

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

---

Gruppe B-Streptokokken-Sepsis - Charakterisierung von Signalwegen und  
immunmodulatorischer Beeinflussung

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von  
Martin Demmert  
aus Stralsund  
Lübeck 2012

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Härtel
  2. Berichtstatter: Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay
- Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2013  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.11.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>6</b>
1.1	Gruppe B Streptokokken . . . . .	6
1.1.1	Taxonomie . . . . .	6
1.1.2	Charakterisierung . . . . .	6
1.1.3	Stadien der Pathogenese . . . . .	7
1.1.4	Besondere Prädisposition Neu- und Frühgeborener . . . . .	19
1.2	Galectin 3 . . . . .	20
1.3	Zytokine . . . . .	22
1.3.1	TNF $\alpha$ . . . . .	22
1.3.2	Interleukin 6 . . . . .	23
1.3.3	Interleukin 8 . . . . .	23
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Material . . . . .	26
3.1.1	Verwendete Reagenzien . . . . .	26
3.1.2	Verwendete Materialien . . . . .	27
3.1.3	Verwendete Geräte . . . . .	28
3.1.4	Anzüchten der Bakterien . . . . .	29
3.1.5	Zellkultur . . . . .	30
3.1.6	Stimulation . . . . .	30
3.1.7	Fixierung der Zellen . . . . .	32
3.1.8	Permeabilisierung der Zellen . . . . .	32
3.1.9	Fluorochrom-konjugierte, monoklonale Antikörper . . . . .	33

3.2	Methoden . . . . .	33
3.2.1	Einstellen der Bakterienkonzentrationen . . . . .	33
3.2.2	Zytokinmessung . . . . .	34
3.2.3	Wachstum und Überleben in verschiedenen Medien . . . . .	37
3.2.4	Galectin 3 Messung . . . . .	38
3.2.5	Datenanalyse . . . . .	39
3.2.6	Ethikvotum . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1	Etablierung des in vitro Sepsis Modells . . . . .	40
4.1.1	Stimulationsdauer . . . . .	40
4.1.2	Stimulus . . . . .	40
4.2	Vergleich von Besiedlungs- und Sepsis isolaten . . . . .	42
4.3	Vergleich mütterlicher und kindlicher Isolate . . . . .	43
4.4	Wachstum und Überleben in verschiedenen Medien . . . . .	44
4.5	Galectin 3 . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen</b>	<b>99</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
CAMP	Christie Atkins Munch-Petersen
CFU	<i>colony forming unit</i>
EOD	<i>early onset disease</i>
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GBS	Gruppe-B-Streptokokken = <i>Streptococcus agalactiae</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheit = <i>colony forming unit</i> = <i>CFU</i>
LD	Letale Dosis
LOD	<i>late onset disease</i>
LPS	Lipopolysaccharid
OD	optische Dichte
PBP	Penicillin bindendes Protein
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SGA	<i>small for gestational age</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Gruppe B Streptokokken

### 1.1.1 Taxonomie

Im Jahr 1887 isolierten Nocard und Mollereau während einer Mastitis Epizootie bei Kühen ein Bakterium, welches sie *Streptococcus de la mammitis* nannten [186]. In dem Bemühen, die Vereinheitlichung der Nomenklatur von Bakterien voranzutreiben, wurde die von Nocard und Mollereau beschriebene Spezies 1889 von Trevisan mit dem Namen *Streptococcus nocardii* bezeichnet [241], welcher sich jedoch nicht in der Praxis durchsetzte. Stattdessen führte Kitt 1893 den Namen *Streptococcus agalactiae contagiosae* [128] und schließlich Lehmann und Neumann 1896 die Bezeichnung *Streptococcus agalactiae* [147] ein, welcher sich trotz der zwischenzeitlich ebenfalls auftauchenden Benennung *Streptococcus mastitidis* [174] und einiger Streitigkeiten um die korrekte Bezeichnung durchgesetzt und bis heute gehalten hat [96][92]. Da *Streptococcus agalactiae* die einzige Spezies innerhalb der Gruppe B Streptokokken ist, werden beide Bezeichnungen synonym verwendet [53].

### 1.1.2 Charakterisierung

Nachdem die Unterscheidung beta-hämolisierender Streptokokken zuvor lediglich durch die Untersuchung verschiedener Stoffwechselfähigkeiten wie zum Beispiel des pH Wertes nach Bebrütung in dextroshaltigem Medium [8] oder der Fähigkeit Natriumhippurat zu spalten [9] möglich gewesen war, etablierte Lancefield 1933 mit dem Präzipitintest eine auf einem zellwandständigen, gruppenspezifischen Polysaccharid (C-Substanz) basierende, serologische Unterscheidungsmöglichkeit, welche eine eindeutige Einteilung in spezifische Gruppen (zunächst A bis E) erlaubte [139] und welche, inzwischen bis

Gruppe S erweitert, noch heute gültig ist. Im Jahr 1980 gelang es zunächst Carey, die Zusammensetzung des gruppenspezifischen Polysaccharids aufzuklären [35], bevor Michon Ende der achtziger Jahre dessen Struktur [173][171] und schließlich 1991 das für die serologischen Reaktionen relevante Epitop beschrieb [172]. 1934 gelang Lancefield die weitere serologische Unterteilung der Gruppe B Streptokokken in die Serotypen I, II und III, basierend auf einem weiteren, kapselständigen Polysaccharid (S-Substanz) [141]. Inzwischen sind zusätzlich die Typen Ia, Ib, Ic und IV - VIII beschrieben worden [142][252][112][107][133][134]. In den letzten 20 Jahren ist es mit Hilfe genetischer Arbeitsmethoden gelungen, Gruppe B Streptokokken auf Basis von *restriction digest patterns* (RDP) und *multilocus sequence typing* (MLST) noch genauer zu charakterisieren [181][121].

### 1.1.3 Stadien der Pathogenese

#### Besiedlung der Schwangeren

Vor allem für die *early onset disease* (Sepsis, Pneumonie, Meningitis), welche innerhalb der ersten 72 Lebensstunden, meistens sogar am ersten Lebenstag, auftritt, ist die rektovaginale Besiedlung der Mutter ein entscheidender Risikofaktor. Weltweit durchgeführte Studien haben gezeigt, dass etwa 10% bis 30% der schwangeren Frauen Gruppe B Streptokokken im Rektum oder in der Vagina tragen [201][11][116]. Dabei kann die Besiedlung transient, chronisch oder intermittierend sein. In etwa 50% bis 70% der Fälle werden die Keime perinatal von der besiedelten Mutter auf das Neugeborene übertragen [74][2]. Kinder von besiedelten Müttern haben im Gegensatz zu Kindern nicht besiedelter Mütter ein um den Faktor 29 erhöhtes Risiko einer *early onset disease* [28]. Außerdem korreliert das Ausmaß der Besiedlung mit dem Risiko der vertikalen Übertragung und mit der Wahrscheinlichkeit einer invasiven Erkrankung des Neugeborenen [189][5]. Diese Daten zeigen, wie essenziell die Fähigkeit, an Vaginalepithel adhären zu können, für die Gruppe B Streptokokken ist. Durch *in vitro* Versuche wurde gezeigt, dass Gruppe B Streptokokken effektiv an Vaginalepithelzellen binden können und dass diese Bindung bei einem pH Wert von 4, wie er in der Vagina üblich ist, bis zu 20fach stärker ist als bei neutralem pH [226][237]. In den letzten Jahren konnten zahlreiche molekulare Mechanismen, die für die Adhäsion verantwortlich sind, ausgemacht werden.

Das Kapselpolysaccharid der Gruppe B Streptokokken enthält einen hohen Anteil an Sialinsäureresten [114][113], welche bei allen Serotypen zum Teil O-acetyliert sind [148]. Der Zweck dieser Acetylierung ist teilweise noch unklar, da Mutanten mit einem hohen Anteil O-acetylierter Sialinsäurereste wesentlich empfindlicher gegenüber den Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten sind [248]. Es wird aber vermutet, dass die O-Acetylierung bei der Besiedlung des Vaginal- bzw. Gastrointestinaltraktes einen Vorteil für die Streptokokken mit sich bringt, da sie die für die Virulenz wichtigen Sialinsäurereste vor der Degradation durch Sialinasen anderer Mikroorganismen schützt [247].

Gruppe B Streptokokken können an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie zum Beispiel Fibronectin, Fibrinogen, Laminin oder Keratin binden, was für die Adhäsion an die verschiedensten Epithelien von Bedeutung sein könnte. Die Fähigkeit an immobilisiertes Fibronectin, wie es an Schleimhautoberflächen vorkommt, nicht jedoch an gelöstes Fibronectin, welches als Opsonin fungieren kann, zu binden [238], wird im Wesentlichen durch die C5a Peptidase vermittelt [42][15]. Die beiden Fibrinogen bindenden Proteine FbsA und FbsB besitzen in purifizierter Form die Fähigkeit, an Fibrinogen zu binden. Im Gegensatz zu FbsA scheint FbsB jedoch nicht essenziell für die Bindung der Streptokokken an Fibrinogen zu sein, da FbsB-negative Mutanten anders als FbsA-negative Mutanten keine verminderte Bindung an Fibrinogen zeigen [216][90]. Mit Hilfe des Laminin bindenden Proteins Lmb können Gruppe B Streptokokken an das extrazelluläre Matrixprotein Laminin binden und damit einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur invasiven Infektion gehen [229].

Zwei Serinreiche (*serine-rich repeat* oder Srr) Proteine, Srr-1 und Srr-2, die in ihrer Struktur den bereits von anderen Bakterienarten als Adhäsine bekannten Srr-Proteinen ähneln, wurden vor wenigen Jahren auch bei Gruppe B Streptokokken entdeckt [235][223]. Dabei kommt Srr-2 lediglich beim Serotyp RDP III-3 und MLST-17 vor, welcher allerdings einen Großteil aller invasiven Erkrankungen beim Neugeborenen verursacht. Im Tierversuch mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass RDP III-3 Stämme, die Srr-2 exprimieren, eine etwa tausendfach niedrigere LD<sub>90</sub> (letale Dosis, bei der 90 % der Tiere sterben) haben als RDP III-3 Stämme ohne Srr-2 [121]. Die Serotypen Ia, Ib, Ic, II, V und III (mit Ausnahme des oben genannten RDP III-3) exprimieren Srr-1 [220]. Srr-1 vermittelt die Bindung an humanes Keratin 4 und damit an HEp-2 (*human epidermoid carcinoma*) Zellen, welche Keratin 4 an ihrer Oberfläche tragen. Keratin 4

kommt auch bei anderen Epithelien, die für den Infektionsweg beim Menschen relevant sind, wie zum Beispiel die Epithelzellen aus Mund-, Pharynx-, Ösophagus-, Vaginal- und Zervixschleimhaut, vor. Diese wurden allerdings noch nicht auf ihre Reaktivität mit Srr-1 getestet [206].

Auch das Adhäsion BibA (GBS immunogenes bakterielles Adhäsion) vermittelt die Bindung von Gruppe B Streptokokken an humane Zervixepithelzellen [208].

### **Infektion des Neugeborenen**

Nach der erfolgreichen Besiedlung der Mutter kann es zur intrauterinen Infektion des Neugeborenen durch Aszension in den Uterus, Durchdringen der Eihäute und Aspiration durch den Fetus kommen. Eine andere Möglichkeit der Infektion kann sich durch Aspiration von Flüssigkeit auf dem Weg durch den Geburtskanal ergeben, wobei die meisten Neugeborenen, die auf diesem Weg Erstkontakt zu Gruppe B Streptokokken haben, zwar besiedelt werden aber in der Regel asymptomatisch bleiben. Bei der Mutter kann es zur Amnionitis, Endometritis oder sogar zur Sepsis kommen. In der Regel bleiben kolonisierte Frauen allerdings ebenfalls asymptomatisch [214].

Das Ibc Antigen (auch C Protein) der Gruppe B Streptokokken ist ein Oberflächenprotein, welches hauptsächlich bei den Serotypen Ia, Ib und II vorkommt und die Produktion schützender Antikörper induzieren kann [138][117][21]. Es beinhaltet mindestens die vier verschiedenen als Antigen fungierenden Determinanten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  [251][22][30][169]. Mittels Knockout-Mutanten, welche das  $\alpha$  C Protein nicht mehr exprimieren, konnte gezeigt werden, dass dieses Protein die Invasion in Zervixepithelzellen vermitteln kann. Die Adhäsionsfähigkeit wird dabei nicht beeinflusst [25]. Des Weiteren sind die Mutanten für neugeborene Mäuse um den Faktor 5-7 weniger letal als der Wildtyp [149]. Die  $\alpha$  C Protein abhängige Adhäsion und Invasion wird sowohl durch Glykosaminoglykane als auch durch Integrine vermittelt [12][26].

Während Gruppe B Streptokokken mittels Transzytose Chorionepithelzellen durchdringen können, scheint das Amnion einen guten Schutz vor den Bakterien zu bieten, da eine Invasion *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte [253][129]. Nichtsdestoweniger nehmen Elastizität und Widerstandsfähigkeit der Eihäute in Anwesenheit von Gruppe B Streptokokken ab [213] und eine starke mütterliche Besiedlung mit Gruppe B Streptokokken ist mit vorzeitigem Blasensprung assoziiert [175]. Vorzeitiger Blasensprung

und eine anschließende Dauer von mehr als 18 Stunden bis zur Geburt wiederum sind signifikante Risikofaktoren für eine Infektion des Neugeborenen [232][28]. Auf welche Weise Gruppe B Streptokokken die Widerstandsfähigkeit der Eihäute beeinflussen, ist nicht geklärt. Mehrere Möglichkeiten kommen hierfür in Betracht. So konnte gezeigt werden, dass Gruppe B Streptokokken eine kollagenolytische Aktivität zeigen, welche die Spaltung des Kollagens im Amnion bewirken könnte [110]. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung des dezidualen  $H_2O_2$ -Halogenid Systems durch die Anwesenheit der Gruppe B Streptokokken in der Zervix oder des unteren Uterus, welches wiederum die Widerstandsfähigkeit des Amnions negativ beeinflusst [211]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass verschiedene Bakterien den Arachidonsäurestoffwechsel von Amnionzellen modifizieren und so die Produktion von Prostaglandin  $E_2$  stimulieren können [137][16], welches seinerseits Wehen auslösen kann [87]. Schließlich können Gruppe B Streptokokken die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Chorionzellen anregen und durch die resultierende Einwanderung von Entzündungszellen ebenfalls zu vorzeitigen Wehen beitragen [63]. Einmal in die Fruchthöhle gelangt, stellt das Fruchtwasser ein sehr gutes Medium für die Vermehrung der Streptokokken dar, so dass der Fetus letztlich mit einer hohen Keimdichte konfrontiert sein kann [224].

### **Virulenzfaktoren für pulmonale Morbidität**

Da die Übertragung der Gruppe B Streptokokken bei der *early onset disease* im Wesentlichen durch die Aspiration von entweder kontaminiertem Fruchtwasser oder Vaginalflüssigkeit geschieht, dient die Lunge oft als Eintrittspforte in den Blutkreislauf und damit als Ausgangspunkt einer Sepsis. Dabei kann es zur Pneumonie kommen, wobei die häufigste Manifestation der *early onset disease* allerdings die Sepsis ohne fokalen Fokus darstellt [75][132]. Zahlreiche Virulenzfaktoren stehen den Gruppe B Streptokokken zur Schädigung des Lungengewebes und schließlich zum Eindringen in den Blutkreislauf zur Verfügung.

Neben den bereits erwähnten Adhäsinen, welche die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine vermitteln und daher in vielen Wirtsnischen von Nutzen sind, gibt es auch Adhäsine, deren Eigenschaften speziell an Alveolarepithelien demonstriert werden konnten. So vermittelt zum Beispiel das bereits erwähnte Adhäsin BibA (GBS immunogenes bakterielles Adhäsिन) auch die Bindung von Gruppe B Streptokokken an

Alveolarepithelzellen [208]. Erst kürzlich wurden außerdem bei Gruppe B Streptokokken Oberflächenproteine entdeckt, welche die Bausteine für Pili darstellen [145]. Wie zuvor bereits bei diversen Gram-negativen Bakterien gezeigt werden konnte, dienen die Pili auch den Gruppe B Streptokokken als Adhäsine [168]. Sie vermitteln unter anderem die Bindung an humanes respiratorisches Epithel [61][155].

