwehrfunktionen schwächen, bevor sie auf das eigentliche Pathogen treffen. Die Transmigration stellt also nur den ersten Schritt auf dem Weg zu einer möglichst starken Aktivierung der PMN dar.

4.2 Aktivierbarkeit von PMN durch die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄

Die Erkennung mikrobieller Bestandteile durch das angeborene Immunsystem beruht u.a. auf den Toll-like-Rezeptoren (TLRs). So wird das Lipopeptid Pam₃CysSK₄ über

TLR2/1 und das Lipopeptid MALP-2 über TLR2/6 erkannt, wie an Peritonealmakrophagen von knock-out-Mäusen als auch an einer humanen Monozytenzelllinie gezeigt werden konnte (34,35,36). Da PMN neben TLR2 sowohl TLR1 als auch TLR6 exprimieren (105), besitzen sie die Voraussetzungen dafür diese Lipopeptide zu erkennen. In diesem Teil der Arbeit wurde die Reaktivität neutrophiler Granulozyten auf Pam₃CysSK₄ sowie auf MALP-2 untersucht. Da die Nutzung der Rezeptorkombinationen TLR2/1 und TLR2/6 unterschiedliche Aktivierungserscheinungen bei murinen Makrophagen bedingen kann (106,107), sollte hier ebenfalls geprüft werden, ob die Aktivierung der PMN über TLR2/1 im Gegensatz zu derjenigen über TLR2/6 auch für die humanen Granulozyten eine funktionelle Bedeutung haben könnte.

Die zur Untersuchung der Wirkung von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ auf PMN durchgeführten Versuche zeigten, dass beide Lipopeptide ähnliche Formen der Aktivierung induzieren. So induzierten beide Lipopeptide neben der Freisetzung von IL-8 auch morphologische Veränderungen, Degranulation und das *Shedding* von CD62L. Beide Lipopeptide induzierten eine chemokinetische Bewegung und die Freisetzung von MIP-1 β . Zudem führten beide Lipopeptide zu einer Verstärkung der Effektorfunktionen, wie der Phagozytose von Bakterien und der Vorstimulation für eine fMLP-induzierte Produktion von ROS. Auch bewirkten sie eine kurzzeitige Verzögerung der Apoptose. Die durch MALP-2 induzierte IL-8-Freisetzung war CD14-abhängig.

MALP-2 bewirkte im Gegensatz zu Pam₃CysSK₄ die Aktivierung der PMN bereits in einer 10⁻³-fachen Konzentration wie Pam₃CysSK₄. Die PMN der Spender reagierten auf 10 ng/ml MALP-2 mit einer deutlichen IL-8-Freisetzung. Dagegen reagierten die Spender unterschiedlich stark auf Pam₃CysSK₄. Einige Spender benötigten 100 ng/ml und andere 10 μ g/ml, um eine deutliche IL-8-Freisetzung zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Spenderabhängigkeiten könnten auf einen Einzelnukleotidpolymorphismus zurückzuführen sein, wie er z.B. in Teil III dieser Arbeit beschrieben wird. Die höhere Sensitivität der PMN für MALP-2 im Vergleich zu Pam₃CysSK₄ könnte durch eine stärkere Oberflächenexpression von TLR6 auf den PMN im Vergleich zu TLR1 bedingt sein, welche wiederum auch auf eine unterschiedliche Regulation der Oberflächenexpression von TLR1 und TLR6 durch die Stimulation mit MALP-2 bzw.

Pam₃CysSK₄ zurückzuführen sein könnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die verschiedenen zur Aktivierung der PMN notwendigen Konzentrationen verantwortlich sind. Dabei könnte Pam₃CysSK₄ eine geringere Bindungsaffinität für TLR2/1 aufweisen als MALP-2 für TLR2/6. Da auch der Rezeptor CD14 und das Protein LBP wichtig für die Bindung von Lipopeptiden sind, könnten auch Bindungsaffinitäten zu diesen beiden Molekülen eine Rolle spielen. Sollte TLR1 weniger von CD14 profitieren, so könnte eine höhere Konzentration des Liganden die Notwendigkeit der Nutzung des membrangebundenen CD14 umgehen, wie es schon für den TLR4-Liganden LPS beschrieben worden ist (108). Da Nakoa *et al.* (105) eine stärkere Oberflächenexpression von TLR1 im Vergleich zu TLR6 auf den PMN beschrieben hat, ist anzunehmen, dass die unterschiedlich wirksamen Konzentrationen von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ eher auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten der beiden Substanzen zu ihren Rezeptoren zurückzuführen sind. Es wird postuliert, dass zur Erkennung von Lipopeptiden die gleichen Regionen von TLR2 involviert sind (36). So scheinen bei TLR2 die Leucin-rich-repeats (LRRs) 7-10, bei TLR1 und TLR6 die LRRs 9-12 von Bedeutung zu sein (36,109), wobei TLR1 und TLR6 eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (37). Die Bindung von MALP-2 und Pam₃CysSK₄ an gleiche Domänen von TLR2 könnte die ähnlichen Aktivierungserscheinungen bei den PMN nach Stimulation mit den zwei Lipopeptiden erklären. Somit weist diese Arbeit darauf hin, dass Lipopeptide, egal ob sie von PMN über TLR1 oder über TLR6 erkannt werden, an gleiche Domänen von TLR2 binden und dadurch ähnliche Funktionen induzieren könnten. Die Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Rezeptoren für MALP-2 und Pam₃CysSK₄ wird dadurch erschwert, dass Pam₃CysSK₄ neben seiner starken Bindung an TLR2/1 auch eine schwachere Affinität zu TLR2/6 aufweist (36).

Um eine Infektion bekämpfen zu können, müssen Zellen der Immunabwehr, wie PMN und Monozyten, den Weg in das Gewebe finden. Dies kann sowohl direkt durch chemotaktische Wirkungen der bakteriellen Bestandteile ermöglicht werden als auch indirekt durch die Freisetzung von Chemokinen durch bereits im Gewebe vorhandene aktivierte Zellen. Beide hier untersuchten Lipopeptide waren in der Lage, die PMN zu einer chemokinetischen Bewegung anzuregen. Diese reflektiert, wie durch die Migrationsexperimente gezeigt, eine erhöhte Motilität. Die erhöhte Motilität könnte die

Funktionen der PMN im Gewebe, z.B. die Phagozytose, unterstützen. Es zeigte sich zudem, dass beide Lipopeptide, neben der Freisetzung von IL-8, auch die Freisetzung von MIP-1 β durch PMN induzierten. Anders als IL-8, welches chemotaktisch auf PMN wirkt, hat MIP-1 β neben der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten und dendritische Zellen auch eine auf CD4-T-Lymphozyten. Dies deutet darauf hin, dass nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen die PMN durch Zytokinfreisetzung auch für die Regulation der adaptiven Immunantwort wichtig sind.

MALP-2 als auch Pam₃CysSK₄ bewirkten eine kurzzeitige Apoptoseverzögerung bei den PMN. MALP-2 induzierte allerdings keine längerfristige Apoptoseverzögerung bei den PMN. Dieses Phänomen wurde bereits von Parker *et al.* für Pam₃CysSK₄ beschrieben (110). So zeigten PMN nach Stimulation mit Pam₃CysSK₄ nur zu einem frühen Zeitpunkt eine apoptoseverzögernde Wirkung auf die PMN, nicht aber nach 22 h (111). Die längerfristige Verzögerung der Apoptose der PMN durch einen anderen TLR2-Agonisten, das LTA, wurde der Bindung an eine andere Bindungsdomäne des TLR2 zugeschrieben (52,112). Zudem wurde darauf hingewiesen, dass auch die Nutzung unterschiedlicher TLR2-Kombinationen, nämlich mit TLR1 oder mit TLR6, dafür verantwortlich sein könnte. Die in der hier vorliegenden Studie gewonnenen Daten sprechen allerdings dagegen, dass die Nutzung unterschiedlicher Kombinationen von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 dafür verantwortlich ist. So ist nicht nur die Stimulation von TLR2/1 durch Pam₃CysSK₄ unzureichend für die Induktion einer langzeitigen Apoptoseverzögerung (113), sondern, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch die Stimulation von TLR2/6 mit MALP-2. Anders als bei Sabroe *et al.* (113) und in der hier vorliegenden Studie, beschreibt Power (85) die Induktion einer langzeitigen Apoptoseverzögerung der PMN auch durch Pam₃CysSK₄. Dabei wurde teilweise mit nur 10 ng/ml Pam₃CysSK₄ eine ungewöhnlich niedrige Konzentration eingesetzt. Die von Power *et al.* beschriebenen Effekte könnten auf das FCS zurückzuführen sein. Eine Vorstimulation der PMN durch FCS würde eine verstärkte Wirkung von Pam₃CysSK₄ erklären. Das in dieser Arbeit verwendete FCS hatte keine vorstimulierende Wirkung auf die PMN. Somit kann die Aktivierung der PMN auf die Lipopeptide zurückgeführt werden.