Der wahrscheinlich wichtigste Virulenzfaktor, der zur Schädigung des Lungengewebes beiträgt, ist das  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin. Die große Mehrzahl der Gruppe B Streptokokken-Isolate zeigt beta-hämolytische Aktivität [72]. Diese Fähigkeit der Gruppe B Streptokokken, Erythrozyten zu zerstören, rührt vom Exotoxin  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin her, welches als porenbildendes Toxin ein wesentlicher Virulenzfaktor der Gruppe B Streptokokken ist. Als solcher ist er, neben seiner Fähigkeit zur Hämolyse, direkt an der Schädigung diverser weiterer Wirtszellen beteiligt. So konnte in verschiedenen Studien mit nichthämolytischen und hyperhämolytischen Mutanten gezeigt werden, dass zwischen dem Grad der beta-hämolytischen Aktivität von Gruppe B Streptokokken und ihrer Fähigkeit, menschliche Alveolarepithelzellen sowie pulmonale Endothelzellen von Ferkeln zu schädigen, ein direkter, quantitativer Zusammenhang besteht. Dabei zeigt sich ein kompletter Verlust der Mikrovilli und die Zerstörung von Zell- und Kernmembranen. Somit könnte allein das  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin das Eindringen in den Blutkreislauf über die Lunge bewirken [182][183][86]. Bisher ist es nicht gelungen,  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin in Reinform zu isolieren, was auf einer Instabilität des Moleküls zu beruhen scheint. Um die hämolytische Aktivität in Zellkulturüberständen zu erhalten, sind hochmolekulare Trägermoleküle wie zum Beispiel Stärke, Albumin oder Polysorbat 80 erforderlich [161]. Die Aktivität von beta-Hämolysin wird durch Phospholipide wie zum Beispiel Dipalmitoylphosphatidylcholin, dem Hauptbestandteil des Surfactants, stark inhibiert, was zumindest teilweise die besondere Gefährdung Surfactant-defizienter Frühgeborener durch Gruppe B Streptokokken erklären kann [161][202].

Das Enzym Hyaluronat Lyase, welches zunächst fälschlicherweise für eine Neuraminidase gehalten wurde, spaltet Hyaluronsäure, welche als ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix die wichtige Barrierefunktion von Geweben unterstützt [197][153][150]. Hyaluronsäure kommt beispielsweise in der Haut und Synovialflüssigkeit aber auch in der Lunge, der Nabelschnur und im Fruchtwasser vor [146]. Der pulmonale Hyaluronsäuregehalt, welcher als Reaktion auf eine Gewebeschädigung in der

Lunge bei Entzündungen ansteigt, ist bei mit Gruppe B Streptokokken infizierten Ferkeln signifikant erniedrigt [124]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Gruppe B Streptokokken-Isolate, welche von Neugeborenen mit invasiver Erkrankung isoliert worden waren, signifikant mehr Hyaluronat Lyase produzieren als Isolate von asymptomatisch kolonisierten Neugeborenen [180].

Während, wie oben bereits erwähnt, die Fähigkeit der FbsB-negativen Mutanten, Fibrinogen zu binden, gegenüber dem Wildtyp nicht eingeschränkt ist, zeigen sie jedoch eine signifikant niedrigere Invasionsrate in humane Alveolarepithelzellen [90].

Auch die ebenfalls schon erwähnte C5a Peptidase vermittelt die Adhäsion an und die Invasion in humane Alveolarepithelzellen [42].

**CAMP-Faktor** 1944 entdeckten Christie, Atkins und Munch-Petersen, dass Gruppe B Streptokokken auf Blutagarplatten in der Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* eine wesentlich stärker ausgeprägte beta-hämolytische Aktivität zeigten als in Abwesenheit der Staphylokokken und dass dieser Effekt auf dem Zusammenspiel von  $\beta$ -Hämolysin der Staphylokokken mit einem extrazellulären Faktor der Gruppe B Streptokokken beruhte [44]. Später wurde dieser neu entdeckte Faktor nach den Initialen der Entdecker dieses Phänomens CAMP-Faktor genannt und der sogenannte CAMP-Test als ein Standardtest für Gruppe B Streptokokken etabliert [178][179][52]. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass CAMP-Faktor ein weiteres porenbildendes Toxin der Gruppe B Streptokokken ist, welches die Lyse von sphingomyelinreichen Schafs- und Rindererythrozyten bewirkt, sofern das Sphingomyelin ihrer Zellmembranen zuvor mit einer Sphingomyelinase, wie zum Beispiel dem  $\beta$ -Hämolysin von *Staphylococcus aureus*, zu Phosphorylcholin und Ceramid hydrolysiert worden ist [231][56][144].

Obwohl zwei Studien zeigen konnten, dass intravenös applizierte hohe Dosen aufgereinigten CAMP-Faktors letal für Mäuse und Kaninchen sind und dass die gleichzeitige intravenöse Injektion von CAMP-Faktor und intraperitoneale Injektion von Gruppe B Streptokokken in subletaler Konzentration, im Gegensatz zur alleinigen Injektion von CAMP-Faktor oder Gruppe B Streptokokken, bei Mäusen letal ist [225][122], ist die Rolle des CAMP-Faktors als Virulenzfaktor weiterhin unklar. In einer neueren Studie von Hensler et al. wurde gezeigt, dass Mutanten, ohne die Fähigkeit CAMP-Faktor zu bilden, in Mäusen eine vergleichbare Virulenz wie die Wildtypen zeigen [101].

Interessanterweise wird die Expression beider porenbildender Toxine  $\beta$ -Hämolysin/Zy-

tolysin und CAMP-Faktor gegenläufig reguliert. So führt die Aspartatphosphorylierung des „Response-Regulators“ CovR zur Expression von CAMP-Faktor und zur gleichzeitigen Repression von  $\beta$ -Hämolyisin/Zytolysin. Umgekehrt bewirkt die Threoninphosphorylierung von CovR die vermehrte Expression von  $\beta$ -Hämolyisin/Zytolysin und die Repression des CAMP-Faktors [115][199]. Es ist daher denkbar, dass Gruppe B Streptokokken in der Lunge von reifgeborenen Kindern, also in der Anwesenheit von Surfactant, welches die Aktivität von  $\beta$ -Hämolyisin/Zytolysin inhibiert (s.o.), die Expression des CAMP-Faktors steigert, während in der Lunge Frühgeborener mit weniger Surfactant die Expression von  $\beta$ -Hämolyisin/Zytolysin gesteigert werden könnte.

### **Schutz vor der unspezifischen Abwehr des Wirtes**

Nachdem die verschiedensten Wirtsnischen besiedelt und eventuell gar das Eindringen in den Organismus gelungen ist, werden die Gruppe B Streptokokken mit einer Reihe von Abwehrmechanismen konfrontiert, welche es erfolgreich abzuwehren gilt. Auch für diese Aufgabe besitzen die Keime ein ansehnliches Repertoire an Virulenzfaktoren, welche letztlich dazu dienen, der Phagozytose zu entkommen.

Das bereits oben beschriebene  $\beta$ -Hämolyisin/Zytolysin wird durch den offenen Leserahmen *cylE* im *cyl* Genkluster kodiert, welcher gleichzeitig zur Bildung eines orange farbigen Polyenpigments (*Ornithin Rhamno-Polyen* oder *Granadaen*) erforderlich ist [198][228][203]. Dieses Pigment dient Gruppe B Streptokokken mit seiner antioxidativen Eigenschaft als Schutz vor dem oxidativen Burst phagozytierender Wirtszellen. Auf diese Weise ist das *cylE* Gen das Bindeglied zur gleichzeitigen Expression eines offensiven und eines defensiven Virulenzfaktors [154]. Bereits 1934 hatte Lancefield einen Zusammenhang zwischen der hämolytischen Eigenschaft von Gruppe B Streptokokken und der Bildung eines orangefarbenen Pigments erkannt und konnte zeigen, dass Gruppe B Streptokokken ihre hämolytische Eigenschaft und gleichzeitig die Fähigkeit, das Pigment zu bilden, bei der Kultivierung auf Agarplatten verlieren können [140].

Obwohl verschiedene Studien zeigen konnten, dass die Invasion von Epithel- und Endothelzellen durch das typspezifische Kapselpolysaccharid eher behindert wird [237] [184], sind kapsellose Mutanten im Tierversuch deutlich weniger virulent als die bekapselten Wildtypen [204]. Der Grund hierfür liegt in vielschichtigen Interaktionen des Kapselpolysaccharids mit dem angeborenen Immunsystem des Wirtes. Der Grad der

Expression von Kapselpolysaccharid korreliert invers mit der Bindung von C3 und damit der Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems [65][164]. Außerdem phagozytieren Alveolarmakrophagen neugeborener Ratten weniger bekapselte als unbekapselte Gruppe B Streptokokken [165]. Schon 1980 konnte gezeigt werden, dass das Kapselpolysaccharid einen hohen Anteil von Sialinsäureresten enthält, welche auch auf den Zelloberflächen von Wirbeltieren vorkommen [114][113]. Dieses molekulare Mimikri bietet den Gruppe B Streptokokken vom Serotyp III einen guten Schutz vor dem angeborenen Immunsystem, da die Sialinsäurereste mit Siglec-9 (*sialic acid binding Ig-like lectin*), einem Sialinsäure-Rezeptor der neutrophilen Granulozyten zur Erkennung körpereigener Strukturen, reagieren und so den oxidativen Burst und die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) verhindern und die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 anregen [36]. Im Gegensatz dazu, aber mit ähnlichen Schutz bietenden Effekten, binden Gruppe B Streptokokken vom Serotyp Ia mit dem sogenannten  $\beta$  Protein und somit Sialinsäure unabhängig an Siglec-5 [37]. Durch *in vivo* Versuche fand man heraus, dass Mutanten, welche zwar bekapselt jedoch unfähig sind, Sialinsäure zu bilden, ähnlich apathogen für neugeborene Ratten sind wie kapsellose Mutanten [250]. Die Bedeutung der O-Acetylierung der Sialinsäurereste wurde bereits erläutert.

Ein weiterer Verteidigungsmechanismus der Gruppe B Streptokokken gegen reaktive Sauerstoffspezies ist eine Mangan-haltige Superoxiddismutase (SodA), welche Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) zu molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umwandelt. Poyart et al. konnten zeigen, dass SodA-negative Mutanten bei durch Paraquat oder  $H_2O_2$  ausgelöstem oxidativen Stress ein wesentlich langsames Wachstum und eine signifikant höhere Rate an Spontanmutationen als der Wildtyp zeigten. Außerdem wurden die Mutanten in einem Mausmodell vermehrt phagozytiert und ihre Anzahl war, im Gegensatz zum Wildtyp, im Blut und im Gehirn, nicht jedoch in Leber und Milz, deutlich reduziert [195].

Neben den bereits genannten Funktionen dient die C5a Peptidase (auch C5a-ase oder ScpB) den Gruppe B Streptokokken, wie der Name bereits andeutet, zur raschen Inaktivierung des Komplementfaktors C5a, welcher für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bedeutsam ist [102]. Takahashi et al. konnten außerdem nachweisen, dass neben der Rekrutierung auch die Phagozytose durch Granulozyten durch die C5a Peptidase eingeschränkt wird und dies einen Einfluss auf die Virulenz bei neugeborenen

Ratten haben könnte [234].

Die Serin Proteinase (CspA) der Gruppe B Streptokokken bewirkt eine zehnfach erhöhte Virulenz bei neugeborenen Ratten und eine signifikant niedrigere Empfindlichkeit gegen die Phagozytose durch menschliche neutrophile Granulozyten im Gegensatz zu CspA negativen Mutanten [95]. Dabei katalysiert das Enzym die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin ähnliche Moleküle sowie die Spaltung diverser Chemokine aus der CXC Familie. So konnte gezeigt werden das CspA GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$  (*growth related oncogene*), NAP-2 (*neutrophil-activating peptide*) und GCP-2 (*granulocyte chemotactic protein*) nicht jedoch IL-8 spalten kann und dass diese Spaltung die Chemotaxis und die Aktivierung neutrophiler Granulozyten aufhebt [32].

Bakterielle Penicillin bindende Proteine (PBP) sind in der Regel an der Biosynthese von Peptidoglykanen beteiligt und stellen die Bindungsstelle für  $\beta$ -Laktam Antibiotika dar [24][84][230]. Das bei Gruppe B Streptokokken beschriebene PBP1a, welches durch das Gen *ponA* kodiert wird, ist in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden. PBP1a defiziente Mutanten waren zwar, gemessen an der LD<sub>50</sub> bei neugeborenen Ratten um den Faktor 100 weniger virulent und überlebten schlechter in Vollblutansätzen und in Anwesenheit von Alveolarmakrophagen als die Wildtyp Bakterien, zeigten jedoch eine vergleichbare Empfindlichkeit gegen Penicillin [118][120]. Im wesentlichen scheint dies die Folge einer PBP1a abhängigen Resistenz der Gruppe B Streptokokken gegen antimikrobielle Peptide (AMP) aus den Defensin und Cathelicidin Klassen von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten zu sein [91][119]. Wie diese Resistenz zustande kommt, ist jedoch noch ungeklärt. Im Gegensatz zu PBP1a gehen Mutationen im Gen für PBP2X, einem weiteren Penicillin bindenden Protein, tatsächlich mit einer verminderten Empfindlichkeit gegen  $\beta$ -Laktam Antibiotika einher [51].

Die bereits genannten Pili tragen neben ihrer Funktion als Adhäsine auch zur Resistenz gegen Phagozyten und antimikrobielle Peptide bei und verstärken die Virulenz der Streptokokken im Mausmodell [156].

Über die Fähigkeit zur Bindung an Fibrinogen hinaus bietet FbsA den Streptokokken ebenfalls Schutz vor Phagozytose durch Granulozyten [216][90].

Neben der geringeren Adhäsion an Zervix- und Alveolarepithelzellen zeigen BibA-negative Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp ein reduziertes Wachstum im menschlichen Vollblut, eine verminderte Resistenz gegen die Phagozytose durch Granulozyten

und, gemessen an der Letalität, eine verminderte Virulenz im Mausmodell [208].

## Sepsis

Mit dem Eindringen der Gruppe B Streptokokken in die Blutbahn und mit der erfolgreichen Abwehr gegen die Phagozytose kommt es zunächst zur Bakteriämie und schließlich zur Sepsis. Diese systemische Entzündung wird durch komplex verwobene Mechanismen, an denen eine Vielzahl von Zellen, Geweben, Zytokinen, Chemokinen, Rezeptoren und Plasmakaskaden beteiligt sind, reguliert. Der erste Schritt in der Pathogenese der Sepsis ist die Erkennung der Gruppe B Streptokokken als fremd, was durch verschiedene *pattern recognition receptors* (PRR) geschieht. Diese erkennen sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), mikrobielle Strukturen, welche für die Lebensfähigkeit von Mikroorganismen essenziell und daher in verschiedenen Mikroorganismen konserviert sind [3]. Die bestuntersuchten PRR sind die *Toll-like receptors* (TLRs), von denen beim Menschen bisher 10 verschiedene entdeckt wurden [3]. Im Verlauf der GBS Sepsis kommt es zur massiven Zytokinproduktion und -ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und  $\text{TNF}\alpha$ , was sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die Zytokinspiegel im Blut des Neugeborenen können dabei durchaus ein mit adultem Blut vergleichbares Niveau erreichen [18][19].

Während lange Zeit Lipoteichonsäure (LTA) im Verdacht stand, der wesentliche TLR Agonist Gram positiver Keime und somit auch der Gruppe B Streptokokken zu sein, so wie es Lipopolysaccharid (LPS) für Gram-negative Keime ist, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass dieses Molekül, was die TLR Aktivierung angeht, lediglich eine untergeordnete Rolle spielt [98]. Mancuso et al. wiesen nach, dass TLR 2 zusammen mit dem Adapterprotein *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) ein essenzielles Signalmolekül bei der GBS Sepsis ist und Henneke et al. zeigten, dass hauptsächlich gereifte Lipoproteine, welche von den Gruppe B Streptokokken sezerniert werden, diesen Rezeptor aktivieren [159][98], wobei TLR 6 und CD14 als Korezeptoren fungieren [97]. Im Mausmodell der GBS Sepsis kommen TLR 2 und MyD88 ambivalente Rollen zu. Eine kleine subkutan applizierte GBS Dosis, welche von Wildtyp Mäusen ohne systemische Entzündungszeichen eliminiert wird, ist für 20% respektive 30% TLR 2- bzw. MyD88-defizienter Mäuse tödlich. Die Untersuchung der bakteriellen Belastung und der Zytokinspiegel im Blut zeigte, dass bei den Wildtyp Mäusen weder eine Ausbreitung

der Bakterien noch messbare Zytokinspiegel vorlagen, während die Bakterien bei den Mutanten im Blut und in verschiedenen Organen nachweisbar waren und 100% respektive 60% der Mäuse erhöhte TNF $\alpha$ - und IL6 Spiegel zeigten. Im Gegensatz dazu zeigte sich im LD<sub>90</sub> Modell, in dem 86% der Wildtyp Mäuse starben, dass die TLR 2- bzw. die MyD88-Defizienz einen protektiven Effekt hat. Zwar war die bakterielle Belastung in allen Mäusen ähnlich hoch, jedoch zeigten die Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp signifikant niedrigere TNF $\alpha$ - und IL6 Spiegel. Des Weiteren zeigten Wildtyp Mäuse, welche mit anti-TNF $\alpha$  Antikörpern behandelt worden waren, vergleichbare Reaktionen auf die niedrigen und hohen GBS Inokula wie die TLR 2- bzw. MyD88-defizienten Mäuse. Diese Versuche deuten darauf hin, dass die Effekte der TLR 2- bzw. MyD88 Defizienz im wesentlichen auf einer gedämpften TNF $\alpha$  Antwort beruhen. In allen Versuchen zeigten die MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu den TLR 2-defizienten Tieren eine ausgeprägtere Unfähigkeit, die Infektion zu beherrschen bzw. ausreichende Zytokinmengen zu bilden, was darauf schließen lässt, dass neben TLR 2 auch andere für die GBS Sepsis wichtige Rezeptoren den MyD88 Signalweg verwenden [159].

Neben den sezernierten Lipoproteinen existiert bei Gruppe B Streptokokken mindestens ein weiterer PAMP, welcher jedoch zellgebunden ist und dessen Beschaffenheit noch ungeklärt ist. Da die gesuchte Struktur an der Oberfläche der Keime liegen muss, waren besonders das gruppen- und das typenspezifische Polysaccharid in den Blickpunkt geraten, wobei letzteres bereits wieder ausgeschlossen werden konnte, da Mutanten ohne typenspezifisches Antigen über eine normale proinflammatorische Potenz verfügen. Die Datenlage für das gruppenspezifische Antigen hingegen lässt eine Beurteilung hinsichtlich der proinflammatorischen Potenz noch nicht zu [249]. Während die Aktivierung einer Zytokinantwort auch für diesen unbekanntem Faktor das Adapterprotein MyD88 erfordert [97], ist der dazugehörige TLR noch nicht gefunden. Bisher konnten sowohl die TLRs 1, 2, 4, 5 und 9 als auch CD14 und CD11b/CD18, welcher auch als Komplementrezeptor 3 bezeichnet wird und die Internalisierung von Gruppe B Streptokokken vermittelt, als Kandidaten ausgeschlossen werden, da Makrophagen entsprechender Knockout-Mäuse bei Kontakt mit hitzeinaktivierten Gruppe B Streptokokken eine unverminderte TNF $\alpha$  Antwort zeigten [97][100].

Auch das bereits erwähnte  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin kommt als PAMP in Betracht, da die  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin Expression mit der Expression von Zytokinen und der Apoptoserate korreliert. Ein Rezeptor, der diese proinflammatorische Aktivität auslöst,

konnte jedoch auch hier noch nicht gefunden werden [57][185][249].

Zahlreiche weitere Rezeptoren kommen als für die GBS Sepsis relevante PRR in Frage. Dazu zählen sowohl weitere Zellwand gebundene Rezeptoren wie das  $\beta_2$ -Integrin CD11b/CD18 als auch intrazelluläre Rezeptoren wie *nucleotide-binding oligomerization domain 2* (NOD 2) und das Inflammasom. Daten, die eine Relevanz dieser Rezeptoren im Rahmen der GBS Sepsis belegen, existieren zur Zeit allerdings nicht [249].

Während  $\text{TNF}\alpha$  als wesentliches proinflammatorisches Zytokin für die Lethalität verantwortlich zu sein scheint, konnten für IL-12, Typ I Interferone, IL-6, IL-18 und IL-10 im Mausmodell protektive Effekte nachgewiesen werden [157][160][158][50][49].

## Meningitis

Seit der Einführung der Impfung gegen *Haemophilus influenzae* Typ b sind Gruppe B Streptokokken die häufigste Ursache für Meningitis bei Neugeborenen und die dritthäufigste Meningitisursache generell [217]. Insbesondere bei der *late onset disease* ist die Meningitis mit etwa 20% bis 50% der Fälle neben der Sepsis die wesentliche Manifestationsform [59][215]. Bei der *early onset disease* erleiden heutzutage etwa 6% bis 10% der Patienten eine Meningitis [215][75]. Mit etwa 15% bis 50% ist der Anteil der Patienten mit neurologischen Folgeerkrankungen immer noch sehr hoch. Zu diesen Folgeerkrankungen zählen unter anderem mentale Retardierung, Tetraplegie, kortikale Blindheit und Taubheit, Krampfanfälle sowie Hydrozephalus [244][66]. Um sich Zugang zu den Meningen verschaffen zu können, ist es nötig, an die Zellen der Blut-Hirn-Schranke zu binden und sie zu überwinden. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus spezialisierten Endothelzellen, welche mittels *tight junctions* miteinander verbunden sind [20]. Durch zahlreiche *in vitro* Versuche an diesen sogenannten humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (*human brain microvascular endothelial cells* bzw. hBMEC) konnte gezeigt werden, dass Gruppe B Streptokokken diese mittels ebenso zahlreicher Virulenzfaktoren überwinden können und dass sich diese Erkenntnisse oft auch auf ein *in vivo* Modell übertragen lassen.

Die kürzlich entdeckten Pili vermitteln neben der Adhäsion an humanes respiratorisches Epithel auch die Adhäsion an humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns sowie die Invasion in diese [155].

Die drei bereits oben genannten Proteine Srr-1, FbsA und Lmb vermitteln neben

der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine auch die Invasion in humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns. So zeigen *in vitro* Versuche mit entsprechenden Knockout Mutanten jeweils eine signifikant erniedrigte Invasionsrate in diese spezialisierten Endothelzellen. Für Srr-1 konnten diese Ergebnisse auch *in vivo* bestätigt werden, da auch im Mausmodell eine verminderte Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch Srr-1-negative Mutanten nachgewiesen wurde [227][239][240].

Durch ein Screening von nach dem Zufallsprinzip generierten Mutanten wurde das Invasions-assoziierte Gen (IagA) entdeckt. Das Genprodukt ist eine Glykosyltransferase, welche letztlich an der Verankerung von Lipoteichonsäure in der bakteriellen Zellwand beteiligt ist. IagA-negative Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* eine niedrigere Invasionsrate in humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns und im Mausmodell eine niedrigere Letalität sowie eine geringere Rate an Meningitiden [58]. Dabei scheint vor allem der Verankerung in der Zellwand eine Schlüsselrolle zuzukommen, da IagA-negative Mutanten auch in Anwesenheit löslicher Lipoteichonsäure keine erhöhte Virulenz zeigen [58]. Und obwohl Lipoteichonsäure durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen Organschäden und Schock auslösen kann [127][126] und dies im Wesentlichen über TLR-2 vermittelt wird [236][159], ist die verminderte Virulenz der IagA-negativen Mutanten nicht TLR-2 abhängig sondern eher auf eine direkte Interaktion der Bakterien mit den Endothelzellen zurückzuführen [58].

Auch das bereits mehrfach erwähnte  $\beta$ -Hämolysin/Zytolysin scheint an diesem Schritt der Pathogenese beteiligt zu sein, da der Grad seiner Expression auch mit dem Grad der Schädigung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns direkt korreliert [184].

#### **1.1.4 Besondere Prädisposition Neu- und Frühgeborener**

Warum insbesondere Neugeborene und in noch stärkerem Maße Frühgeborene empfänglich für eine Gruppe B Streptokokken Sepsis sind, kann bis heute im Wesentlichen nur spekuliert werden, da die komplexen Vorgänge während der Erkrankung nur unzureichend aufgeklärt sind. Gleichwohl bieten eine Reihe von Daten zumindest eine ansatzweise Erklärung für diese Prädisposition.

Im besonderen Maße scheint eine unzureichende Phagozytosefähigkeit des Neugeborenen eine Rolle zu spielen. So ist zum Beispiel die LD<sub>90</sub> von Gruppe B Streptokokken

bei neugeborenen Mäusen  $10^6$  fach niedriger als bei ausgewachsenen Mäusen und die Alveolarmakrophagen neugeborener Mäuse phagozytieren Gruppe B Streptokokken weniger effizient als die ausgewachsener Mäuse. Während Monozyten von Neugeborenen *Escherichia coli* und *Streptococcus pyogenes* zu töten vermögen, schaffen sie dies nicht mit Gruppe B Streptokokken [162][165][159]. Die Bekämpfung von GBS durch Granulozyten ist abhängig von CD11b/CD18, welches besonders bei Frühgeborenen vermindert exprimiert wird, sowie der Opsonierung durch verschiedene Komplementfaktoren, welche bei Neugeborenen und besonders bei Frühgeborenen lediglich in niedriger Konzentration vorliegen [222][62][167]. Auch ein Mangel an spezifischen Antikörpern sowie eine verminderte Expression des Fc $\gamma$  Rezeptor III bei Frühgeborenen kann zu einer verminderten Fc Rezeptor vermittelten Phagozytose beitragen [38]. Desweiteren ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder Enzymen wie Elastase oder Lysozym sowie das Ausmaß anderer Abwehrmechanismen wie zum Beispiel Lactoferrin bei Neugeborenen vermindert [81][99][249]. Inwiefern dies für die Entstehung der GBS Sepsis relevant ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, zumal andere antimikrobielle Moleküle wie Cathelicidin und  $\beta$ -Defensin 2 in der Haut Neugeborener vermehrt exprimiert werden [60].

Neben der verminderten Fähigkeit zur Phagozytose ist bei Neugeborenen besonders während der ersten zehn Lebenstage auch die Fähigkeit der Phagozyten zur Chemotaxis und Adhäsion eingeschränkt. Dies zeigen einerseits zahlreiche funktionelle Untersuchungen [188][130][7][39][254], andererseits konnten diese Beobachtungen auch auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. So konnte bei neutrophilen Granulozyten von Neugeborenen eine verminderte Expression des Adhäsins LECAM-1 (*lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-, cell adhesion molecule-1*) sowie eine verminderte Actin Polymerisation demonstriert werden [205][68][6][94][163].

## 1.2 Galectin 3

Galectine bilden eine eigenständige Proteinfamilie innerhalb der Lectine und zeichnen sich durch ihre gemeinsame Fähigkeit,  $\beta$ -Galactoside zu binden und durch eine konservierte Sequenz von ca. 130 Aminosäuren in ihrer *carbohydrate recognition domain* (CRD) aus. Bis heute wurden 15 verschiedene Galectine beschrieben, welche in drei Gruppen, Prototyp Galectine, Tandemwiederholung Galectine und Chimärtyp

Galectine, eingeteilt werden können. Der einziger Vertreter der Chimärtyp Galectine ist Galectin 3 [13][187]. Galectine kommen von Schwämmen bis zu Wirbeltieren in zahlreichen Spezies vor [47]. Sie erfüllen sowohl intrazelluläre (vermutlich prä-mRNA Splicing) als auch extrazelluläre (unter anderem Zell-Zell Interaktion, Immunmodulation, Tumorentwicklung) Funktionen [243][191][69].

Galectin 3 (auch Mac-2, L-29, CBP-35, eBP oder LGALS3 Antigen) wird von praktisch allen Zellen des Immunsystems exprimiert. Dazu gehören Endothelzellen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen. In zahlreichen Versuchen konnten Galectin 3, im Gegensatz zu zum Beispiel Galectin 1, überwiegend proinflammatorische Effekte nachgewiesen werden. Erhöhte Galectin 3 Werte fanden sich in der BAL Flüssigkeit von Mäusen mit entweder Ovalbumin oder *Streptococcus pneumoniae* induzierter Pneumonie, in mit Prionen infiziertem Gehirngewebe, in Thymusgewebe nach *Trypanosoma cruzi* Infektion und in Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Literaturübersicht in [187]). Desweiteren zeigen Knockoutmäuse ohne Galectin 3 eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen im Rahmen einer Peritonitis [45][106]. Rekombinantes Galectin 3 wiederum fördert die Interaktion neutrophiler Granulozyten mit Endothelzellen und Matrixproteinen wie Laminin oder Fibronectin [210][136]. Es ist außerdem an der Aktivierung von Abwehrzellen beteiligt und fördert die Mastzelldegranulation, Interleukin 1 und Superoxid Produktion in Monozyten und Interleukin 8 Produktion in neutrophilen Granulozyten [187]. Eine differenzierte Rolle spielt Galectin 3 bei der Apoptose. Intrazelluläres Galectin 3 wirkt protektiv gegen Apoptosesignale, was bis zur Resistenz von Tumorzellen gegen Zytostatika führen kann [177]. Extrazelluläres Galectin 3 hingegen, kann zur Apoptose verschiedener Zellen (T-Lymphozyten, Mastzellen, Granulozyten) beitragen [187][255]. Auch die Phagozytose wird durch Galectin 3 beeinflusst, so dass die Makrophagen von Galectin 3 Knockoutmäusen eine verminderte Phagozytoseaktivität zeigen und das Hinzufügen von exogenem Galectin 3 die Phagozytoserate steigern kann [207][125][73]. Neben diesen überwiegend proinflammatorischen Eigenschaften kann Galectin 3 auch Lipopolysaccharid binden und auf diese Weise die Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmen, so dass Galectin 3 Knockoutmäuse anfälliger für einen Endotoxinschock sind [151].

## 1.3 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe von Signalproteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 8.000 bis 40.000 Dalton, welche von nahezu allen Zellen als Antwort auf einen spezifischen Reiz sezerniert werden können und zahlreiche Funktionen erfüllen. Insbesondere werden sie aber von den immunkompetenten Zellen selbst sezerniert. Sie regulieren und koordinieren die Interaktion der verschiedenen Zellen des Immunsystems und tragen so zu einer adäquaten Immunantwort bei. Diese Immunantwort kann jedoch nur dann adäquat sein, so lange im Zusammenspiel aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen die richtige Balance herrscht. Bei der Sepsis geht diese Balance zu Gunsten der proinflammatorischen Zytokine verloren, was letztlich zu ausgedehnten Gewebeschäden und Organversagen führen kann. Im Rahmen der Sepsis spielen besonders  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL6}$  und  $\text{IL8}$  eine wichtige Rolle [23][55].

### 1.3.1 $\text{TNF}\alpha$

Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielt  $\text{TNF}\alpha$ . Dieses 17 kDa Protein, welches im Wesentlichen von Monozyten expremiert wird, konnte mit zahlreichen infektiösen und nicht-infektiösen entzündlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [233]. Die Bildung von  $\text{TNF}\alpha$  erfolgt nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs, wobei die Stimulation mit LPS am ausführlichsten untersucht worden ist. Nach der intravenösen Gabe von LPS steigt der  $\text{TNF}\alpha$  Spiegel beim Menschen signifikant an und erreicht bereits nach 60 bis 90 Minuten sein Maximum [170][34]. *In vitro* induziert  $\text{TNF}\alpha$  die Bildung von Interleukin 1 $\beta$ , 6 und 8 und die Gabe von anti  $\text{TNF}\alpha$  Antikörpern reduziert bei Pavianen, welche mit *Escherichia coli* infiziert worden sind, neben der Bildung dieser Zytokine auch die Morbidität und Mortalität [76][71][200]. Die Injektion von rekombinantem  $\text{TNF}\alpha$  löst beim Menschen eine systemische Inflammation aus, welche mit Fieber, hämodynamischen Veränderungen und Koagulopathie einhergeht [41][221][193].

Für Gruppe B Streptokokken konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Monozyten aus Nabelschnurblut mit hitzeinaktivierten Keimen eine signifikant höhere  $\text{TNF}\alpha$  Sekretion bewirkte als die Stimulation mit LPS oder LTA. Interessanterweise war dies bei Monozyten von adulten Spendern nicht der Fall. Die absoluten  $\text{TNF}\alpha$  Spie-

gel lagen dabei sowohl bei Nabelschnurblut als auch bei adultem Blut in der gleichen Größenordnung [19].