CD14 spielt für die Bindung von Lipopeptiden an die Komplexe mit TLR2 eine Rolle (114). Die durch MALP-2 bewirkte IL-8-Freisetzung war zumindest teilweise CD14-

abhängig. Zwei Spender wiesen eine teilweise über CD14 vermittelte IL-8-Freisetzung auch nach Stimulation mit Pam₃CysSK₄ auf. Im Falle des einen Spenders blieb die Blockierung jedoch wirkungslos. Für niedrige Konzentrationen von Pam₃CysSK₄ wurde eine CD14-Abhängigkeit beschrieben. Allerdings waren hohe Konzentrationen von Pam₃CysSK₄ nicht mehr von CD14 abhängig (85). Deshalb ist anzunehmen, dass auch in dieser Arbeit der Effekt der CD14-Blockierung bei der Stimulation mit Pam₃CysSK₄ im Falle des einen Spenders durch die hohe Menge des Liganden aufgehoben wurde. Für die beiden anderen Spender war die eingesetzte Konzentration von Pam₃CysSK₄ wahrscheinlich noch nicht hoch genug, um CD14-unabhängig zu wirken. Allerdings sind Spenderabhängigkeiten bei PMN nicht unbekannt (115). Hohe Konzentrationen von Pam₃CysSK₄ können also anscheinend auch über einen CD14-unabhängigen Weg erkannt werden. Ein solcher Mechanismus wurde nicht nur in Bezug auf die oben erwähnte Apoptoseverzögerung gezeigt, sondern auch in Bezug auf die CD11b-Expression auf PMN (116). Die Ergebnisse zeigen also eine CD14-Abhängigkeit der durch MALP-2 und zum großen Teil auch durch Pam₃CysSK₄ induzierten IL-8-Freisetzung. Die IL-8-Freisetzung ist jedoch nur teilweise durch den anti-CD14 Antikörper inhibiert worden. Durch die hohe Konzentration des eingesetzten anti-CD14 Antiköper ist nicht anzunehmen, dass es sich um eine unzureichende Blockierung handelt. Da die CD14-Blockierung die IL-8-Freisetzung nur um ca. die Hälfte verringerte, ist anzunehmen, dass CD14 nicht alleine verantwortlich für die Bindung der Lipopeptide ist. Wahrscheinlich verbessert es die Erkennung der Lipopeptide, ist aber, bei den von uns genutzten Konzentrationen, nicht essentiell. Dabei ist zumindest die Erkennung von MALP-2 nicht an eine hohe Konzentration des Lipopeptids gebunden.

Insgesamt konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass das Lipopeptid MALP-2 in sehr viel geringeren Konzentrationen eine aktivierende Wirkung auf PMN hat als Pam₃CysSK₄. Dabei induzieren MALP-2 und Pam₃CysSK₄ bei PMN ähnliche Aktivierungserscheinungen, obwohl sie über die unterschiedlichen Rezeptorkombinationen TLR2/6 und TLR2/1 erkannt werden.

4.3 Bedeutung des CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T für die Reaktivität neutrophiler Granulozyten auf bakterielle Bestandteile

Das membrangebundene CD14 (mCD14) ist für die Aktivierbarkeit von PMN und Monozyten sowohl durch TLR2-Liganden als auch durch TLR4-Liganden wichtig (41,116,117). Es gibt Hinweise darauf, dass der Promotorpolymorphismus -159C→T in der Promotorregion des CD14-Gens einen Einfluss auf die Suszeptibilität von Menschen auf bakterielle Infektionen hat. So zeigen homozygote Träger des T-Allels (TT) eine erhöhte Suszeptibilität für chronische Chlamydieninfektionen (50). Untersuchungen an Monozyten weisen z.T. darauf hin, dass die CD14-Oberflächenexpression bei dem TT-Genotyp auf Monozyten erhöht ist (118,119). Dagegen zeigen andere Studien, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Genotypen in Bezug auf die Zytokinfreisetzung durch Monozyten und die CD14-Oberflächenexpression von Monozyten vorhanden sind (120,121,122). Neben den sehr widersprüchlichen Daten in Bezug auf Monozyten, gibt es noch keine Studien zu Granulozyten. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der Promotorpolymorphismus 159C→T einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten durch bakterielle Bestandteile, wie LPS von gramnegativen Bakterien und LTA von grampositiven Bakterien, hat.

Die in dem hier untersuchten Spenderpool vorgefundene genotypische Verteilung des CD14-Promotorpolymorphismus von 1:1:1 entspricht nicht einer zu erwartenden Mendelschen Verteilung von 1:2:1 der Genotypen CC, CT und TT. Dies ist auf den kleinen und eventuell nicht-repräsentativen Spenderpool zurückzuführen. Die ungewöhnliche genotypische Verteilung spielte hier jedoch keine Rolle, da es um einen Vergleich zwischen den CC- und den TT-Genotypen ging.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die PMN des CC-Genotyps nach Stimulation mit LPS im Mittel eine stärker aktivierte Morphologie als die PMN des TT-Genotyps aufwiesen. Dagegen war bezüglich des *Sheddings* von CD62L bei beiden Genotypen nach 4 h Stimulation mit LPS kein Unterschied zu erkennen. Sowohl die PMN als auch die Monozyten des CC-Genotyps gaben nach Stimulation mit LTA und LPS im Durchschnitt größere Mengen von IL-8 ab als die des

TT-Genotyps. Die Oberflächenexpression von CD14 war auf unstimulierten frischen Monozyten des TT-Genotyps im Mittel leicht erhöht. Es zeigte sich zwischen dem CC- und dem TT-Genotyp weder bei den PMN noch bei den Monozyten ein Unterschied in der CD14-Oberflächenexpression. Die Abgabe von sCD14 war bei den PMN des CC-Genotyps im Vergleich zum TT-Genotyp im Mittel leicht erhöht. Die sCD14-Konzentration war im Serum des TT-Genotyps tendenziell erhöht. Die PMN des CC-Genotyps zeigten eine signifikant verstärkte Phagozytose von *S. aureus*, im Gegensatz zu denen des TT-Genotyps. Bezüglich der Vorstimulation zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies war kein Unterschied zwischen den PMN des CC- und denen des TT-Genotyps vorhanden.

Die unterschiedliche Aktivierbarkeit der PMN verschiedener Spender durch LTA und insbesondere durch LPS gemessen an der Morphologie, die Phagozytoseaktivität und die der PMN und Monozyten gemessen an der IL-8-Abgabe weist Korrelationen mit dem hier untersuchten CD14-Promotorpolymorphismus auf. Da der hier untersuchte Polymorphismus in einer Promotorregion liegt, kann er nicht zu einer Veränderung des Moleküls führen. Jedoch könnte er eine Veränderung der CD14-Genexpression bedingen. Die andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der hier untersuchte Polymorphismus an einen anderen Polymorphismus, der z.B. in dem CD14-Gen liegen könnte, gekoppelt ist. Um zu prüfen, inwieweit die CD14-Oberflächenexpression für die vorgefundenen Unterschiede verantwortlich sein könnte, wurde in dieser Studie die CD14-Oberflächenexpression auf den PMN und den Monozyten untersucht. Wie bereits erwähnt, zeigen die bisherigen Studien sehr widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die CD14-Oberflächenexpression auf Monozyten. Es gibt jedoch nur eine Studie zur CD14-Genexpression. Diese zeigt, dass der TT-Genotyp im Vergleich zum CC-Genotyp eine verstärkte Expression des CD14-Gens in Monozyten aufweist (48). Daher wäre eine verstärkte CD14-Oberflächenexpression zumindest auf den Monozyten des TT-Genotyps zu erwarten gewesen. Unstimulierte frische Monozyten des TT-Genotyps zeigten tatsächlich im Durchschnitt eine etwas höhere Oberflächenexpression von CD14 als Monozyten des CC-Genotyps. Allerdings zeigten die Monozyten des CC- und des TT-Genotyps keine Hochregulation von CD14 auf ihrer Oberfläche nach 18 Stunden Inkubation mit LTA und LPS im Vergleich zur Mediumkontrolle. Eine solche wäre jedoch zu erwarten gewesen, denn zumindest LPS soll die Hochregulation von CD14

auf der Oberfläche von Monozyten induzieren (123,124). Die fehlende Hochregulation von CD14 auf den Monozyten nach Stimulation mit LPS, lässt sich damit erklären, dass in der hier vorliegenden Arbeit die CD14-Oberflächenexpression nach 18 Stunden und nicht innerhalb der ersten 3 Stunden gemessen wurde. Nach Marchant *et al.* (124) erfolgt nach der ersten durch LPS induzierten Hochregulation von CD14, nach ca. 3 Stunden, ein langsamer Abfall der CD14-Oberflächenexpression (124). In der hier vorliegenden Studie wurde dennoch ein später Zeitpunkt gewählt, da Monozyten langlebige Zellen sind und sich eine stärkere Reaktion auf bakterielle Bestandteile auch durch eine verlängerte starke Oberflächenexpression von CD14 erklären ließe. Obwohl die PMN ebenfalls eine verstärkte Reaktion auf bakterielle Bestandteile zeigten, war auf den unstimulierten frischen PMN kein Unterschied in der CD14-Oberflächenexpression zu finden. Die PMN zeigten ebenfalls keine Hochregulation ihrer CD14-Oberflächenexpression nach Stimulation mit LTA oder LPS, weder nach 4 Stunden noch nach 18 Stunden. Auch war kein Unterschied nach 4 Stunden zwischen dem CC- und dem TT-Genotyp vorhanden. Allerdings konnte nach 18 Stunden bei den PMN im Medium eine minimal erhöhte CD14-Oberflächenexpression bei dem CC-Genotyp nachgewiesen werden. Diese leichte Erhöhung ist von Bedeutung, da sie in einem niedrigen Expressionsbereich liegt, welcher den Anteil der PMN, welcher überhaupt noch CD14 auf ihrer Oberfläche exprimiert, definiert. Die im Mittel leicht verstärkte CD14-Oberflächenexpression auf Monozyten unterstützt die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, welche auch eine verstärkte CD14-Oberflächenexpression sowie eine Genexpression beim TT-Genotyp beschrieben haben. Allerdings ist fraglich, warum diese Unterschiede nach Inkubation mit bakteriellen Bestandteilen verschwinden. Zudem zeigte sich kein solcher Unterschied zwischen den zwei Genotypen bei den PMN. Eine erhöhte Reaktivität des CC-Genotyps im Vergleich zum TT-Genotyp, trotz gleich starker CD14-Oberflächenexpression, ließe sich durch die Abgabe des vermehrt gebildeten CD14 als lösliches CD14 (sCD14) erklären. Das sCD14-Niveau ist bei dem TT-Genotyp im Serum höher als bei dem CC-Genotyp (46). Es wird angenommen, dass die sCD14-Konzentration im Plasma entweder durch Monozyten oder durch Hepatozyten bestimmt wird (125,126,127,128). Monozyten können das sCD14 durch *Shedding* von mCD14 oder aus einem intrazellulären Pool freisetzen (125, 126). sCD14 ist in der Lage, Zellen konzentrationsabhängig zu

sensibilisieren oder zu desensibilisieren. Ob Monozyten durch sCD14 für eine Reaktion auf LPS sensibilisiert oder desensibilisiert wurden, hing dabei von der Konzentration von sCD14 ab. Eine Erhöhung der sCD14-Konzentration, welche nicht deutlich die Konzentration der stimulierenden bakteriellen Bestandteile überschritt, wirkte dabei aktivierend auf die Monozyten (129). Ebenso kann sCD14 Zellen, die kein CD14 besitzen, wie Endothelzellen, ermöglichen auf LPS zu reagieren (45,130,131). Da das *Shedding* des CD14 von der Zelloberfläche eine Möglichkeit der Regulation der Empfindlichkeit der Zellen ist (31), könnte eine leicht erhöhte sCD14-Menge bei dem CC-Genotyp zu einer Sensibilisierung der PMN führen. Im Laufe einer Infektion ist die sCD14-Menge im Gewebe relevant. Diese würde in der ersten Phase der Infektion sehr wahrscheinlich durch PMN bestimmt werden. Nach unseren Ergebnissen wäre die sCD14-Menge bei dem CC-Genotyp *in vitro* erhöht. Eine Sensibilisierung der PMN in der ersten Phase einer Infektion würde die Bekämpfung einer Infektion unterstützen. Somit würden diese Ergebnisse die Befunde anderer Forschungsgruppen unterstützen, welche eine erhöhte Suszeptibilität für Infektionen beim TT-Genotyp vorgefunden haben. Dagegen zeigten die hier untersuchten Monozyten eine erhöhte CD14-Oberflächenexpression bei dem TT-Genotyp, wie sie teilweise auch in der Literatur beschrieben ist (118,119). Unsere Aussagen können jedoch nur zu den im Blut zirkulierenden Monozyten gemacht werden, nicht zu denen die in das Gewebe einwandern, da sie sich verändern und zu Makrophagen werden. Die hier vorgefundene leicht erhöhte CD14-Oberflächenexpression des TT-Genotyps könnte bestimmten intrazellulären Parasiten, wie den Chlamydien, den Eintritt in die Monozyten des TT-Genotyps erleichtern (50). Zudem könnte die erhöhte sCD14-Konzentration im Serum des TT-Genotyps (46) durch die erhöhte CD14-Oberflächenexpression auf den Monozyten zustande kommen. Allerdings bleibt unklar, warum in diesem Fall die Monozyten des CC-Genotyps nach Stimulation eine höhere IL-8-Freisetzung zeigten als die des TT-Genotyps.

Die vorliegende Arbeit weist auf eine verstärkte Aktivierbarkeit der PMN des CC- im Vergleich zum TT-Genotyp hin. Aufgrund der großen Variationsbreite bei der Aktivierbarkeit der PMN innerhalb des CC- und des TT-Genotyps sowie der geringen Größe des Spenderpools können jedoch keine endgültigen Aussagen gemacht werden. Die zu diesem Thema bereits vorhandenen Daten spiegeln diese Problematik wider und

zeigen insgesamt recht große Widersprüche. Die bekannten Daten wurden von von Aulock *et al.* statistisch neu ausgewertet und man kam zu dem Schluss, dass es keine Verbindung zwischen dem TT-Genotyp und einer relevanten Erhöhung der CD14-Oberflächenexpression auf Monozyten gibt (120). Auch geben klinisch relevante Studien einerseits Hinweise darauf, dass der TT-Genotyp mit chronischen Infektionserkrankungen (50) und der Suszeptibilität für einen septischen Schock korreliert (49). Andererseits fanden andere Forschungsgruppen keine Korrelationen zwischen Infektionen mit gram-negativen Bakterien (132), Sepsis (133,134) oder septischen Schock (135).

Die hier durchgeführte Studie weist darauf hin, dass der Polymorphismus einen Einfluss auf die PMN und die Monozyten hat. Sie zeigt auch, dass die Morphologie, die IL-8-Freisetzung und die Phagozytoseaktivität sich als *Read-out*-Systeme eignen, um den Einfluss des CD14-Promotorpolymorphismus auf PMN und Monozyten zu untersuchen. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten müssen allerdings mehr Probanden untersucht werden. Somit gibt diese Arbeit Anlass noch einmal ein umstrittenes Thema aufzugreifen.

4.4 Generierung transgener Leishmanien

In diesem Teil der Arbeit wurden fluoreszierende Leishmanien generiert, um diese intrazellulären Parasiten besser in lebenden PMN studieren zu können. Dazu wurden Leishmanien der Gattung *Leishmania major* (*Lm*) mit Genen, die für die fluoreszierenden Proteine EGFP und DsR kodierten, transfiziert. Die Eignung von GFP für die Markierung von Leishmanien ist bekannt (136). Allerdings ist die Nutzung von DsR für Leishmanien noch nicht so gängig.

Für eine Transfektion sind Plasmide ungeeignet, da die Nutzung von Plasmiden zu einer heterogenen Population transfizierter Parasiten führt (136,137). Dies ist auf die starke Variation der Anzahl von Plasmidkopien pro Zelle zurückzuführen (65). Zudem würde die Parasitenpopulation in dem Wirt aufgrund fehlenden Selektionsdruckes den Plasmid wieder verlieren (Aebischer, mündliche Mitteilung). Somit waren Plasmide nicht für die Transfektion der Leishmanien geeignet. Daher wurde die von Mißlitz *et al.* etablierte Methode der gezielten Integration einer DNA-Cassette in einen RNA-Lokus von