### 1.3.2 Interleukin 6

Interleukin 6 ist ein Glykoprotein von 21 kDa, welches hauptsächlich von Fibroblasten, Lymphozyten, Endothelzellen und Monozyten produziert wird. Die Produktion von IL-6 kann durch  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert werden und wird durch den Transkriptionsfaktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) reguliert. Zu den zahlreichen Effekten, die IL-6 bewirkt, gehören die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, die Induktion von Akute-Phase-Proteinen, Modulation der Hämatopoese, Aktivierung des Gerinnungssystems und Auslösen von Fieber [54][27][194]. Nach Injektion von Endotoxin liegt der maximale IL-6 Spiegel mit 180 bis 240 Minuten zeitlich hinter dem maximalen  $\text{TNF}\alpha$  Spiegel [48][135]. Die Rolle von IL-6 während der Sepsis ist teils noch unklar. Die Injektion von IL-6 führt nicht wie bei  $\text{TNF}\alpha$  zu einem systemischen Inflammationssyndrom und positive Effekte einer Gabe von anti IL-6 bzw. anti IL-6 Rezeptor Antikörpern während einer Sepsis können durch zusätzliche Gabe von  $\text{TNF}\alpha$  oder LPS aufgehoben werden [196][152]. *In vitro* supprimiert IL-6 die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 $\beta$  [1][212]. Trotz dieser unklaren Rolle korreliert die IL-6 Konzentration enger mit der Schwere und dem Ausgang einer Sepsis beim Menschen als andere Zytokine, da seine Konzentration wahrscheinlich am besten eine Aktivierung der Zytokinkaskade anzeigt [23].

Ähnlich wie für  $\text{TNF}\alpha$  konnte auch für IL-6 gezeigt werden, dass die Stimulation von Monozyten aus Nabelschnurblut mit hitzeinaktivierten Gruppe B Streptokokken eine höhere Produktion induzierte als die Stimulation mit LPS oder LTA [19]. In einem *in vivo* Mausmodell konnte für IL-6 ein gewisser protektiver Effekt bei Infektion mit Gruppe B Streptokokken nachgewiesen werden [158].

### 1.3.3 Interleukin 8

Interleukin 8 ist mit 8,4 kDa ein kleines Protein aus der Gruppe der Chemokine und wird von Monozyten, Granulozyten, Endothelzellen und Mesothelzellen nach der Stimulation mit zum Beispiel Endotoxin, IL-1 oder  $\text{TNF}\alpha$  produziert. Die Hauptwirkung dieses Zytokins ist die aktivierende und chemotaktische Wirkung auf neutrophile Gra-

nulozyten. Des Weiteren wirkt es auch chemotaktisch auf basophile Granulozyten und T-Lymphozyten. Auch eine angiogenetische Wirkung sowie eine Beteiligung an der Lungenschädigung im Rahmen eines ARDS wird IL-8 zugeschrieben [131][43]. Eine intravenöse Injektion von IL-8 ist ähnlich wirkungsarm wie die Injektion von IL-6 und auch die Kinetik dieser beiden Zytokine ähnelt sich [256][257][135].

Bei der Stimulation von Monozyten aus Nabelschnurblut mit Gruppe B Streptokokken kommt es auch zur Expression von IL-8. Der Grad der Expression ist dabei mit dem von Monozyten adulter Spender vergleichbar [19].

## 2 Fragestellung

Als einer der bedeutendsten Krankheitserreger für Früh- und Neugeborene trägt *Streptococcus agalactiae* trotz großer Fortschritte in Prophylaxe und Therapie nach wie vor wesentlich zur Morbidität und Mortalität der Patienten bei. Während bereits viele Virulenzfaktoren identifiziert und viele ihrer Funktionen entschlüsselt werden konnten, gibt es, insbesondere was die Interaktion mit dem Immunsystem im Rahmen der Sepsis angeht, noch viele offene Fragen. Daher wurden für die vorliegende Arbeit folgende Ziele formuliert:

1. Es sollte ein *in vitro* Sepsis Modell etabliert und anhand dieses Modells die Zytokinantwort sowie deren Kinetik im Rahmen der Gruppe B Streptokokken Sepsis charakterisiert werden. Basierend auf dem Modell von Härtel et al. sowie auf der Methode von Schultz et al., sollten Vollblutansätze mit vitalen Gruppe B Streptokokken stimuliert und anschließend die Zytokinantwort mittels Durchflusszytometrie analysiert werden [105][218]. Ein solches funktionstüchtiges Modell kann auch für nachfolgende Arbeiten ein wichtiges Werkzeug bei der Erforschung der Gruppe B Streptokokken Sepsis sein.

2. Desweiteren stand die Frage im Vordergrund, ob sich für die klinische *in vivo* Manifestation (Sepsis, asymptomatische Hautbesiedlung) ein Korrelat *in vitro* finden lässt. Hierfür wurden sieben Sepsis isolate aus dem Blut erkrankter Neugeborener und sechs Besiedlungs isolate von Hautabstrichen gesunder Neugeborener, als Stimulanz in Nabelschnurblut eingesetzt und sowohl die Zytokinantwort als auch das Wachstumsverhalten analysiert.

3. Schließlich sollte die Frage geklärt werden, ob neben den Zytokinen auch Galectin 3, dessen Rolle als proinflammatorisches Signalmolekül in den letzten Jahren zunehmende Beachtung fand, für das bisher bei Neugeborenen aber keine Daten vorliegen, eine Funktion im angeborenen Immunsystem von Früh- und Neugeborenen sowie im Rahmen einer Gruppe B Streptokokken Sepsis zukommt. Es wurde das gleiche *in vitro* Modell verwendet und die Galectin 3 Konzentrationen mittels ELISA gemessen.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Verwendete Reagenzien

- Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt
- Columbia blood agar base, Oxoid Limited, Hampshire, England
- Defibriniertes Schafsblut, Oxoid Limited, Hampshire, England
- RPMI 1640 mit 2,0 g/L NaHCO<sub>3</sub> ohne L-Glutamin mit Phenolrot, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Penicillin/Streptomycin, 10.000 E/10.000 µg/mL, Biochrom AG, Berlin
- N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin, 200 mmol/L, Biochrom AG, Berlin
- Nicht-essentielle Aminosäuren, Biochrom AG, Berlin
- Natrium-Pyruvat, 100 mmol/L, Biochrom AG, Berlin
- Lipopolysaccharide (LPS) L3129, Sigma-Aldrich, München
- PBS1, SAFC, St. Louis, USA
- HEPES-Pufferlösung (1M), Biochrom AG, Berlin
- Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Premium Gradient, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- Saponin Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
- PFA, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze

- Magermilchpulver, Spinnrad AG, Bad Segeberg
- PC5-konjugierter anti human CD14 Antikörper, Maus IgG2a, Klon RMO52, IMMUNO TECH SAS, Beckman Coulter, Marseille Frankreich
- FITC-konjugierter anti-human IL-6 Antikörper, Ratte IgG1, Klon MQ2-13A5, BD Biosciences, San Jose, USA
- PE-konjugierter anti-human IL-8 Antikörper, Maus IgG2b, Klon G265-8, BD Biosciences, San Jose, USA
- FITC-konjugierter anti-human TNF $\alpha$ , Maus IgG 1, Klon Mab11 BD Biosciences, San Jose, USA
- Unkonjugierter anti-human IL-6 Antikörper, Ratte IgG1, Klon MQ2-13A5, BD Biosciences, San Jose, USA
- Unkonjugierter anti-human IL-8 Antikörper, Maus IgG2b, Klon G265-8, BD Biosciences, San Jose, USA
- Unkonjugierter anti-human TNF $\alpha$ , Maus IgG 1, Klon Mab11, BD Biosciences, San Jose, USA
- Human Galectin-3 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

### **3.1.2 Verwendete Materialien**

- Petrischale, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Impfschlinge, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- 15 mL Röhre mit konischem Boden und Schraubverschluss, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Halb-Mikro-Küvette, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Combitip<sup>®</sup>, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitze, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

- Serologische Pipette 5 mL und 10 mL, Nunc<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Reagenzglas, Schuett-biotec GmbH, Göttingen
- Blutentnahmeröhrchen, S-Monovette<sup>®</sup>, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- 24-Wellplatte Cellstar<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- 5 mL Röhrchen für Durchflusszytometrie, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- Standard Reaktionsgefäß 3810X 1,5 mL, Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.3 Verwendete Geräte

- Minishaker MS 1, IKA - Werke GmbH & Co. KG, Staufen
- Spectrophotometer, Jenway 6305, Jenway Limited, Gransmore Green, Felsted, Dunmow, Essex, England
- Pipetten Multipette<sup>®</sup>, Reference<sup>®</sup> und Research<sup>®</sup>, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipette Finnpipette<sup>®</sup> Novus Single-Channel 100 - 1000 µL, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Pipettierhilfe Macroman<sup>TM</sup>, Gilson Inc., USA
- Analysenwaage AE 240, Mettler-Toledo GmbH, Giessen
- Inkubator Cytoperm, Heraeus, Hanau
- Wärmeschränk T6, Heraeus, Hanau
- Begasungsbrutschränk 6000, Heraeus, Hanau
- Autoklav Systec V-95, Systec GmbH, Wetttenberg
- Schüttelinkubator, C. Gerhardt Fabrik und Lager chemischer Apparate GmbH & Co. KG, Königswinter
- Zentrifuge Rotanta 46 RSC, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

- Sterilbank mit Abzug, Heraeus, Hanau
- 3-DIFF-Analysegerät ABX Micros 60, Axon Lab AG, Stuttgart
- Durchflusszytometer, FACS Canto™, BD Biosciences, San Jose, USA
- ELISA reader Spectra Classic, SLT Labinstruments GmbH, Crailsheim

### 3.1.4 Anzüchten der Bakterien

#### Bakterien

Die untersuchten Gruppe B Streptokokken Besiedlungs- und Sepsisolate wurden in den Jahren 1998 und 1999 von früh- bzw. neugeborenen Kindern in der Göttinger Universitäts-Kinderklinik isoliert, durch das dortige bakteriologische Labor erfasst und mit freundlicher Genehmigung von Prof. Herting zur Verfügung gestellt. [246]. Zusätzlich wurden Gruppe B Streptokokken eines Säuglings mit *late onset sepsis* und dessen Mutter aus dem Jahr 2002 untersucht.

		Bezeichnung						
Paarung	Sepsis	15	47	56	63	82	83	84
	Besiedlung	34	45	66	73	81	90	
	Kind Liquor	281						
	Kind BK	282						
	Vaginalabstrich	283						

**Tabelle 3.1**  
Bezeichnung der GBS Stämme (übernommen aus [246])

#### Schafsblutagar

Zur Herstellung des Schafsblutagars wurden 39 g des Columbia-Agar-Base-Pulvers in 1000 mL bidestilliertem Wasser gelöst und in einem 2 L-Erlenmeyerkolben 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde der Agar im Wasserbad bei 60 °C bis zur weiteren Benutzung aufbewahrt. Während der Versuchsdurchführung wurden bedarfsgerechte Portionen in sterile Flaschen gefüllt, auf handwarme Temperatur abgekühlt

und 5% defibriniertes, auf Raumtemperatur erwärmtes, Schafsblut zugegeben. Der auf diese Weise hergestellte Schafsblutagar wurde dann auf die unten beschriebene Weise verwendet.

### **3.1.5 Zellkultur**

#### **Nabelschnurblut**

Für die Zytokinmessungen wurde Nabelschnurblut von Neugeborenen, für die Galec-  
tin 3 Messungen Nabelschnurblut von 21 Neu- und 125 Frühgeborenen der Lübecker  
Universitäts-Kinderklinik verwendet und bis zum Gebrauch maximal 20 Stunden in  
Lithium-Heparin-Röhrchen aufbewahrt [219]. Wesentliche Charakteristika der unter-  
suchten Kohorte der Frühgeborenen zeigt Tabelle 3.2.

#### **Medium**

Als Medium für die Ansätze zur Zytokinmessung diente RPMI 1640 Medium mit  
2 g/L NaHCO<sub>3</sub> und ohne L-Glutamin, welches mit Penicillin/Streptomycin, N-Acetyl-  
L-Alanin-L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und Natrium-Pyruvat je zu glei-  
chen Teilen angereichert wurde. Dazu wurden stets frisch nach Bedarf 4 mL dieser  
Mischung von Zusatzstoffen, welche bei -20 °C gelagert wurde, zu 96 mL RPMI 1640  
in eine sterile Flasche pipettiert und die Flasche anschließend geschwenkt. Das auf die-  
se Weise hergestellte Medium wurde bei 4 °C gelagert und so lange verwendet, bis der  
enthaltene Indikator Phenolrot eine pH-Änderung in den sauren Bereich anzeigte.

### **3.1.6 Stimulation**

#### **Lipopolysaccharid**

Zur Herstellung einer LPS Stocklösung wurden 10 mg LPS in 10 mL PBS gegeben und  
100 µL Aliquots dieser Lösung bei -20 °C aufbewahrt. Nach Bedarf wurden die Ali-  
quots bei Raumtemperatur aufgetaut. Vor weiterer Verwendung als Stimulanz wurden  
2 µL dieser Lösung zu 1998 µL des Mediums (siehe Abschnitt 3.1.5) pipettiert und die  
entstandene 0,1% Lösung gut gemischt.

Charakteristika	Daten
n	125
Gestationsalter (Wochen), Median (SD)	29,9 (2,8)
SGA Kinder	27,6 (3,1)
AGA Kinder	30,1 (2,7)
Geburtsgewicht (g), Median (SD)	1385 (535)
SGA Kinder	689 (294)
AGA Kinder	1439 (512)
männliches Geschlecht (%)	44,8
Herkunft der Mutter (%)	
Deutschland	83,2
Türkei	8,8
Mittlerer Osten	7,2
andere	0,8
Nabelarterien pH, Median (SD)	7,19 (0,08)
Grund der Frühgeburtlichkeit(%)	
Vorzeitiger Blasensprung	21,6
Amnioninfektionssyndrom	22,4
Präeklampsie	7,2
Pathologisches CTG	10,4
Placentalösung	3,2
andere	35,2

**Tabelle 3.2**  
Frühgeborenenkohorte

## **Monensin**

Von einer 10-millimolaren Stocklösung des Ionophors Monensin, welche durch Lösen von 69,3 g Monensin in 10 mL Ethanol hergestellt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, wurden vor weiterer Verwendung  $10\ \mu\text{L}$  zu  $990\ \mu\text{L}$  Medium (siehe Abschnitt 3.1.5) pipettiert und die entstandene 100-mikromolare Lösung gut gemischt.

## **3.1.7 Fixierung der Zellen**

### **Paraformaldehyd**

Eine 4% Formaldehydlösung wurde hergestellt, indem 2 g PFA-Pulver, welches bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde, in einem 50 mL Falcon Röhrchen abgewogen und in 50 mL PBS gelöst wurden. Zur schnelleren und besseren Lösung des Pulvers wurde die Lösung bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank aufbewahrt. Nach vollständiger Lösung des Pulvers wurde die Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und maximal drei Tage verwendet.

### **Magermilch**

Zur Herstellung einer 5% Magermilchlösung wurden 2,5 g Magermilchpulver in einem 50 mL Falcon Röhrchen abgewogen und in 50 mL PBS gelöst. Bis zur vollständigen Lösung des Pulvers wurde die Magermilchlösung bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank aufbewahrt, anschließend wurde sie bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und maximal eine Woche verwendet.

## **3.1.8 Permeabilisierung der Zellen**

### **Saponin**

Die Herstellung einer 10% Saponinstocklösung erfolgte, indem 1 g Saponinpulver in einem 50 mL Falcon Röhrchen abgewogen und in 10 mL PBS gelöst wurde. Bis zur vollständigen Lösung des Pulvers wurde die Saponinlösung bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank aufbewahrt, anschließend wurde sie bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und maximal eine Woche verwendet.

### **Saponin-Waschpuffer**

Indem von der zuvor beschriebenen 10% Saponinlösung 2 mL mit 2 mL HEPES-Puffer gemischt und diese Mischung mit PBS auf 200 mL aufgefüllt wurde, erfolgte die Herstellung eines 0,1% Saponin-Waschpuffers.

## **3.1.9 Fluorochrom-konjugierte, monoklonale Antikörper**

### **Antikörper-Verdünnung**

Die mit Farbstoffen konjugierten Antikörper gegen IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  wurden vor Verwendung in bedarfsgerechter Menge mit PBS im Verhältnis 1:20 verdünnt. Die verwendeten Antikörper gegen IL-6 und TNF $\alpha$  waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC und die Antikörper gegen IL-8 mit PE konjugiert. Aufgrund der verschiedenen Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren konnten IL-6 und IL-8 gemeinsam verdünnt und in einer Probe verwendet werden.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Einstellen der Bakterienkonzentrationen**

Um bei den späteren Versuchen Bakteriensuspensionen mit einer reproduzierbaren Konzentration von  $1 \times 10^8$  Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter zu erhalten, wurden zunächst für jedes GBS-Isolat Verdünnungsreihen verschiedener Ausgangskonzentrationen angelegt und auf Blutagarplatten kultiviert. Die Verdünnungen erfolgten in 1:10 Schritten.

Zunächst wurden hierfür die in Nährstoffbouillon tiefgefrorenen GBS-Isolate auf Blutagarplatten überimpft und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Mit einer sterilen Öse wurden dann einige auf den Platten gewachsene Kolonien in 0,9% NaCl suspendiert, gemischt und mit dem Photometer die optische Dichte (OD) bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Als Leerwert diente 0,9% NaCl. Durch Zufügen weiterer Kolonien bzw. durch Verdünnung mit 0,9% NaCl wurden die Suspensionen auf zuvor festgelegte aufsteigende OD-Werte eingestellt. Für die erste 1:10 Verdünnung wurden aus der Suspension je eingestelltem OD-Wert 100  $\mu$ L in 900  $\mu$ L 0,9% NaCl überführt und gemischt. Für die

weiteren Verdünnungsschritte wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  aus der vorherigen Verdünnung in das folgende Reagenzglas mit 4,5 mL 0,9% NaCl überführt und gemischt. Auf diese Weise erfolgte eine Verdünnung der Suspensionen auf bis zu  $10^{-7}$ . Aus den jeweils letzten drei Röhrchen einer Verdünnungsreihe wurden anschließend je 100  $\mu\text{L}$  entnommen und auf Petrischalen pipettiert. In jede Petrischale wurden nun 12,5 mL Schafsblutagar pipettiert und die Schalen anschließend geschwenkt, um eine gute Durchmischung der Suspension mit dem Agar zu erreichen. Auf diese Weise wurden von jeder zu untersuchenden Verdünnung zwei Ausplattierungen angefertigt. Nach Erstarren des Agars wurden die Petrischalen 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien, welche durch ihren Hämolysehof deutlich zu erkennen und gut von eventuellen Kontaminationen zu unterscheiden sind, ausgezählt und der Mittelwert von den zwei jeweils zusammengehörenden Platten gebildet. Dieser Versuch wurde für jedes Isolat drei mal durchgeführt. Durch Hochrechnen auf die Bakterienkonzentration in der Ausgangssuspension konnte nun die geeignetste Verdünnung bestimmt und für die folgenden Versuche herangezogen werden.

### **3.2.2 Zytokinmessung**

Das Ansetzen der Zellkulturen, die Stimulation, Fixierung, Permeabilisierung sowie die Färbung der Zellen erfolgten wie von Schultz 2003 beschrieben [218].

#### **Zellkultur**

Das im Kreißsaal entnommene Nabelschnurblut wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen aufbewahrt, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden weiterverwendet [219]. Zunächst erfolgte die Messung der Leukozytenzahl mit Hilfe des Analysegeräts ABX Micros 60. Das einzusetzende Blutvolumen wurde so berechnet, dass pro Ansatz  $5 \times 10^6$  Leukozyten eingesetzt wurden. Anschließend wurde das errechnete Blutvolumen in den Wells einer 24-Well-Platte in dem wie in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Medium suspendiert. Dabei wurde das Volumen des Mediums so gewählt, dass das Gesamtvolumen pro Well, bestehend aus Blut, Medium und Stimulanz, 1,5 mL betrug.

## **Stimulation**

Die Stimulation erfolgte mit 33  $\mu\text{L}$  bzw. 330  $\mu\text{L}$  einer zuvor am Photometer eingestellten GBS Suspension. Des Weiteren wurde stets als positive Kontrolle ein Ansatz mit 50  $\mu\text{L}$  LPS-Lösung (siehe Abschnitt 3.1.6) stimuliert sowie eine unstimulierte Probe als negative Kontrolle angesetzt. Diese Ansätze wurden mit Hilfe einer 1000  $\mu\text{L}$  Pipette durch wiederholtes Aufziehen und Ausstoßen gemischt und eine Minute ruhen gelassen. Anschließend wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  der in Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Monensin-Lösung, welche eine Inhibierung der Zytokinsekretion bewirkt, zugegeben und erneut gut gemischt. Nun erfolgte eine vierstündige Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Um die von uns gewählte vierstündige Inkubationszeit als sinnvoll zu verifizieren, wurden einige Messungen nach halbstündiger, einstündiger und zweistündiger Inkubationszeit durchgeführt.

## **Fixierung der Zellen**

Nach der Inkubation wurden die Wells mit PBS aufgefüllt. Die Zellsuspensionen wurden in 15 mL-Falcon-Röhrchen überführt, welche wiederum mit PBS aufgefüllt wurden. Die Suspensionen wurden gemischt und 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde auf jedes Röhrchen 1 mL der PFA-Lösung (siehe Abschnitt 3.1.7) gegeben, gründlich gemischt und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation über 10 Minuten mit 1200 Umdrehungen pro Minute und Absaugen des Überstandes wurde auf jedes Röhrchen 1 mL der in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen Magermilch-Lösung gegeben. Die Zellen wurden nun mit Transferpipetten aufgewirbelt und diese Suspensionen über Nacht bei 4 °C gelagert.

## **Permeabilisierung der Zellen**

Am folgenden Tag wurden die Suspensionen erneut 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Nachdem auf jedes Röhrchen 1 mL Saponin-Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.1.8), welcher die Permeabilisierung der Zellmembran und der Membranen des endoplasmatischen Retikulums sowie des Golgi-Apparats bewirkt, damit die monoklonalen Antikörper ins Zellinnere gelangen können, pipettiert und die Zellen mit diesem vermischt worden waren, wurden die Röhrchen für 10 Minuten bei 4 °C aufbewahrt und waren nun für die weitere

Verwendung bereit.

### **Färbung der Zellen**

Je 200  $\mu\text{L}$  Zellsuspension wurden nun in Durchflusszytometrie-Röhrchen pipettiert, welche 5  $\mu\text{g}$ , mit dem Fluoreszenzfarbstoff PC5 konjugierte, anti CD14 Antikörper, die als Oberflächenmarker für die zu untersuchenden Monozyten dienten, sowie entweder je 0,5  $\mu\text{g}$  mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte anti IL-6 und anti IL-8 oder anti TNF $\alpha$  Antikörper enthielten. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 4 °C wurde je 1 mL Saponin-Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.1.8) in die Röhrchen gegeben und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 0,5 mL PBS in jedes Röhrchen pipettiert. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

### **Isotypkontrolle**

Parallel zu den Ansätzen mit den konjugierten Antikörpern wurden zusätzlich je 200  $\mu\text{L}$  der gleichen Zellsuspensionen in Durchflusszytometrie-Röhrchen pipettiert, welche sowohl 5  $\mu\text{g}$  PC5 konjugierte anti CD14 Antikörper als auch unkonjugierte anti IL-6 und IL-8 bzw. anti TNF $\alpha$  Antikörper enthielten. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 4 °C wurde je 1 mL Saponin-Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.1.8) in die Röhrchen gegeben und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und entweder je 0,5  $\mu\text{g}$  mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte anti IL-6 und anti IL-8 oder anti TNF $\alpha$  Antikörper hinzugegeben. Nach einer weiteren 20 minütigen Inkubation wurde je 1 mL Saponin-Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.1.8) in die Röhrchen pipettiert und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 0,5 mL PBS in jedes Röhrchen pipettiert. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Eine Inkubation mit unkonjugierten Antikörpern, wie wir sie zur Isotypkontrolle vorgenommen haben, bewirkt eine komplette spezifische Blockierung der zu untersuchenden Antigene, so dass bei der anschließenden Inkubation mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern für diese keine Bindungsstellen mehr zur Verfügung stehen. Auf diese Weise kann eine unspezifische Antikörperbindung ausgeschlossen und die Hinter-

grundfluoreszenz (beispielsweise durch Antigen-negative Zellen oder Detritus) vor der Messung der gefärbten Antigene definiert werden.

## **Messung**

Die Messung der Proben erfolgte anschließend mit dem Durchflusszytometer FACS Canto<sup>TM</sup> und der BD FACSDiva<sup>TM</sup> Software, Version 4.0. Aus jeder Probe wurden 2000 CD14 positive Monozyten untersucht. Hierzu wurde im FSC/SSC-Streudiagramm (*forward-scatter, side-scatter*) eine Schleuse um die Monozytenpopulation und in einem SSC/CD14 PC5-Streudiagramm eine Schleuse um die CD14 positiven Zellen gelegt. Die Darstellung und Auswertung der IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  Produktion der Monozyten erfolgte sowohl mittels CD14 PC5/IL-6 FITC, CD14 PC5/IL-8 PE und CD14 PC5/TNF $\alpha$  FITC Streudiagramm als auch mittels Histogrammen (siehe Abbildungen 6.1, 6.2 und 6.3 im Anhang).

Bei den mit unkonjugierten Isotypkontroll-Antikörpern inkubierten Proben wurden die Schleusen in den einzelnen Dotplots und Histogrammen so gewählt, dass sich maximal 2% der Zellen im rechten oberen Quadranten (bei Dotplots) bzw. auf der rechten Seite (bei Histogrammen) befanden (siehe Abbildung 6.1 im Anhang). In den Proben, die lediglich mit konjugierten Antikörpern inkubiert worden waren, wurden nun alle gemessenen Ereignisse, welche sich im rechten oberen Quadranten bzw. auf der rechten Seite befanden als Zytokin positiv definiert.

### **3.2.3 Wachstum und Überleben in verschiedenen Medien**

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden wie in Abschnitt 3.2.2 beschriebene Ansätze mit Nabelschnurblut, RPMI 1640 und 330  $\mu$ L GBS-Suspension verwendet. Zusätzlich verwendeten wir statt des Nabelschnurbluts Blut von erwachsenen Blutspendern sowie PMNs aus dem Blut erwachsener Spender. Die Isolation der PMNs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Herstelleranweisung. Hierfür wurden 3 mL Ficoll-Paque Premium in ein 10 mL Röhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte das vorsichtige Aufbringen der jeweiligen Blutprobe, welche zuvor 1:1 mit einer Salzlösung verdünnt worden war. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 400 x g wurde das nun zuoberst befindliche Plasma, die Monozyten sowie der Dichtegradient abpipettiert und verworfen. Nun wurde die dünne Granulozytenschicht vorsichtig abpipettiert

und stand nach einem Lyseschritt zur Lysierung von Erythrozyten sowie zwei Waschsritten mit Salzlösung zur weiteren Verwendung zur Verfügung. Es wurden  $5 \times 10^6$  PMN eingesetzt. Als Kontrolle wurde stets ein Ansatz nur mit Medium und GBS-Suspension angesetzt. Zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten wurden den Ansätzen je 100  $\mu\text{L}$  entnommen, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, einer 1:10 Verdünnungsreihe unterzogen und mit Schafsblutagar ausplattiert. Zwischen den Entnahmezeitpunkten wurden die Ansätze bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 Umdrehungen pro Minute im Schüttelinkubator inkubiert. Das Bebrüten und Auszählen der Ausplattierungen erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

### **3.2.4 Galectin 3 Messung**

#### **Zellkultur**

Die Handhabung des Nabelschnurblutes sowie die Berechnung der einzusetzenden Menge erfolgte wie bereits im Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Das errechnete Blutvolumen wurde in den Wells einer 6-Well-Platte in dem wie in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Medium suspendiert. Dabei wurde das Volumen des Mediums so gewählt, dass das Gesamtvolumen pro Well, bestehend aus Blut, Medium und Stimulanz, 5 mL betrug.

#### **Stimulation**

Die Stimulation erfolgte mit 33  $\mu\text{L}$  bzw. 330  $\mu\text{L}$  von zuvor am Photometer eingestellten GBS Suspensionen der Stämme 34 und 63 als Repräsentanten der Sepsis- bzw. Besiedlungsstämme. Des Weiteren wurde stets eine unstimulierte Probe als negative Kontrolle angesetzt. Mit Hilfe einer 1000  $\mu\text{L}$  Pipette wurden die Ansätze durch wiederholtes aufziehen und ausstoßen gemischt. Dann erfolgte die Inkubation über 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

Nach der Stimulation wurden die Überstände vorsichtig aufgenommen, in ein Eppendorfhütchen überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung aufbewahrt.

#### **Messung**

Vor der weiteren Verwendung wurden die gefrorenen Überstände aufgetaut und anschließend kurz zentrifugiert. Die Messung erfolgte mittels ELISA mit einem kommer-

ziellen Kit nach Protokoll des Herstellers. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Die optische Dichte wurde photometrisch mit Hilfe des ELISA reader Spectra Classic bei 405 nm ermittelt und gegen eine Standardkurve aufgetragen. Die durchschnittliche minimale detektierbare Dosis des Assays betrug 0,016 ng/mL.

### **3.2.5 Datenanalyse**

Die Analyse verbundener Stichproben erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Der Mann-Whitney U-Test wurde für die statistische Analyse der unverbundenen Stichproben zum Vergleich aller mit Sepsis- und aller mit Besiedlungsisolaten stimulierten Ansätze angewendet. Spearmans Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$  wurde für die Korrelation zwischen Gestationsalter und Galectin 3 Spiegeln berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

### **3.2.6 Ethikvotum**

Gegen die Untersuchung gab es von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck keine Einwände (Ethikvotum 05-115).

# 4 Ergebnisse

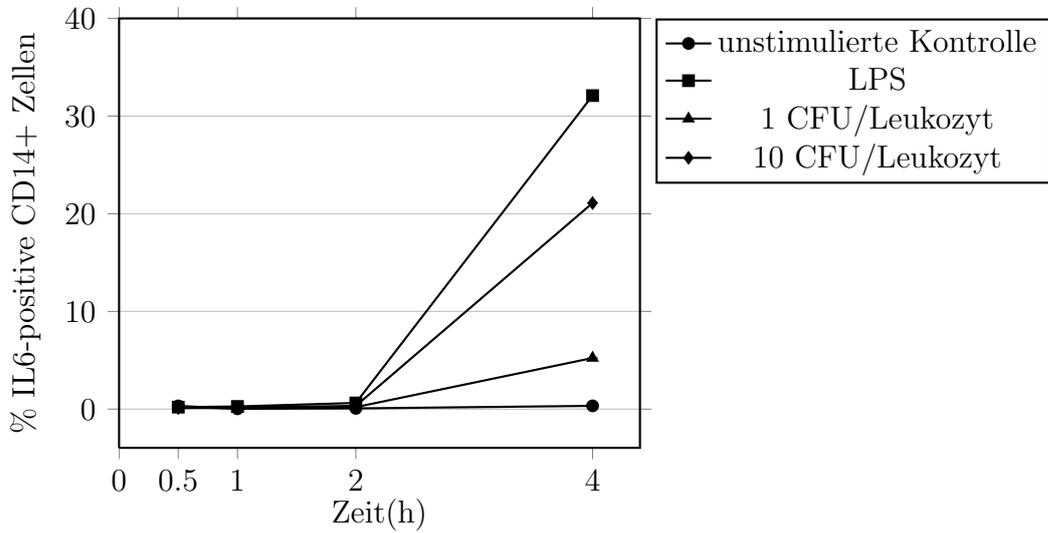
## 4.1 Etablierung des *in vitro* Sepsis Modells

### 4.1.1 Stimulationsdauer

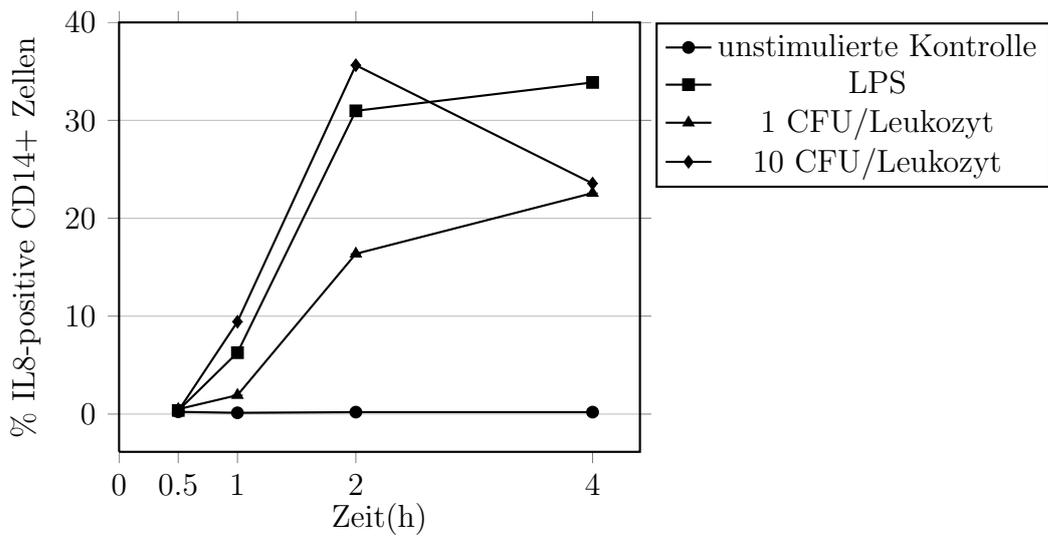
Zur Etablierung des *in vitro* Sepsis Modells galt es zunächst, eine sinnvolle Stimulationsdauer zu ermitteln, welche bei den folgenden Versuchen verwendet werden sollte. Die Stimulation der Monozyten erfolgte hierfür im Vollblutassay mit 0,1% LPS Lösung bzw. mit GBS Suspensionen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 CFU/Leukozyt und 10 CFU/Leukozyt). Als Kontrolle wurde stets eine unstimulierte Probe mit angesetzt. Die Messungen erfolgten nach einer halben, einer, zwei und vier Stunden Inkubationszeit. Für IL-6 (siehe Abbildung 4.1a) zeigte sich bei allen stimulierten Proben nach vier Stunden Inkubation eine deutliche Steigerung der Produktion, während zu den übrigen Zeitpunkten keinerlei Produktion nachweisbar war. Für TNF $\alpha$  sowie IL-8 (Abbildung 4.1b und c) war bereits nach einstündiger Stimulation eine Produktion nachweisbar. Bei der mit LPS sowie bei der mit 1 CFU/Leukozyt stimulierten Probe war der Anteil der IL-8 bzw. TNF $\alpha$  produzierenden Zellen während der gesamten Stimulationsdauer ansteigend, während die Produktion bei Stimulation mit 10 CFU/Leukozyt nach zwei Stunden ein Maximum erreichte und anschließend wieder abnahm.