Leishmanien (*L. mexicana* und *L. major*) (65) genutzt. Die Transfektion der Leishmanien war erfolgreich. Es konnten sowohl rot- als auch grün-fluoreszierende Leishmanien selektiert werden. Die hier generierten Leishmanien zeigten eine deutliche Fluoreszenz. Die Expression der fluoreszierenden Proteine war bei den Leishmanien auch noch nach über einem Jahr in Kultur stabil. Die Wachstumsrate der transfizierten Leishmanien war im Vergleich zum Wildtyp nicht verringert. Die transfizierten Leishmanien konnten zudem in den PMN über Zytospins und im FACS nachgewiesen werden. Es müssen nun noch weitere Vergleiche der transgenen Leishmanien mit dem Wildtyp erfolgen. Besonders wichtig sind dabei Untersuchungen in Bezug auf ihre Infektiosität für PMN *in vitro* sowie in Mäusen. Auch sollte ihre Wirkung auf die Wirtszellen, z.B. über die Freisetzung von Zytokinen, genauer untersucht und mit dem Wildtyp verglichen werden. Obwohl auch von Mißlitz *et al.* eine stabile Expression des transfizierten Gens, welches für EGFP (*enhanced GFP*) kodierte, über Monate beschrieben wurde und die transfizierten Parasiten ebenfalls für Mäuse infektiös waren, gaben einige Versuche Hinweise auf eine Verzögerung der Entwicklung von Läsionen bei den transgenen Leishmanien im Vergleich zu den Wildtypen (65). Sofern die transfizierten Leishmanien die gleiche Wirkung haben wie die Wildtypen, können sie in Zukunft eingesetzt werden, um lebende Parasiten in lebenden Zellen zu untersuchen, denn die mit Leishmanien infizierten PMN können im FACS besser von den nicht-infizierten PMN unterschieden werden. Auch können sie unter dem Fluoreszenzmikroskop in lebenden Granulozyten anstelle von fixierten beobachtet werden. Somit erlauben die transgenen Leishmanien eine bessere Untersuchung des intrazellulären Parasiten *Lm* in seinen Wirtszellen.

4.5 Neutrophile Granulozyten mit Charakteristika antigenpräsentierender Zellen

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind bekannt als effektive Phagozyten. Als solche weisen sie verschiedene Aufnahmemechanismen für Pathogene und deren Bestandteile auf. Zu den Aufnahmemechanismen gehören z.B. die FcRezeptor (FcR)-vermittelte Aufnahme (138,139) und diejenige über den Komplementrezeptor 3 (140). Die Aufnahme der Bestandteile von Pathogenen als eine Voraussetzung zur Antigenpräsentation ist somit durch die PMN erfüllt. Es wurde gezeigt, dass PMN

exogene Antigene prozessieren können (141) und dass sie Peptidantigene über MHCII präsentieren können und T-Zellen zur Proliferation stimulieren können (62). Dennoch ist die Bedeutung der PMN, als antigenpräsentierende Zellen noch umstritten. Die zur Antigenpräsentation fähigen PMN waren 2-4 Tage alt. Da PMN kurzlebige Zellen sind, liegt die Vermutung nahe, dass ein Großteil der PMN, welcher Moleküle zur Antigenpräsentation auf seiner Oberfläche exprimiert bereits apoptotisch ist. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit die Oberflächenexpression von Molekülen die der Antigenpräsentation dienen auf PMN untersucht. Sollten PMN tatsächlich eine Bedeutung für die Antigenpräsentation haben, wäre anzunehmen, dass sie neben der Präsentation von Peptidantigenen auch Lipidantigene präsentieren können. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob neutrophile Granulozyten auch zur Präsentation von Lipidantigenen in der Lage sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die lipid- und glykolipidpräsentierenden Oberflächenmoleküle CD1a und CD1b auf den PMN exprimiert werden. Die CD1a-Oberflächenexpression war nur auf apoptotischen Zellen zu finden. Die CD1b-Oberflächenexpression war, ebenso wie die Oberflächenexpression des MHC-II-Moleküls HLA-DR, zu einem geringeren Teil auch auf nicht-apoptotischen Zellen vorhanden.

Die Stimulation der PMN mit GM-CSF und IFN- γ erhöhte die Oberflächenexpression von CD1a und CD1b nicht, sondern erniedrigte sie sogar. Dieser Effekt korreliert mit der erniedrigten Apoptoserate in der Population der stimulierten PMN. Es stellt sich die Frage, warum gerade die apoptotischen Zellen CD1-Moleküle exprimieren. Es erscheint möglich, dass im Laufe des Membran-Flip-Flops verschiedene Moleküle auf die Oberfläche gelangen, ohne eine Funktion zu haben. Allerdings ist die Expression der CD1-Moleküle auch so stark gewesen, dass ein zufälliges Erscheinen auf der Oberfläche der PMN unwahrscheinlich ist. Sollte es sich als zufällig erweisen, so wäre der Nachweis von CD1-Molekülen auf PMN immer noch ein Zeichen dafür, dass CD1-Moleküle in PMN präformiert vorliegen und somit auch irgendeine Funktion besitzen sollten. Allerdings sind auch dendritische Zellen, die fixiert wurden, noch in der Lage, über die auf ihrer Oberfläche vorhandenen antigenpräsentierenden Moleküle, den T-Zellen Antigene zu präsentieren und sie zur Proliferation zu stimulieren (142). Daher ist anzunehmen, dass auch apoptotische Zellen dazu in der Lage sind. Entgegen unserer

Annahmen induzierten die PMN jedoch keine T-Zell-Proliferation. Dies könnte daran liegen, dass nicht ausreichend CD1b-positive Granulozyten in dem Test vorhanden waren. So wurde in dieser Arbeit Granulozyten und T-Zellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Dagegen wurde von Iking-Konert *et al.* (90) die 4-10-fache Menge von Granulozyten im Verhältnis zu T-Zellen eingesetzt, um eine ausreichende Stimulation durch die Peptidpräsentation über MHC-II zu erreichen. Dabei spielt die Tatsache eine Rolle, dass auch nach Stimulation nur ein Teil der PMN MHC-II-Moleküle auf seiner Oberfläche exprimiert. Dies entspricht den in dieser Arbeit gewonnenen FACS-Daten. Es waren 20 Prozent der im T-Zell-Proliferationstest eingesetzten transmigrierten PMN zu Beginn des Tests für CD1b positiv, die nicht-transmigrierten PMN waren zu Beginn des Tests nicht positiv für CD1b. Es ist jedoch zu vermuten, dass auch die nicht-transmigrierten PMN innerhalb der drei Tage im T-Zell-Test CD1b auf ihrer Oberfläche hochregulierten, da unsere zuvor gewonnenen FACS-Daten zeigten, dass CD1b im Laufe der ersten 20 Stunden auf stimulierten und unstimulierten PMN hochreguliert wird. Dennoch induzierten weder die nicht-transmigrierten PMN noch die transmigrierten PMN ein T-Zell-Proliferation.

Nur die PMN, welche ein Pathogen oder dessen Bestandteile aufgenommen haben können bakterielle Bestandteile präsentieren. Da PMN nach der Abtötung bestimmter phagozytierter Mikroben, welche auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies induzieren, apoptotisch werden (143), wäre verständlich, dass gerade die apoptotischen PMN antigenpräsentierende Moleküle exprimieren. Üblicherweise werden apoptotische Zellen z.B. durch Makrophagen phagozytiert und damit „entsorgt“, ohne dass eine inflammatorische Antwort erfolgt. PMN könnten die Antigene also an Makrophagen weitergeben, wenn sie von ihnen phagozytiert werden. Als effektive antigenpräsentierende Zellen könnten Makrophagen die Antigene präsentieren. Diese Art der Weitergabe von bakteriellen Bestandteilen scheint zur Bekämpfung der Mykobakterien, deren Antigene zum Teil über CD1-Moleküle präsentiert werden (56,144,145), wichtig zu sein. So ist beschrieben, dass freigesetzte apoptotische Vesikel (*apoptotic bodies*) Antigene zu den noch nicht infizierten dendritischen Zellen tragen. Dieser Mechanismus scheint sehr wichtig für die Bekämpfung von *Mycobacterium tuberculosis* durch das Immunsystem zu sein, da die infizierten DC ihre Funktion zur Antigenpräsentation verlieren. Nur die nicht infizierten DC, welche die apoptotischen

Vesikel aufnehmen, können die Antigene den T-Zellen durch Kreuz-Präsentation über MHCI und CD1b darbieten (146). Dies macht deutlich, welche Funktion die Apoptose von Phagozyten nach Aufnahme von mikrobiellen Bestandteilen haben kann. Durch eine Expression der CD1-Moleküle auf apoptotischen PMN würden beide Effekte gleichzeitig möglich: Die PMN könnten als erste Zellen vor Ort und in großer Anzahl den T-Zellen Antigene präsentieren und zugleich als apoptotische Träger der Antigene von anderen Phagozyten aufgenommen werden und so die Antigenpräsentation durch professionelle APCs verstärken. Eine T-Zell-Antwort könnte schon innerhalb der ersten Stunden eingeleitet werden.