### 4.1.2 Stimulus

Die Nabelschnurblutproben wurden jeweils mit 0,1% LPS Lösung als bekanntem starken TLR Agonist bzw. mit GBS Suspensionen in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 CFU/Leukozyt und 10 CFU/Leukozyt) stimuliert. Zusätzlich wurde stets eine unstimulierte Probe angesetzt. Wie Abbildung 4.2 beispielhaft für Stamm 281 zeigt, war die



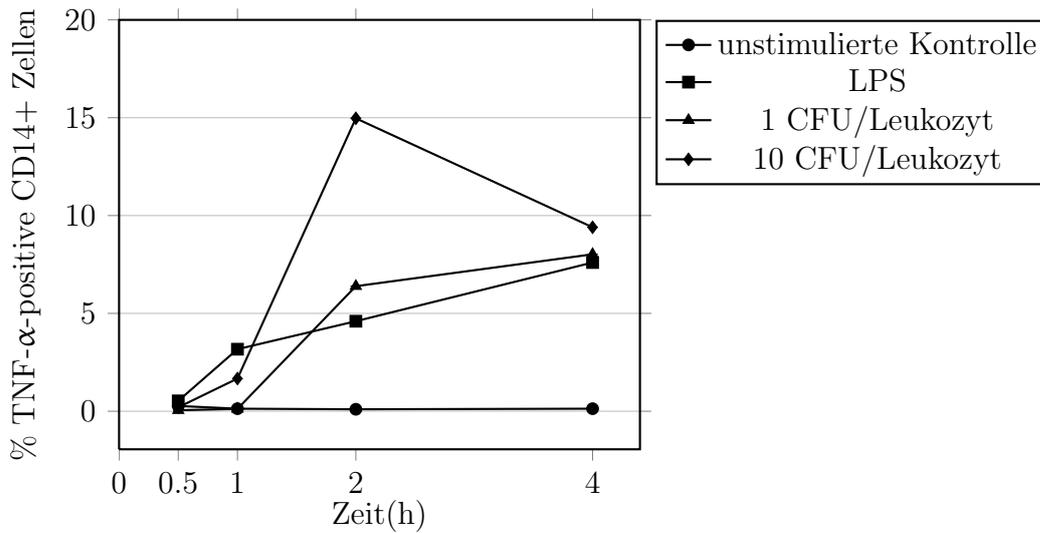
(a)



(b)

**Abbildung 4.1**

Anteil Zytokin-positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Darstellung der Mittelwerte. n = 3.



(c)

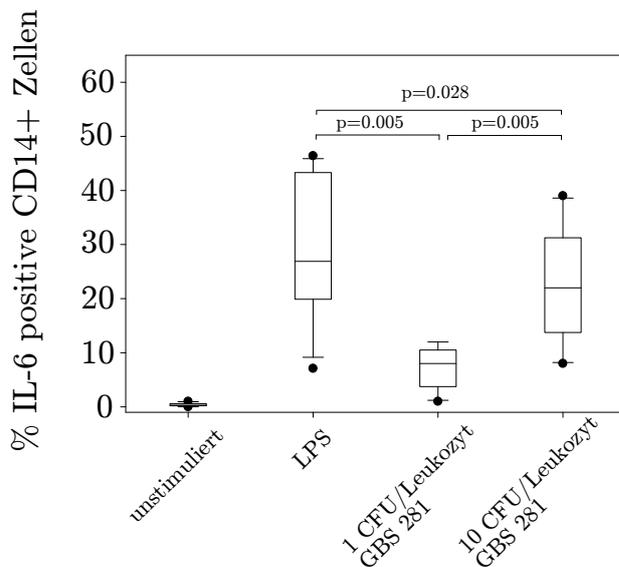
**Abbildung 4.1**

Anteil Zytokin-positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Darstellung der Mittelwerte. n = 3.

Interleukin 6 Produktion im Gegensatz zur mit LPS stimulierten Probe ( $26,9 \pm 10,4\%$ ) signifikant niedriger bei Stimulation mit Gruppe B Streptokokken (1 CFU/Leukozyt:  $8,5 \pm 3,5\%$ ,  $p=0,005$ ; 10 CFU/Leukozyt:  $22,3 \pm 10,3\%$ ,  $p=0,028$ ). Desweiteren war die Interleukin 6 Produktion bei Stimulation mit zehn CFU pro Leukozyt signifikant höher im Gegensatz zur Stimulation mit einer CFU pro Leukozyt ( $p=0,005$ ). Dieses Stimulationsverhalten ist repräsentativ für die anderen untersuchten Zytokine Interleukin 8 und TNF $\alpha$ .

## 4.2 Vergleich von Besiedlungs- und Sepsisisolaten

Um die Auswirkung der Besiedlungs- und Sepsisisolaten auf die Zytokinproduktion vergleichen zu können, wurde Nabelschnurblut mit den sechs Besiedlungs- respektive den sieben Sepsisstämmen stimuliert. Die Stimulation erfolgte sowohl mit einer niedrigen Dosis von einer Kolonie bildende Einheit pro Leukozyt als auch mit einer hohen Dosis von zehn Kolonie bildenden Einheiten pro Leukozyt. Eine unstimulierte Probe wurde als Kontrolle stets mit angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 4.3 und 4.4 dargestellt. Bei Betrachtung aller Messwerte ergaben sich keine signifikanten Un-



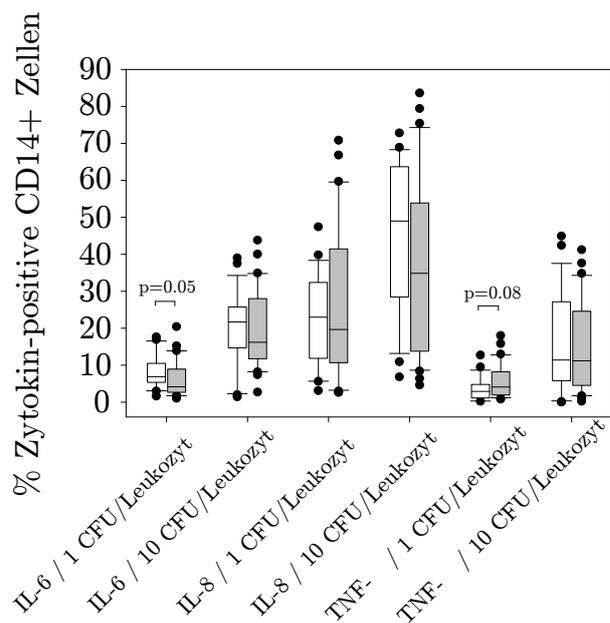
**Abbildung 4.2**

Anteil IL-6 positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit vom Stimulus. Darstellung als Box-Whisker-Plots mit Median, oberem und unterem Quartil, sowie 95% Konfidenzintervall. Ausreißer sind als Punkte dargestellt. n = 10.

terschiede zwischen der Stimulierbarkeit von Nabelschnurblut mit Besiedlungs- oder Sepsisstämmen (Abbildung 4.3). Beim Vergleich der Stämme 63 (Sepsis), 83 (Sepsis) und 81 (Besiedlung) hingegen fanden sich verschiedene statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 4.4). Die Produktion von Interleukin 6 war bei Stimulation mit Stamm 63 (1 CFU/Leukozyt:  $3,4 \pm 5,8\%$ ; 10 CFU/Leukozyt: Median:  $12,1 \pm 11,4\%$ ) signifikant höher als bei Stimulation mit der entsprechenden Dosis von Stamm 83 (1 CFU/Leukozyt:  $2,6 \pm 4,2\%$ ,  $p=0,02$ ; 10 CFU/Leukozyt:  $9,7 \pm 8,7\%$ ,  $p=0,01$ ). Im Vergleich zum Besiedlungsisolat ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung der TNF $\alpha$  Produktion zeigte sich eine signifikant höhere Produktion bei Stimulation mit einer CFU pro Leukozyt von Stamm 63 ( $8,0 \pm 5,2\%$ ) im Gegensatz zu Stamm 81 ( $4,0 \pm 3,3\%$ ,  $p=0,037$ ). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich bei der Interleukin 8 Produktion.

### 4.3 Vergleich mütterlicher und kindlicher Isolate

Neben den ausschließlich kindlichen Sepsis- und Besiedlungsisolaten wurden außerdem Paar-Isolate von erkrankten Kindern und deren Müttern als Stimulantien eingesetzt



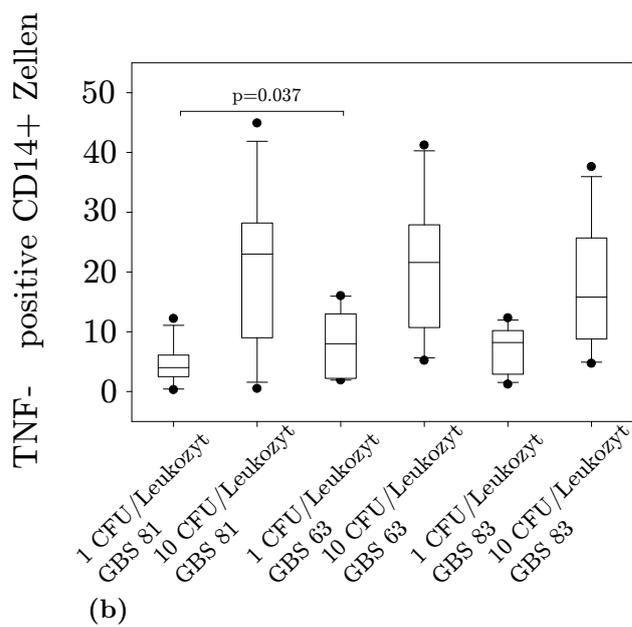
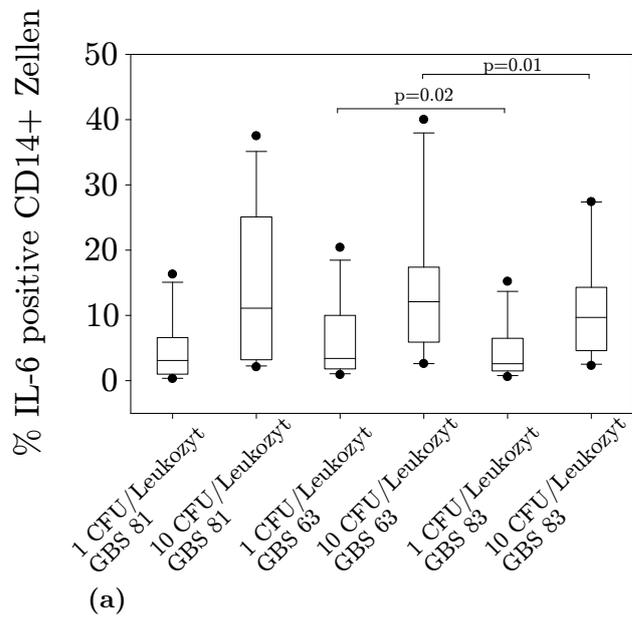
**Abbildung 4.3**

Anteil Zytokin-positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit vom Stimulus. Zusammenfassende Darstellung aller Stimulationsansätze. Box-Whisker-Plot mit Median, unterem und oberem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Darstellung der Ausreißer als Punkte. Grau: Sepsisolate (n = 30), Weiß: Besiedlungsisolate (n = 25).

und ihre Auswirkung auf die Zytokinproduktion der Monozyten im Vollblutassay miteinander verglichen. Wie Abbildung 4.5 zeigt, ergaben sich bei Stimulation mit einer CFU pro Leukozyt sowohl in der Interleukin 6 als auch Interleukin 8 Produktion signifikante Unterschiede zwischen Isolat 282 ( $6,7 \pm 3,7\%$  für IL-6 und  $18,0 \pm 10,3\%$  für IL-8) und 283 ( $9,8 \pm 4,2\%$ ,  $p=0,005$  für IL-6 und  $20,0 \pm 15,7\%$  für IL-8,  $p=0,09$ ).

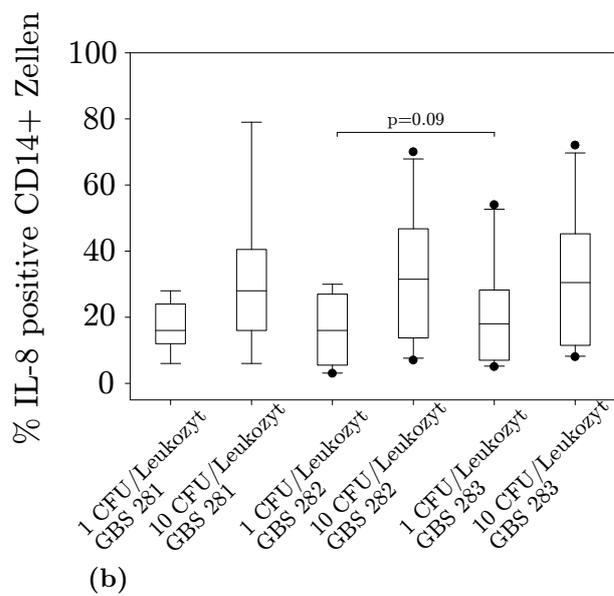
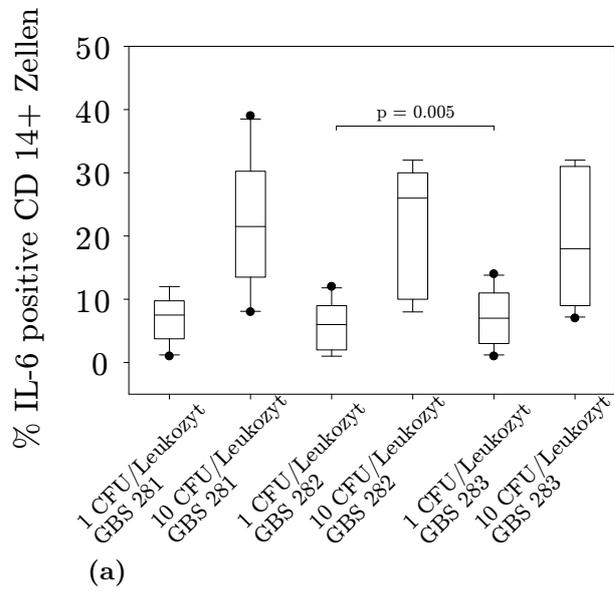
## 4.4 Wachstum und Überleben in verschiedenen Medien

Um das Wachstumsverhalten bzw. Überleben der Gruppe B Streptokokken in Spenderblut, Nabelschnurblut und in Anwesenheit von PMNs aus Spenderblut zu untersuchen, wurden Gruppe B Streptokokken Suspensionen zu entsprechenden Ansätzen gegeben und die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten zum Startzeitpunkt, nach 30 Minuten und nach 60 Minuten gemessen. Als Kontrolle wurde stets eine Probe mit RPMI Medium mit angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 graphisch dargestellt. Während im Ansatz mit RPMI Medium die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten nach 60 Mi-



**Abbildung 4.4**

Anteil IL-6 bzw. TNF $\alpha$ -positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit vom Stimulus. Vergleich des Besiedlungsisolats 81 mit den Sepsisisolaten 63 und 83. Box-Whisker-Plot mit Median, unterem und oberem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Darstellung der Ausreißer als Punkte. n = 11.



**Abbildung 4.5**

Anteil IL-6 und IL-8-positiver CD14<sup>+</sup> Zellen in Prozent in Abhängigkeit vom Stimulus. Vergleich der mütterlichen und kindlichen Isolate 281, 282 und 283. Box-Whisker-Plot mit Median, unterem und oberem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Darstellung der Ausreißer als Punkte. n = 11.

nuten bei den meisten Keimen noch über 50% des Ausgangswertes lag, zeigte sich in Anwesenheit phagozytischer Zellen, also entweder Nabelschnurblut, Spenderblut oder PMNs, bei allen getesteten Keimen eine Abnahme der Kolonie bildenden Einheiten auf deutlich unter 50% des Ausgangswertes oft bereits nach 30 Minuten.

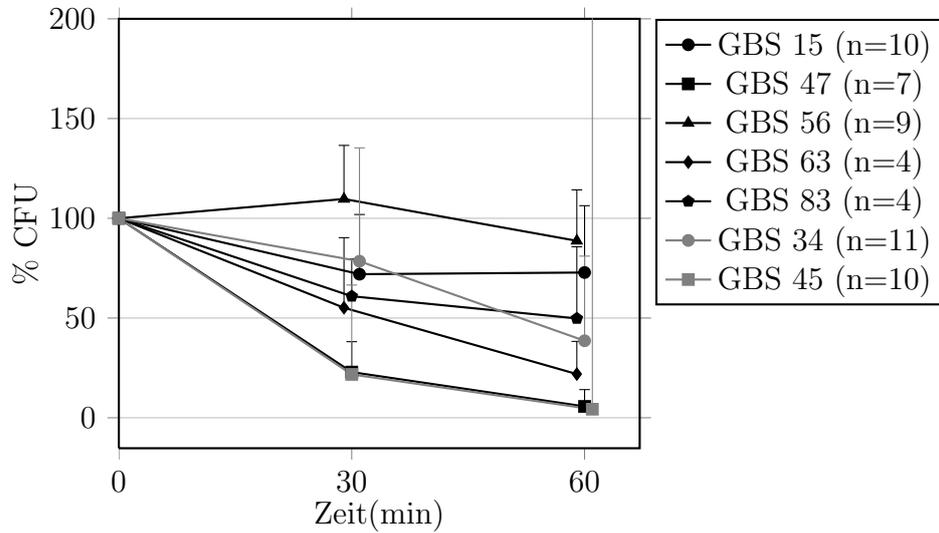
## 4.5 Galectin 3

Im Vollblutassay wurde unstimuliertes Nabelschnurblut Früh- und Neugeborener inkubiert. Des Weiteren erfolgte die Stimulation von Nabelschnurblut reifer Neugeborener mit dem Besiedlungsstamm 34 bzw. dem Sepsisstamm 63. Dabei wurde jeweils eine Probe mit einer CFU pro Leukozyt und eine Probe mit zehn CFU pro Leukozyt sowie eine unstimulierte Probe angesetzt. Nach 24-stündiger Bebrütung wurde aus den Kulturüberständen mittel ELISA die Galectin 3 Konzentration bestimmt.

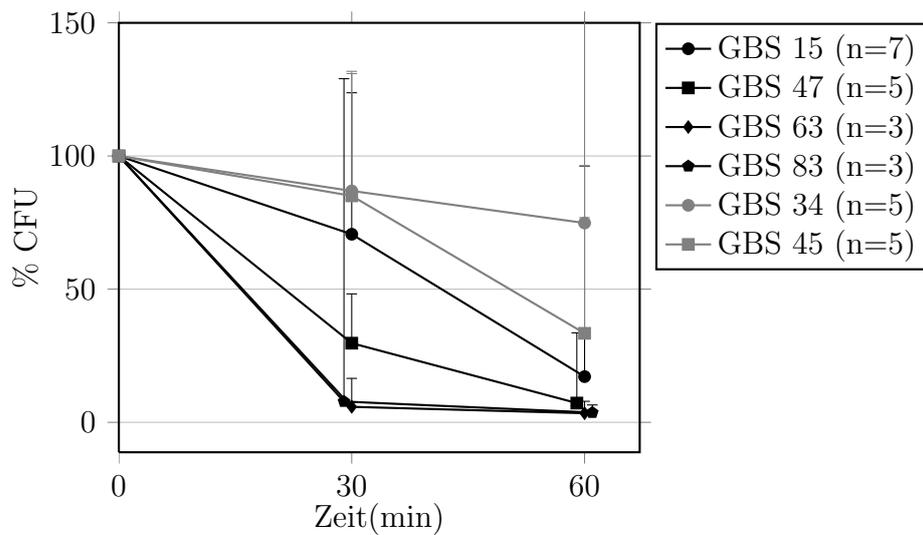
Wie aus Abbildung 4.7a ersichtlich ist, zeigten sich zwischen unterschiedlichen Gestationsaltergruppen signifikante Unterschiede in den Galectin 3 Konzentrationen der Zellkulturüberstände. Die Expression von Galectin 3 war sowohl in der Gruppe der vor der 28. Schwangerschaftswoche geborenen Frühgeborenen als auch in der Gruppe der Frühgeborenen, die zwischen der 30. und 35. Schwangerschaftswoche geboren wurden, signifikant niedriger als bei reifen Neugeborenen. Innerhalb der Gruppe der Frühgeborenen zeigte sich eine signifikant niedrigere Galectin 3 Expression bei Kindern unterhalb der 28. Schwangerschaftswoche im Gegensatz zu Kindern oberhalb der 28. Schwangerschaftswoche. Bei Betrachtung der gesamten Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation der Galectin 3 Konzentrationen mit dem Gestationsalter (Abbildung 4.7b).

Die Expression von Galectin-3 war im Nabelschnurblut von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Voigt Perzentile signifikant höher als im Nabelschnurblut der Frühgeborenen oberhalb dieser Schwelle (Abbildung 4.8) [242].

Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich ist, ist die Galectin 3 Produktion im Gegensatz zu allen anderen Proben bei mit zehn CFU Stamm 63 pro Leukozyt stimuliertem Nabelschnurblut ( $0,97 \pm 0,86$  ng/mL) signifikant höher als bei unstimuliertem Nabelschnurblut ( $0,66 \pm 0,55$  ng/mL,  $p=0,03$ ).



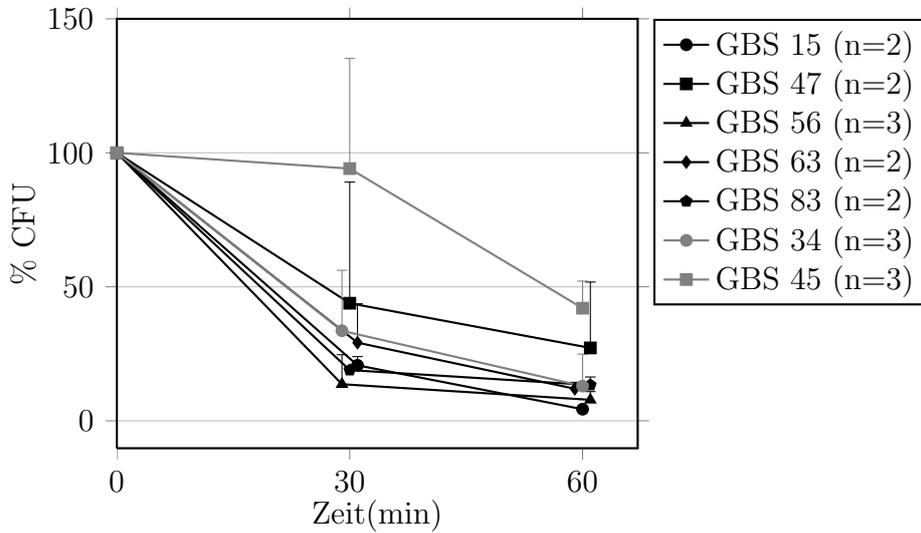
(a) Wachstumsverhalten in RPMI Medium



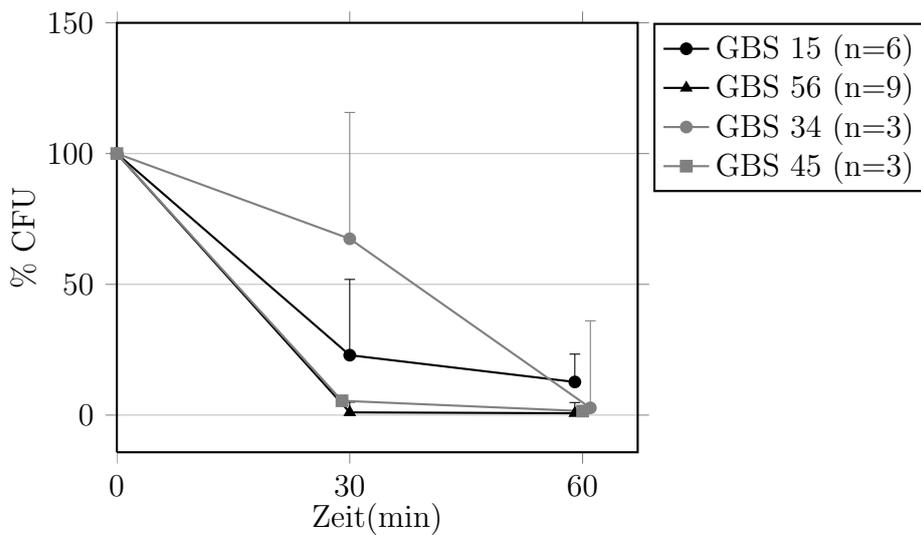
(b) Wachstumsverhalten in Nabelschnurblut

**Abbildung 4.6**

Mediane und einseitige Standardabweichung der Veränderung der Kolonie bildenden Einheiten (CFU) in Abhängigkeit von der Zeit. Schwarz: Sepsisstämmen, Grau: Besiedlungsstämmen. Zur besseren Übersicht sind dicht beieinander liegende Punkte leicht versetzt abgebildet.



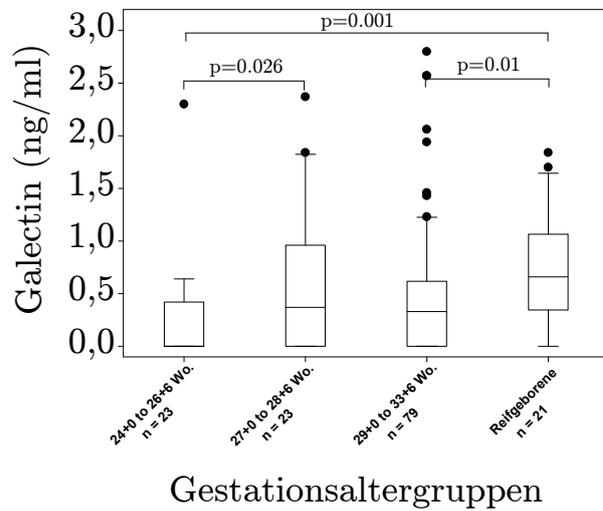
(c) Wachstumsverhalten in Spenderblut



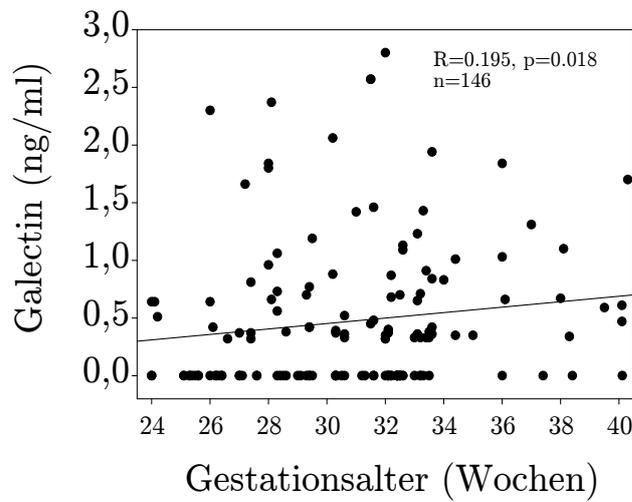
(d) Wachstumsverhalten mit PMN

**Abbildung 4.6**

Mediane und einseitige Standardabweichung der Veränderung der Kolonie bildenden Einheiten (CFU) in Abhängigkeit von der Zeit. Schwarz: Sepsisstämme, Grau: Besiedlungsstämme. Zur besseren Übersicht sind dicht beieinander liegende Punkte leicht versetzt abgebildet.



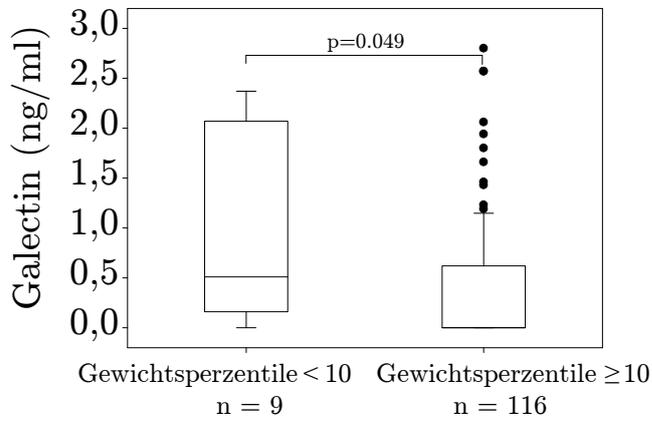
(a)



(b)

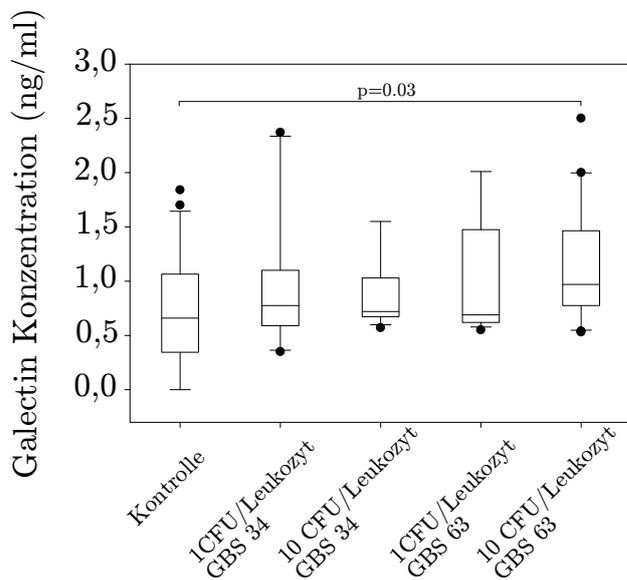
**Abbildung 4.7**

Galectin-3 Spiegel in Abhängigkeit von Gestationsaltergruppen als Box-Whisker-Plots mit median, oberem und unterem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Ausreißer sind als Punkte dargestellt. In Abbildung 4.7b sind die Daten als Streudiagramm dargestellt. Spearman's correlation coefficient (R) wurde berechnet.



**Abbildung 4.8**

Galectin-3 Spiegel bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht dargestellt als Box-Whisker-Plots mit oberem und unterem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Ausreißer sind als Punkte dargestellt.



**Abbildung 4.9**

Galectin 3 Konzentration in Abhängigkeit vom Stimulus. Box-Whisker-Plot mit Median, unterem und oberem Quartil sowie 95% Konfidenzintervall. Darstellung der Ausreißer als Punkte. n = 21.