Insgesamt muss, aufgrund der fehlenden T-Zell-Stimulation zur Proliferation nach Antigenpräsentation, in Betracht gezogen werden, dass die Oberflächenexpression von CD1b entweder ein Artefakt ist, oder es noch eine andere Funktion hat. Nach den Ergebnissen dieser Studie besitzen die PMN zwar die CD1-Moleküle CD1a und CD1b, induzierten aber in dem hier durchgeführten T-Zell-Test keine T-Zell-Proliferation.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit verschiedene Aspekte der Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten. PMN werden durch die Transmigration bereits auf ihre antimikrobiellen Funktionen im Gewebe vorbereitet. Die neutrophilen Granulozyten werden durch die bakterielle Lipopeptide, MALP-2 und Pam₃CysSK₄ zu einer erhöhten antimikrobiellen Aktivität stimuliert. Zudem beeinflussen SNPs, wie der CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T die Aktivierbarkeit der PMN. Die PMN weisen mit der Oberflächenexpression von CD1a und CD1b Charakteristika auf, welche auf eine Rolle in der Verknüpfung zwischen angeborener und erworbener Immunantwort hinweisen.

5 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind eine der Hauptkomponenten der angeborenen Immunantwort. In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten untersucht. Es wurde zunächst ein *in vitro* Transmigrationssystem etabliert, welches es ermöglicht die während einer Infektion wichtigen „Gewebsgranulozyten“ zu generieren. Anschließend wurde die Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten durch die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ untersucht. Zudem wurde geprüft, ob der CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T eine Relevanz für die Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten durch Lipoteichonsäure (LTA) von grampositiven sowie durch Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien besitzt. Es gelang außerdem Leishmanien mit den Genen für die fluoreszierenden Proteine GFP und DsR stabil zu transfizieren. Dadurch können Leishmanien in lebenden neutrophilen Granulozyten besser untersucht werden. Schließlich wurden die neutrophilen Granulozyten auch auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation untersucht.

Nach der Transmigration zeigten die neutrophilen Granulozyten, neben der Degranulation eine Vorstimulation für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zur Bekämpfung von Pathogenen. Zudem induzierte die Transmigration mit nachfolgender Stimulation der PMN durch LPS die Oberflächenexpression von CD69.

Die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ induzieren bei den neutrophilen Granulozyten ähnliche Aktivierungsformen. Allerdings zeigte sich, dass MALP-2 in einer 1000-fach niedrigeren Konzentration eine IL-8-Freisetzung bewirkte, als Pam₃CysSK₄. Dabei war die Induktion der IL-8-Freisetzung durch MALP-2 bei den PMN CD14-abhängig.

Für CD14 ist ein Polymorphismus in der Promotorregion bekannt. Die neutrophilen Granulozyten und Monozyten des homozygoten 159-C Genotyps (CC) zeigten bei der Untersuchung der IL-8-Abgabe und der Phagozytoseaktivität im Trend eine stärkere Reaktion auf die bakteriellen Bestandteile LTA und LPS als die des homozygoten 159-

T-Genotyps (TT). Zudem gab es Hinweise auf eine leicht erhöhte CD14-Oberflächenexpression auf den Monozyten des TT-Genotyps.

Neben der Fähigkeit peptidpräsentierende MHC-II-Molekül wie HLA-DR auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, waren die neutrophilen Granulozyten auch in der Lage ohne Stimulation die lipidpräsentierenden CD1-Moleküle CD1a und CD1b auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Allerdings zeigte ein T-Zell-Proliferationstest, dass zumindest CD1b vorerst keine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass es sich bei den neutrophilen Granulozyten um komplexe Zellen mit vielfältigen Funktionen handelt. Dabei wird ihre Reaktivität durch die Transmigration verändert. PMN reagieren auf die Lipopeptide MALP-2 und Pam₃CysSK₄ unterschiedlich stark, jedoch mit ähnlichen Aktivierungserscheinungen. Die Fähigkeit der PMN auf einzelne Bestandteile von Pathogenen zu reagieren, wird dabei auch von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), wie z.B. dem CD14-Promotorpolymorphismus 159C→T, beeinflusst. Die Oberflächenexpression der CD1-Moleküle CD1a und CD1b auf den neutrophilen Granulozyten weist zudem darauf hin, dass die neutrophilen Granulozyten nicht nur für die angeborene Immunantwort wichtig sind, sondern auch Verbindungen zu der erworbenen Immunantwort aufweisen.

6 Summary

Neutrophil granulocytes are a main component of the innate immune system. In this study different aspects of the activation of PMN were investigated. An *in vitro* transmigration system was established to generate “tissue granulocytes”. Additionally the activation of PMN by the lipopeptides MALP-2 and Pam₃CysSK₄ was examined. The influence of the CD14-promotorpolymorphism 159C→T on the reactivity of PMN towards lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharide (LPS) was investigated. Leishmania were stably transfected with genes coding for the fluorescent proteins GFP and DsR. They will be useful as tools for tracking Leishmania in living cells. Beside, the ability of PMN to present antigens was examined.

Transmigration not only led to degranulation but also primed PMN for the production of reactive oxygen species. Transmigration through activated endothel and subsequent stimulation with LPS even induced the surface expression of CD69.

MALP-2 and Pam₃CysSK₄ induced similar forms of activation in PMN, though MALP-2 was efficient in a 1000 times lower concentration. The induction of the IL-8-release by MALP-2 was CD14 dependent.

PMN and Monocytes that were homozygous for 159-C concerning the CD14-promotorpolymorphism showed a trend towards a higher IL-8-release after stimulation with LTA and LPS compared to those that were homozygous for 159-T. Monocytes that were homozygous for 159-T had a tendency towards a higher CD14 surface expression than those that were homozygous for 159-C.

PMN not only expressed the peptide presenting molecule HLA-DR but also the glycolipid presenting molecules CD1a and CD1b on their surface, even without being stimulated. However, we could not show any functional relevance for CD1b.

Altogether this study shows that PMN are versatile cells. They respond strongly to the lipopeptide MALP-2 but less strongly to Pam₃CysSK₄. Their ability to react on bacterial constituents is differentially regulated and single nucleotide polymorphism (SNP) like the CD14-promotorpolymorphism 159C→T influence them. The surface expression of CD1a and CD1b hints on a not yet defined role of the PMN in the adaptive immunity.

7 Referenzen

1. Gallin, J. I. 1994. Inflammation. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Ravens Press, New York, p. 1015-1032.
2. Moulding, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart, and S. W. Edwards. 1998. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*. 92:2495-2502.
3. Savill, J., V. Fadok, P. Henson, and C. Haslett. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol.Today*. 14:131-136.
4. Homburg, C. H., M. de Haas, A. E. dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger, and D. Roos. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 85:532-540.
5. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods*. 184:39-51.
6. Borregaard, N. and J. B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 89:3503-3521.
7. Guthrie, L. A., L. C. McPhail, P. M. Henson, and R. B. Johnston, Jr. 1984. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J.Exp.Med*. 160:1656-1671.
8. Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J.Exp.Med*. 178:63-72.
9. Chiba, K., W. Zhao, J. Chen, J. Wang, H. Y. Cui, H. Kawakami, T. Miseki, H. Satoshi, J. Tanaka, M. Asaka, and M. Kobayashi. 2004. Neutrophils secrete MIP-1 beta after adhesion to laminin contained in basement membrane of blood vessels. *Br.J.Haematol*. 127:592-597.
10. Kudo, C., T. Yamashita, M. Terashita, and F. Sendo. 1993. Modulation of in vivo immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. II. Inhibition by RP-3 treatment of mononuclear leukocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in rats. *J.Immunol*. 150:3739-3746.

11. Rand, M. L., J. S. Warren, M. K. Mansour, W. Newman, and D. J. Ringler. 1996. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am.J.Pathol.* 148:855-864.
12. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76:301-314.
13. Bevilacqua, M. P. and R. M. Nelson. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb.Haemost.* 70:152-154.
14. Crockett-Torabi, E. and J. C. Fantone. 1995. The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. *Immunol.Res.* 14:237-251.
15. Wagner, J. G. and R. A. Roth. 2000. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol.Rev.* 52:349-374.
16. Altieri, D. C. and T. S. Edgington. 1988. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). *J.Immunol.* 141:2656-2660.
17. Burns, A. R., D. C. Walker, E. S. Brown, L. T. Thurmon, R. A. Bowden, C. R. Keese, S. I. Simon, M. L. Entman, and C. W. Smith. 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J.Immunol.* 159:2893-2903.
18. Engelhardt, B. and H. Wolburg. 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur.J.Immunol.* 34:2955-2963.
19. Wright, D. G. and J. I. Gallin. 1979. Secretory responses of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation in vivo. *J.Immunol.* 123:285-294.
20. Furie, M. B. and G. J. Randolph. 1995. Chemokines and tissue injury. *Am.J.Pathol.* 146:1287-1301.
21. Xing, Z., M. Jordana, H. Kirpalani, K. E. Driscoll, T. J. Schall, and J. Gauldie. 1994. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10:148-153.
22. Premack, B. A. and T. J. Schall. 1996. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat.Med.* 2:1174-1178.
23. Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood.* 90:909-928.

24. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 1:135-145.
25. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401:811-815.
26. Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, and S. Akira. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J.Immunol.* 164:3476-3479.
27. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J.Immunol.* 32:1958-1968.
28. Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur.J.Immunol.* 33:2987-2997.
29. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J.Immunol.* 171:3154-3162.
30. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 102:2660-2669.
31. Hailman, E., H. S. Lichenstein, M. M. Wurfel, D. S. Miller, D. A. Johnson, M. Kelley, L. A. Busse, M. M. Zukowski, and S. D. Wright. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J.Exp.Med.* 179:269-277.
32. Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol.Chem.* 278:15587-15594.
33. O'Neill, L. A. 2004. Immunology. After the toll rush. *Science.* 303:1481-1482.
34. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlratt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13:933-940.
35. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169:10-14.

36. Omuetti, K. O., J. M. Beyer, C. M. Johnson, E. A. Lyle, and R. I. Tapping. 2005. Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J.Biol.Chem.* 280:36616-36625.
37. Takeuchi, O., T. Kawai, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Takeda, and S. Akira. 1999. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene.* 231:59-65.
38. Haziot, A., S. Chen, E. Ferrero, M. G. Low, R. Silber, and S. M. Goyert. 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J.Immunol.* 141:547-552.
39. Bazil, V., V. Horejssi, M. Baudys, H. Kristofova, J. L. Strominger, W. Kostka, and I. Hilgert. 1986. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur.J.Immunol.* 16:1583-1589.
40. Palsson-McDermott, E. M. and L. A. O'Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 113:153-162.
41. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249:1431-1433.
42. Kusunoki, T., E. Hailman, T. S. Juan, H. S. Lichenstein, and S. D. Wright. 1995. Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses. *J.Exp.Med.* 182:1673-1682.
43. Weidemann, B., H. Brade, E. T. Rietschel, R. Dziarski, V. Bazil, S. Kusumoto, H. D. Flad, and A. J. Ulmer. 1994. Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures. *Infect.Immun.* 62:4709-4715.
44. Zhang, Y., M. Doerfler, T. C. Lee, B. Guillemin, and W. N. Rom. 1993. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J.Clin.Invest.* 91:2076-2083.
45. Frey, E. A., D. S. Miller, T. G. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B. B. Finlay, and S. D. Wright. 1992. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* 176:1665-1671.
46. Baldini, M., I. C. Lohman, M. Halonen, R. P. Erickson, P. G. Holt, and F. D. Martinez. 1999. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:976-983.
47. Unkelbach, K., A. Gardemann, M. Kostrzewa, M. Philipp, H. Tillmanns, and W. Haberbosch. 1999. A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:932-938.

48. LeVan, T. D., J. W. Bloom, T. J. Bailey, C. L. Karp, M. Halonen, F. D. Martinez, and D. Vercelli. 2001. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J.Immunol.* 167:5838-5844.
49. Gibot, S., A. Cariou, L. Drouet, M. Rossignol, and L. Ripoll. 2002. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med.* 30:969-973.
50. Rupp, J., W. Goepel, E. Kramme, J. Jahn, W. Solbach, and M. Maass. 2004. CD14 promoter polymorphism -159C>T is associated with susceptibility to chronic Chlamydia pneumoniae infection in peripheral blood monocytes. *Genes Immun.* 5:435-438.
51. Hermann, C., I. Spreitzer, N. W. Schroder, S. Morath, M. D. Lehner, W. Fischer, C. Schutt, R. R. Schumann, and T. Hartung. 2002. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur.J.Immunol.* 32:541-551.
52. Lotz, S., E. Aga, I. Wilde, G. van Zandbergen, T. Hartung, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J.Leukoc.Biol.* 75:467-477.
53. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11:210-214.
54. van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J.Immunol.* 173:6521-6525.
55. Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong, and M. B. Brenner. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature.* 372:691-694.
56. Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan, and . 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 269:227-230.
57. Winau, F., V. Schwierzeck, R. Hurwitz, N. Rimmel, P. A. Sieling, R. L. Modlin, S. A. Porcelli, V. Brinkmann, M. Sugita, K. Sandhoff, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2004. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat.Immunol.* 5:169-174.
58. De Libero, G. and L. Mori. 2005. Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 5:485-496.

59. Sieling, P. A., J. B. Torrelles, S. Stenger, W. Chung, A. E. Burdick, T. H. Rea, P. J. Brennan, J. T. Belisle, S. A. Porcelli, and R. L. Modlin. 2005. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J.Immunol.* 174:2637-2644.
60. Gosselin, E. J., K. Wardwell, W. F. Rigby, and P. M. Guyre. 1993. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J.Immunol.* 151:1482-1490.
61. Hansch, G. M., M. Radsak, C. Wagner, B. Reis, A. Koch, A. Breitbart, and K. Andrassy. 1999. Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* 55:1811-1818.
62. Radsak, M., C. Iking-Konert, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2000. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology.* 101:521-530.
63. Ludwig, A., F. Petersen, S. Zahn, O. Gotze, J. M. Schroder, H. D. Flad, and E. Brandt. 1997. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood.* 90:4588-4597.
64. Smith, J. A. and M. J. Weidemann. 1993. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J.Immunol.Methods.* 162:261-268.
65. Misslitz, A., J. C. Mottram, P. Overath, and T. Aebischer. 2000. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.* 107:251-261.
66. van Buul, J. D. and P. L. Hordijk. 2004. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:824-833.
67. Nourshargh, S. and F. M. Marelli-Berg. 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 26:157-165.
68. Neufert, C., R. K. Pai, E. H. Noss, M. Berger, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J.Immunol.* 167:1542-1549.
69. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard. 1993. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J.Immunol.* 150:1535-1543.
70. van Eeden, S. F., M. E. Klut, B. A. Walker, and J. C. Hogg. 1999. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J.Immunol.Methods.* 232:23-43.

71. Gavioli, R., A. Risso, D. Smilovich, I. Baldissarro, M. C. Capra, A. Bargellesi, and M. E. Cosulich. 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol.* 142:186-196.
72. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26:136-140.
73. Swain, S. D., T. T. Rohn, and M. T. Quinn. 2002. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid.Redox.Signal.* 4:69-83.
74. Payne, C. M., L. Glasser, M. E. Tischler, D. Wyckoff, D. Cromey, R. Fiederlein, and O. Bohnert. 1994. Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence. *Microsc.Res.Tech.* 28:327-344.
75. Squier, M. K., A. J. Sehnert, and J. J. Cohen. 1995. Apoptosis in leukocytes. *J.Leukoc.Biol.* 57:2-10.
76. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:13766-13771.
77. Cassatella, M. A. 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv.Immunol.* 73:369-509.:369-509.
78. Albanyan, E. A., J. G. Vallejo, C. W. Smith, and M. S. Edwards. 2000. Nonopsonic binding of type III Group B Streptococci to human neutrophils induces interleukin-8 release mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect.Immun.* 68:2053-2060.
79. Klut, M. E., B. A. Whalen, and J. C. Hogg. 1997. Activation-associated changes in blood and bone marrow neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 62:186-194.
80. Niwa, M., Y. Kanamori, K. Kohno, H. Matsuno, O. Kozawa, M. Kanamura, and T. Uematsu. 2000. Usefulness of grading of neutrophil aggregate size by laser-light scattering technique for characterizing stimulatory and inhibitory effects of agents on aggregation. *Life Sci.* 67:1525-1534.
81. Kishimoto, T. K., M. A. Jutila, E. L. Berg, and E. C. Butcher. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science.* 245:1238-1241.
82. Bazzoni, F., M. A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald, and M. Baggiolini. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J.Exp.Med.* 173:771-774.
83. Kaufmann, A., P. F. Muhlradt, D. Gemsa, and H. Sprenger. 1999. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2. *Infect.Immun.* 67:6303-6308.

84. Francois, S., J. El Benna, P. M. Dang, E. Pedruzzi, M. A. Gougerot-Pocidallo, and C. Elbim. 2005. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J.Immunol.* 174:3633-3642.
85. Power, C. P., J. H. Wang, B. Manning, M. R. Kell, N. F. Aherne, Q. D. Wu, and H. P. Redmond. 2004. Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity: regulatory roles for CD14 and TLR-2. *J.Immunol.* 173:5229-5237.
86. Antal-Szalmas, P., J. A. Strijp, A. J. Weersink, J. Verhoef, and K. P. Van Kessel. 1997. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 61:721-728.
87. Landmann, R., M. Wesp, and P. Dukor. 1988. Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility (MHC) and CD14 antigen changes by lipophilic muramyltripeptide MTP-PE in human monocytes. *Cell Immunol.* 117:45-55.
88. Liu, S., L. S. Khemlani, R. A. Shapiro, M. L. Johnson, K. Liu, D. A. Geller, S. C. Watkins, S. M. Goyert, and T. R. Billiar. 1998. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infect.Immun.* 66:5089-5098.
89. Laufs, H., K. Muller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach, and T. Laskay. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect.Immun.* 70:826-835.
90. Iking-Konert, C., C. Cseko, C. Wagner, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2001. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J.Mol.Med.* 79:464-474.
91. Sopata, I. and A. M. Dancewicz. 1974. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim.Biophys.Acta.* 370:510-523.
92. Masure, S., P. Proost, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 1991. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur.J.Biochem.* 198:391-398.
93. Delclaux, C., C. Delacourt, M. P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf. 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 14:288-295.
94. Hofman, P., M. Piche, D. F. Far, G. Le Negrate, E. Selva, L. Landraud, A. Alliana-Schmid, P. Boquet, and B. Rossi. 2000. Increased *Escherichia coli*

- phagocytosis in neutrophils that have transmigrated across a cultured intestinal epithelium. *Infect.Immun.* 68:449-455.
95. Mackarel, A. J., K. J. Russell, C. S. Brady, M. X. FitzGerald, and C. M. O'Connor. 2000. Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells in vitro. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23:154-161.
 96. Santis, A. G., M. R. Campanero, J. L. Alonso, A. Tugores, M. A. Alonso, E. Yague, J. P. Pivel, and F. Sanchez-Madrid. 1992. Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur.J.Immunol.* 22:1253-1259.
 97. De Maria, R., M. G. Cifone, R. Trotta, M. R. Rippo, C. Festuccia, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J.Exp.Med.* 180:1999-2004.
 98. Atzeni, F., N. Del Papa, P. Sarzi-Puttini, F. Bertolazzi, F. Minonzio, and F. Capsoni. 2004. CD69 expression on neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 22:331-334.
 99. Atzeni, F., M. Schena, A. M. Ongari, M. Carrabba, P. Bonara, F. Minonzio, and F. Capsoni. 2002. Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha. *Cell Immunol.* 220:20-29.
 100. Sancho, D., M. Yanez-Mo, R. Tejedor, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood.* 93:886-896.
 101. Yamamoto, H., J. B. Sedgwick, R. F. Vrtis, and W. W. Busse. 2000. The effect of transendothelial migration on eosinophil function. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23:379-388.
 102. Oka, S., M. Sasada, K. Yamamoto, M. Nohgawa, A. Takahashi, K. Yamashita, H. Yamada, and T. Uchiyama. 2005. Nitric oxide derived from human umbilical vein endothelial cells inhibits transendothelial migration of neutrophils. *Int.J.Hematol.* 81:220-227.
 103. Nadeau, W. J., T. G. Pistole, and B. A. McCormick. 2002. Polymorphonuclear leukocyte migration across model intestinal epithelia enhances *Salmonella typhimurium* killing via the epithelial derived cytokine, IL-6. *Microbes.Infect.* 4:1379-1387.
 104. Le'Negrate, G., P. Rostagno, P. Auberger, B. Rossi, and P. Hofman. 2003. Downregulation of caspases and Fas ligand expression, and increased lifespan of

- neutrophils after transmigration across intestinal epithelium. *Cell Death.Differ.* 10:153-162.
105. Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Nishiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J.Immunol.* 174:1566-1573.
106. Hirschfeld, M., J. J. Weis, V. Toshchakov, C. A. Salkowski, M. J. Cody, D. C. Ward, N. Qureshi, S. M. Michalek, and S. N. Vogel. 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* 69:1477-1482.
107. Jones, B. W., T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle, and M. J. Fenton. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J.Leukoc.Biol.* 69:1036-1044.
108. Hailman, E., T. Vasselon, M. Kelley, L. A. Busse, M. C. Hu, H. S. Lichenstein, P. A. Detmers, and S. D. Wright. 1996. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J.Immunol.* 156:4384-4390.
109. Grabiec, A., G. Meng, S. Fichte, W. Bessler, H. Wagner, and C. J. Kirschning. 2004. Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides. *J.Biol.Chem.* 279:48004-48012.
110. Parker, L. C., M. K. Whyte, S. K. Dower, and I. Sabroe. 2005. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J.Leukoc.Biol.* 77:886-892.
111. Sabroe, I., L. R. Prince, E. C. Jones, M. J. Horsburgh, S. J. Foster, S. N. Vogel, S. K. Dower, and M. K. Whyte. 2003. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J.Immunol.* 170:5268-5275.
112. Meng, G., A. Grabiec, M. Vallon, B. Ebe, S. Hampel, W. Bessler, H. Wagner, and C. J. Kirschning. 2003. Cellular recognition of tri-/di-palmitoylated peptides is independent from a domain encompassing the N-terminal seven leucine-rich repeat (LRR)/LRR-like motifs of TLR2. *J.Biol.Chem.* 278:39822-39829.
113. Sabroe, I., E. C. Jones, L. R. Usher, M. K. Whyte, and S. K. Dower. 2002. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J.Immunol.* 168:4701-4710.
114. Manukyan, M., K. Triantafilou, M. Triantafilou, A. Mackie, N. Nilsen, T. Espevik, K. H. Wiesmuller, A. J. Ulmer, and H. Heine. 2005. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur.J.Immunol.* 35:911-921.

115. Reinisch, W., C. Lichtenberger, G. Steger, W. Tillinger, O. Scheiner, A. Gangl, D. Maurer, and M. Willheim. 2003. Donor dependent, interferon-gamma induced HLA-DR expression on human neutrophils in vivo. *Clin.Exp.Immunol.* 133:476-484.
116. Soler-Rodriguez, A. M., H. Zhang, H. S. Lichenstein, N. Qureshi, D. W. Niesel, S. E. Crowe, J. W. Peterson, and G. R. Klimpel. 2000. Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J.Immunol.* 164:2674-2683.
117. Gupta, D., Q. Wang, C. Vinson, and R. Dziarski. 1999. Bacterial peptidoglycan induces CD14-dependent activation of transcription factors CREB/ATF and AP-1. *J.Biol.Chem.* 274:14012-14020.
118. Eng, H. L., C. H. Wang, C. H. Chen, M. H. Chou, C. T. Cheng, and T. M. Lin. 2004. A CD14 promoter polymorphism is associated with CD14 expression and Chlamydia-stimulated TNF alpha production. *Genes Immun.* 5:426-430.
119. Hubacek, J. A., G. Rothe, J. Pit'ha, Z. Skodova, V. Stanek, R. Poledne, and G. Schmitz. 1999. C(-260)-->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation.* 99:3218-3220.
120. von Aulock, S., J. Rupp, K. Gueinzus, M. Maass, and C. Hermann. 2005. Critical investigation of the CD14 promoter polymorphism: lack of a role for in vitro cytokine response and membrane CD14 expression. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 12:1254-1256.
121. Heesen, M., B. Blomeke, B. Schluter, N. Heussen, R. Rossaint, and D. Kunz. 2001. Lack of association between the -260 C-->T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels. *Intensive Care Med.* 27:1770-1775.
122. Ito, D., M. Murata, N. Tanahashi, H. Sato, A. Sonoda, I. Saito, K. Watanabe, and Y. Fukuuchi. 2000. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 31:2661-2664.
123. Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake, and H. R. Petty. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J.Immunol.* 165:3541-3544.
124. Marchant, A., J. Duchow, J. P. Delville, and M. Goldman. 1992. Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood. *Eur.J.Immunol.* 22:1663-1665.
125. Bazil, V. and J. L. Strominger. 1991. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J.Immunol.* 147:1567-1574.

126. Labeta, M. O., J. J. Durieux, N. Fernandez, R. Herrmann, and P. Ferrara. 1993. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur.J.Immunol.* 23:2144-2151.
127. Li, S. W., J. P. Gong, C. X. Wu, Y. J. Shi, and C. A. Liu. 2002. Lipopolysaccharide induced synthesis of CD14 proteins and its gene expression in hepatocytes during endotoxemia. *World J.Gastroenterol.* 8:124-127.
128. Bas, S., B. R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, and C. Gabay. 2004. CD14 is an acute-phase protein. *J.Immunol.* 172:4470-4479.
129. Jahr, T. G., A. Sundan, H. S. Lichenstein, and T. Espevik. 1995. Influence of CD14, LBP and BPI in the monocyte response to LPS of different polysaccharide chain length. *Scand.J.Immunol.* 42:119-127.
130. Read, M. A., S. R. Cordle, R. A. Veach, C. D. Carlisle, and J. Hawiger. 1993. Cell-free pool of CD14 mediates activation of transcription factor NF-kappa B by lipopolysaccharide in human endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:9887-9891.
131. Backhed, F., L. Meijer, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors. 2002. TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell Microbiol.* 4:493-501.
132. Agnese, D. M., J. E. Calvano, S. J. Hahm, S. M. Coyle, S. A. Corbett, S. E. Calvano, and S. F. Lowry. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J.Infect.Dis.* 186:1522-1525.
133. Landmann, R., W. Zimmerli, S. Sansano, S. Link, A. Hahn, M. P. Glauser, and T. Calandra. 1995. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J.Infect.Dis.* 171:639-644.
134. Blanco, A., G. Solis, E. Arranz, G. D. Coto, A. Ramos, and J. Telleria. 1996. Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Paediatr.* 85:728-732.
135. Hubacek, J. A., F. Stuber, D. Frohlich, M. Book, S. Wetegrove, G. Rothe, and G. Schmitz. 2000. The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. *Genes Immun.* 1:405-407.
136. Ha, D. S., J. K. Schwarz, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. *Mol.Biochem.Parasitol.* 77:57-64.
137. Wolfram, M., M. Fuchs, M. Wiese, Y. D. Stierhof, and P. Overath. 1996. Antigen presentation by Leishmania mexicana-infected macrophages: activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur.J.Immunol.* 26:3153-3162.

138. Chang, K. P. 1981. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 30:334-339.
139. van Spruel, A. B., van den Herik-Oudijk IE, N. M. van Sorge, H. A. Vile, J. A. van Strijp, and J. G. van de Winkel. 1999. Effective phagocytosis and killing of *Candida albicans* via targeting FcγRI (CD64) or FcαRI (CD89) on neutrophils. *J.Infect.Dis.* 179:661-669.
140. Peyron, P., C. Bordier, E. N. N'Diaye, and I. Maridonneau-Parini. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J.Immunol.* 165:5186-5191.
141. Potter, N. S. and C. V. Harding. 2001. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J.Immunol.* 167:2538-2546.
142. Mohamadzadeh, M., H. Mohamadzadeh, M. Brammer, K. Sestak, and R. B. Luftig. 2004. Identification of proteases employed by dendritic cells in the processing of protein purified derivative (PPD). *J.Immune.Based.Ther.Vaccines.* 2:8.
143. Nilsson-Augustinsson, A., A. Wilsson, J. Larsson, O. Stendahl, L. Ohman, and H. Lundqvist-Gustafsson. 2004. *Staphylococcus aureus*, but not *Staphylococcus epidermidis*, modulates the oxidative response and induces apoptosis in human neutrophils. *APMIS.* 112:109-118.
144. Porcelli, S., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1992. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 360:593-597.
145. Moody, D. B., M. Sugita, P. J. Peters, M. B. Brenner, and S. A. Porcelli. 1996. The CD1-restricted T-cell response to mycobacteria. *Res.Immunol.* 147:550-559.
146. Schaible, U. E., F. Winau, P. A. Sieling, K. Fischer, H. L. Collins, K. Hagens, R. L. Modlin, V. Brinkmann, and S. H. Kaufmann. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat.Med.* 9:1039-1046.

8 Liste der Poster, Vorträge und Publikationen aus dieser Arbeit

Poster, Vorträge und Fortbildung

- Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology (2005), Kiel,
“Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) directly activates human neutrophil granulocytes”, Posterpräsentation
- Spring School on Immunology, Ettal,
“A CD14 promotor polymorphism and the reactivity of leukocytes to bacterial components”, Posterpräsentation
- Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (2004), Maastricht, Niederlande,
“Transendothelial migration primes neutrophil granulocytes for activation by microbial components”, Posterpräsentation
- 8. Symposium ”Infektion und Immunabwehr” (2004), Rothenfels,
“Chemokine-induced transendothelial migration is a requirement for activation of neutrophil granulocytes”, Vortrag

Publikation

- Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2.
S. Lotz, E. Aga, **I. Wilde**, G. van Zandbergen, T. Hartung, W. Solbach, T. Laskay; J Leukoc Biol. (2004)
- Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes
I. Wilde, S. Lotz, D. Engelmann, W. Solbach and T. Laskay; (eingereicht)

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. PD Dr. Tamás Laskay für die Themenvergabe, die konstruktive Kritik und seine Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach dafür, dass ich die Möglichkeit erhielt diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck anzufertigen. Auch möchte ich ihm für sein Interesse und seine hilfreiche Kritik danken.

Ich danke auch Prof. Dr. Enno Hartmann dafür, meine Arbeit als Mitglied der technisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck mitzubewerten und dafür, dass er sich die Zeit nahm meine Arbeit in ihrem Werdegang zu verfolgen und mir die Möglichkeit gab sie in seiner Arbeitsgruppe vorzustellen.

Ich danke den früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lars Esmann, Hannah Fsadni, Dr. Sonja Lotz, Dr. Eresso Aga, und insbesondere Birgit Hansen, sowie den jetzigen Mitgliedern Dr. Ger van Zandbergen, Christian Idel und insbesondere Kirsten Broszat und Sonja Dannenberg für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre technische Unterstützung. Dabei möchte ich mich ganz besonder bei Uta Bußmeier und Alexander Wenzel dafür danken, dass sie Teile meines Manuskripts kritisch durchgelesen haben. Auch danke ich den Mitgliedern der AG Gieffers Kristin Roßdeutscher und Siegrid Pätzmann für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Michael Staber für seine moralische Unterstützung. Auch möchte ich David Engelmann danken, als Bachelor in einem Teil der Arbeit mitgewirkt zu haben.

Insbesondere danke ich Dr. med. Thomas Frahm und Dr. rer. nat. Annalena Bollinger für die konstruktive Kritik des Manuskripts dieser Arbeit sowie ihre freundschaftliche Unterstützung.

Zudem danke ich Dr. med. Andrea Starke dafür, mir bei den Bakterienkulturen behilflich gewesen zu sein, sowie Dr. med. Jan Rupp für seine Unterstützung. Auch möchte ich Tanja Lüdemann, Anke Hellberg und Angela Gravenhorst besonders für ihre Unterstützung in der ersten Zeit der Arbeit danken. Viola Wobbe danke ich für die nette Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Kontakt.

Ich danke Dr. Toni Aebischer vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin, Abteilung für Molekulare Biologie, dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben fluoreszierende transgene Leishmanien mit seinen Plasmidkonstrukten im Labor seiner Arbeitsgruppe und mit seiner Expertise zu erstellen. Dabei möchte ich auch Kirstin Hoffmann und insbesondere Antje Sonntag danken mich hinsichtlich dieser Arbeit angeleitet und unterstützt zu haben.

Gleichzeitig danke ich Prof. Dr. Robert L. Modlin der David Geffen School of Medicine at UCLA und Dr. Pete A. Sieling dafür, mir die CD1b-spezifischen T-Zellen und die DCs für den T-Zell-Assay zur Verfügung gestellt zu haben. Auch danke ich Dr. Sieling für seine hilfreichen Antworten auf meine vielen Fragen.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Thomas Hartung und Dr. Siegfried Morath der Abteilung für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz, für das zur Verfügung stellen der LTA.

Zudem danke ich Dr. Bernhard Gibbs dafür, mich in den Gebrauch des T-Zell-*Harvester* einzuweisen und diesen Nutzen zu dürfen.

Hiermit möchte ich mich auch ganz herzlich bei PD Dr. Norbert Reiling für sein konstruktive Kritik und seine Vorschläge bezüglich der Lipopeptiduntersuchungen danken.

Auch möchte ich meinen Dank ausdrücken als Assoziierte an dem Graduiertenkolleg zur Weiterbildung teilnehmen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich all meinen Freunden danken, die mich immer wieder unterstützt und aufgebaut haben. Dabei danke ich insbesondere Martin Sterwerding, Christian Niemeyer, Felicitas Scharnovske und Sonja Doring.

Meinen Eltern danke ich sehr dafür, mich auch in der Zeit meines Studiums und der anschließenden Promotion immer unterstützt zu haben. Auch meiner Schwester für ihre Unterstützung und ihre Korrektur des Manuskripts. Ebenso danke ich auch meiner Großmutter Susanna Albrecht immer für mich da gewesen zu sein.

Insbesondere danke ich meinem Freund Nils Margraf für seine Freundschaft und seine liebevolle moralische Unterstützung.

10 Curriculum vitae

Inga Wilde

geboren 1974 in Hamburg

Ausbildung

Seit Sept. 2002

Dissertation

am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, der Universität zu Lübeck

Thema:

Mikrobielle und wirtsseitige Bedingungen der Granulozytenaktivierung

1995-2001

Studium der Biologie, **Diplom**

1991-1995

Luisen-Gymnasium, Bergedorf

Abitur

1985-1991

Realschule Reinbek