## 5 Diskussion

Die Bedeutung von Gruppe B Streptokokken als wichtiger humanpathogener Infektionserreger blieb lange Zeit unerkannt. Nachdem bereits Anfang der dreißiger Jahre durch mehrere Wissenschaftler Gruppe B Streptokokken aus dem Nasen- Rachenraum erwachsener Menschen bzw. aus Vaginalabstrichen schwangerer Frauen isoliert [139][93][192][143] und Mitte bis Ende des selben Jahrzehnts mehrere Fälle von durch GBS verursachtem, teilweise tödlich verlaufendem Kindbettfieber beschrieben worden waren [46][80], erschienen in den folgenden Jahrzehnten lediglich sporadische Berichte über Infektionen. Es dauerte schließlich drei Jahrzehnte bis sich in den sechziger Jahren Publikationen über maternale und neonatale Fälle häuften [103][67][33]. Schließlich etablierten mehrere Berichte im Jahr 1973 die Erkenntnis über Gruppe B Streptokokken als den für Neugeborene im Alter bis zu drei Monaten wesentlichsten Infektionserreger [10][14][78][166]. Mitte der 80er Jahre wurde gezeigt, dass eine intrapartale antibiotische Prophylaxe das Risiko einer Kolonisierung und einer Bakteriämie des Neugeborenen, signifikant senken kann [29]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in den 90er Jahren weltweit Leitlinien zur Antibiotikaprofylaxe etabliert, wobei im Wesentlichen zwei Ansätze, risikobasiert und screeningbasiert, diskutiert wurden. Inzwischen hat sich die screeningbasierte Methode, bei der alle Schwangeren zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche mittels Vaginal- und Rektalabstrich auf Gruppe B Streptokokken untersucht werden, als effektiver durchgesetzt und wird in vielen Ländern praktiziert [214][85]. Nach Einführung von Leitlinien zur Antibiotikaprofylaxe ist die Inzidenz der invasiven Gruppe B Streptokokken Erkrankung in den USA von 1,8 Fällen pro tausend Lebendgeburten um etwa 70% auf 0,5 Fälle pro tausend Lebendgeburten gesunken und konnte bis heute noch weiter gesenkt werden [214][40]. Dabei spiegeln diese Zahlen die Abnahme der Inzidenz der *early onset disease* wider, während die Inzidenz der *late onset disease* stabil geblieben ist. Dies verdeutlicht die Relevanz der horizontalen Übertragung bei der *late onset disease*. Die Inzidenz in Deutschland liegt

mit 0,47 pro tausend Lebendgeburten in einer ähnlichen Größenordnung. Trotz dieser Fortschritte zählt *Streptococcus agalactiae* noch immer zu den häufigsten Erregern der *early onset sepsis* und trägt mit seinen überwiegend neurologischen Folgeerkrankungen, die beinahe 15% der erkrankten Kinder betreffen, erheblich zur Morbidität bei Neugeborenen bei [75].

Unzählige Studien haben in den letzten 20 Jahren dazu beigetragen, *Streptococcus agalactiae* mit seinen Virulenzfaktoren sowie das Geschehen im Rahmen der Sepsis besser zu verstehen. Nichtsdestoweniger ist das Verständnis der Pathogenese zu großen Teilen noch immer sehr limitiert. Beispielsweise ist nach wie vor unklar, warum ausgerechnet Gruppe B Streptokokken so häufig auf Neugeborene übertragen werden, obwohl der Geburtskanal mit zahlreichen anderen Keimen besiedelt ist und warum nur ein Teil der besiedelten Kinder erkrankt. Auch neue antimikrobielle Medikamente oder Schutzimpfungen stehen trotz intensiver Bemühungen nach wie vor nicht zur Verfügung.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse beruhen auf einem *in vitro* Sepsis Modell, welches, standardisierte Bedingungen gewährleistet, jedoch nie die tatsächliche Komplexität immunologischer Vorgänge komplett wiedergeben kann, so dass die auf diese Weise gewonnenen Erkenntnisse auch unter diesem Gesichtspunkt interpretiert werden müssen. Bisher sind bereits verschiedene *in vitro* Sepsis Modelle zur Untersuchung der Gruppe B Streptokokken Sepsis beschrieben worden. Häufig wurden in diesen Assays einzelne Zellpopulationen wie Lymphozyten oder Monozyten aus dem Vollblut separiert und mit hitzeinaktivierten oder vitalen Keimen stimuliert, doch auch ein Vollblutassay wurde beschrieben, in dem allerdings hitzeinaktivierte Keime verwendet wurden [17][176][190]. Allein die Separation von Monozyten aus dem Vollblut jedoch kann bereits einen Einfluss auf die Zytokinproduktion haben [89][104]. Mit der Stimulation von Vollblut durch vitale Keime, wie es in dieser Arbeit gemacht wurde, kommt man den Verhältnissen im lebenden Organismus wahrscheinlich näher, da die einzelnen Zellen in ihrem natürlichen Wirkungsgefüge verbleiben und die Keime aktiv mit den Wirtszellen interagieren können.

Die Messung der Zytokinproduktion erfolgte durchflusszytometrisch wie 2003 von Schultz beschrieben [218]. Diese gut etablierte Methode ermöglicht die Analyse der Zytokinproduktion auf Zellebene, ohne die Zellen zuvor aus dem Vollblut separieren zu müssen. Sie gilt als zuverlässig und sensitiv und ist schnell und einfach durchzuführen [123].

Der Galectin 3 Gehalt in den Zellkulturüberständen wurde für die vorliegende Arbeit mittels ELISA analysiert. Da es bisher keinerlei publizierte Daten über die Galectin 3 Ausschüttung während der Gruppe B Streptokokken Sepsis gibt, eignet sich diese Methode gut als Suchtest, welcher jedoch auch eine quantitative Bewertung zulässt. Eine Aussage darüber, welche Zellen im Nabelschnurblut Galectin 3 ausgeschüttet haben, kann jedoch nicht getroffen werden. Intrazelluläres Galectin 3 wird nicht erfasst.

Das *in vitro* Sepsis Modell wurde von Härtel et al. mit *Staphylococcus epidermidis* etabliert und konnte für die vorliegende Arbeit erfolgreich mit *Streptococcus agalactiae* als Stimulans verwendet werden [105]. Nach vierstündiger Stimulation konnte in diesem Vollblutassay eine dosisabhängige Stimulation mit vitalen Gruppe B Streptokokken erzielt werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zytokinantwort auf eine höhere Keimdosis. Während Berner et al. eine signifikant höhere Interleukin 6 Produktion bei Monozyten aus Nabelschnurblut nach Stimulation mit Gruppe B Streptokokken im Gegensatz zur Stimulation mit LPS zeigen konnte, deuten unsere Ergebnisse auf einen umgekehrten Zusammenhang hin (Abbildung 4.2) [19]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf den unterschiedlichen Versuchsbedingungen beruhen, da Berner et al. die Monozyten zunächst aus dem Nabelschnurblut isolierten und sie anschließend mit hitzeinaktivierten Keimen 24 Stunden inkubierten. Außerdem erfolgte die anschließende Analyse der Zytokinproduktion aus den Kulturüberständen mittel ELISA. Da bei *in vivo* Versuchen an erwachsenen Menschen für TNF $\alpha$  nach 60 bis 90 Minuten und für IL 6 und 8 nach 180 bis 240 Minuten nach LPS Stimulation maximale Serumspiegel gemessen wurden, wurde für die vorliegende Arbeit eine Stimulationsdauer von 240 Minuten gewählt [170][34][48][135]. Messungen nach 30, 60 und 120 Minuten zeigten für TNF $\alpha$  und IL-6, dass eine mit unserer Methode messbare Zytokinproduktion erst nach 240 Minuten erreicht war. Eine vermehrte IL-8 Produktion war bereits nach 60 Minuten messbar. Bei den mit LPS stimulierten Ansätzen erreichte diese nach 120 Minuten ihr Maximum und war nach 240 Minuten wieder abgefallen. Die mit GBS stimulierten Ansätze zeigten nach 240 Minuten eine maximale IL-8 Produktion. Die von uns ermittelte Kinetik der Zytokinproduktion stimmt also für IL-6 und IL-8 mit den *in vivo* Ergebnissen am Menschen überein, während das für TNF $\alpha$  nicht zutrifft. Diese Diskrepanz kann auf einer unterschiedlichen Kinetik bei Erwachsenen und Neugeborenen bzw. *in vivo* und *in vitro* zurückzuführen sein. Des Weiteren wurden bei den Messungen am lebenden Modell wahrscheinlich auch Zytokine anderer Zellen (z.B.

Endothelzellen) erfasst.

Beim Vergleich der Zytokinproduktion nach Stimulation mit Besiedlungs- bzw. Sepsisisolaten ergab sich kein eindeutiges Bild. Berner et al. zeigten 2001 in einem Stimulationsversuch mit acht Besiedlungs- und 14 Sepsisisolaten, dass die Sepsisolate eine signifikant höhere IL 6, IL 1 $\beta$  und IL 12p40 Produktion in Monozyten aus Nabelschnurblut bewirkten als die Besiedlungsisolate [17]. Bei Betrachtung aller Besiedlungs- und Sepsisolate ergab sich ein solcher Unterschied in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht. Keines der getesteten Zytokine wurde signifikant mehr oder weniger produziert, wenn die Stimulation mit Sepsis- respektive Besiedlungsisolaten erfolgte. Eine gute Vergleichbarkeit dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist durch die verschiedene Methodik limitiert. So isolierten Berner et al. die Monozyten vor der Stimulation aus dem Nabelschnurblut, hitzeinaktivierten die Keime, wählten eine Stimulationsdauer von 6 bzw. 24 Stunden und analysierten die Zytokinproduktion mittels PCR und ELISA. Bei Betrachtung der Ergebnisse einzelner Isolate hingegen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit verschiedene signifikante Unterschiede, welche allerdings sowohl zwischen verschiedenen Sepsisisolaten als auch zwischen einem Besiedlungs- und einem Sepsisolat auftraten. Insgesamt deuten unsere Daten darauf hin, dass die Zytokine Interleukin 6, Interleukin 8 und TNF $\alpha$  zwar eine wichtige Rolle im Geschehen der Gruppe B Streptokokken Sepsis spielen, die Ausprägung der IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  Antwort nach Stimulation mit GBS jedoch nicht generell mit der Virulenz korreliert. Vielmehr scheinen andere Faktoren, welche teils beim Wirt teils bei *Streptococcus agalactiae* liegen, für die Virulenz und das Eindringen in den Wirt verantwortlich zu sein.

Für diese Arbeit wurden neben Besiedlungs- und Sepsisisolaten auch die Isolate eines Neugeborenen mit denen seiner Mutter verglichen. Der mütterliche Keim stammt aus einem Vaginalabstrich, während die kindlichen Isolate aus dem Liquor bzw. aus einer Blutkultur isoliert wurden. Auch hier zeigte sich, dass die Ausprägung der Zytokinproduktion nicht mit der Virulenz korreliert, da der aus dem Vaginalabstrich isolierte Keim eine signifikant höhere Interleukin 6 Produktion induzierte als der aus der Blutkultur isolierte Keim. Andere signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Gruppe B Streptokokken, in Anwesenheit phagozytischer Zellen zu überleben, bzw. der Fähigkeit verschiedener phagozytischer Zellen, Gruppe B Streptokokken phagozytieren zu können, wurden die gleichen Ansätze, wie sie zur Zytokinmessung verwendet wurden, bestehend aus Blut, RPMI

Medium und GBS Suspension verwendet. Neben Nabelschnurblut wurde auch Blut erwachsener Blutspender sowie daraus isolierte PMNs verwendet. Als Kontrolle dienten Ansätze mit GBS Suspension und RPMI Medium. Zur Quantifizierung erfolgten Entnahmen und Ausplattierungen aus den Ansätzen zum Startzeitpunkt sowie nach 30 und 60 Minuten. Nach 24-stündiger Bebrütung ließen sich die Kolonie bildenden Einheiten durch den gut sichtbaren Hämolysehof leicht zählen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass Gruppe B Streptokokken sowohl in Nabelschnurblut als auch in Blut von Erwachsenen sowie in Anwesenheit isolierter Monozyten von Erwachsenen in Ihrer Zahl in einem vergleichbaren Ausmaß abnehmen. Dies deckt sich mit den Daten von Maródi, welcher in seiner Arbeit jedoch lediglich isolierte Granulozyten bzw. Monozyten aus Nabelschnurblut und von Erwachsenen und kein Vollblut verwendet hatte. Eine Aussage über die intrazelluläre Überlebensfähigkeit der Streptokokken, wie Maródi sie durch Lyse der phagozytierenden Zellen treffen konnte, ist durch die in dieser Arbeit verwendete Methode nicht möglich [162]. Eine verminderte Phagozytosefähigkeit durch phagozytierende Zellen Neugeborener, wie sie als ein Grund für die besondere Prädisposition Neu- und Frühgeborener für Infektionen postuliert wird, lässt sich also mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode und den daraus gewonnenen Daten nicht nachvollziehen. Unsere Daten zeigen außerdem, dass die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten in Anwesenheit phagozytierender Zellen bis auf wenige Ausnahmen bereits nach 30 Minuten deutlich unter 50% des Ausgangswertes fällt. Anschließend folgt eine langsamere Abnahme auf zumeist 25% bis 0%. Dies stimmt mit der Kinetik überein, welche Weihofen bei Verwendung der selben Stämme jedoch ausschließlich mit PMNs bzw. PMNs und gepooltem Serum ermittelte. Im Gegensatz zu Weihofens Ergebnissen, welche für die Besiedlungsisolate eine Abnahme der Kolonie bildenden Einheiten auf nahezu 0% bereits nach 30 Minuten zeigen, konnten wir jedoch keinen eindeutigen Unterschied zwischen Besiedlungs- und Sepsisisolaten feststellen [246]. Vereinzelte GBS Isolate zeigten in Blut ein besseres Überleben als in RPMI Medium, wobei die teilweise großen Standardabweichungen der Koloniezahlen eine vorsichtige Interpretation dieser Daten erfordern. Möglicherweise jedoch bietet Blut mit seinen Bestandteilen für einige GBS Stämme ein Milieu, welches trotz Anwesenheit phagozytierender Zellen ein gutes Überleben ermöglicht. Welche bakteriellen und Wirtsfaktoren in Interaktion ein gutes Überleben und eine Vermehrungsfähigkeit von Gruppe B Streptokokken und damit die Unterhaltung eines septischen Geschehens bedingen, muss Gegenstand zukünftiger

Untersuchungen sein.

Galectin 3, welches von praktisch allen immunkompetenten Zellen exprimiert werden kann, scheint bei diversen entzündlichen Ereignissen eine eher proinflammatorische Rolle zu spielen. Erhöhte Werte konnten sowohl bei infektiösen als auch autoimmunologischen entzündlichen Prozessen nachgewiesen werden. Es moduliert die Rekrutierung und Aktivierung von Abwehrzellen, die Produktion von Zytokinen, die Phagozytose und Apoptose. Bisher gibt es keine Studie, welche Galectin 3 Spiegel in Nabelschnurblut sowie die Rolle von Galectin 3 im Rahmen der Gruppe B Streptokokken Sepsis untersucht hat. Für die vorliegende Arbeit wurde Nabelschnurblut Früh- und Reifgeborener inkubiert. Zusätzlich wurde Nabelschnurblut Reifgeborener mit einem Besiedlungs- bzw. Sepsisisolat in zwei unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Galectin 3 Serumspiegel gesunder erwachsener Probanden liegen bei etwa 2 – 4 ng/mL und damit bei Reifgeborenen in einer gleichen Größenordnung, wie die von uns ermittelten Konzentrationen in den Zellkulturüberständen [79, 245]. Im menschlichen Embryo ist eine Galectin 3 Expression bereits im ersten Trimester in Epithelien nachweisbar, wo es vermutlich eine Rolle in der Zell-Zell-Interaktion sowie der Zelldifferenzierung wahrnimmt [31]. Daten über Galectin 3 in Nabelschnurblut allerdings existieren bisher nicht. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass Galectin 3 in Nabelschnurblut Früh- und Neugeborener sezerniert wird und dass es eine positive Korrelation zwischen dem Gestationsalter und der Höhe des Galectin 3 Spiegels gibt. Eine solche Korrelation konnte bereits für verschiedene Serumproteine gezeigt werden [108, 111, 82]. Bei Berücksichtigung der Effekte von extrazellulärem Galectin 3 auf das angeborene Immunsystem ist es denkbar, dass die verminderte Galectin 3 Expression bei Frühgeborenen zum Teil die im Vergleich zu reifen Neugeborenen oder Erwachsenen höhere Prädisposition für Infektionen bedingt. Eine Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erhobenen Daten mit Serumspiegeln ist durch die experimentellen Bedingungen jedoch limitiert. Interessanterweise zeigten sich im Nabelschnurblut von *small-for-gestational-age*-Frühgeborenen (SGA) höhere Galectin 3 Spiegel als bei Frühgeborenen mit einem altersentsprechenden Geburtsgewicht. SGA ist ein deskriptiver Ausdruck für Neugeborene, deren Geburtsgewicht unterhalb der 10. Gestationsalter bezogenen Perzentile liegt, ohne dabei auf die Ursachen einzugehen. Häufig liegt einem niedrigem Geburtsgewicht jedoch eine intrauterine Wachstumsrestriktion (*intrauterine growth restriction* bzw. IUGR) auf dem Boden maternaler, fetaler oder plazentarer Faktoren zu Grunde, welche das Wach-

tumspotenzial des Feten hemmen [83]. Eine intrauterine Wachstumsrestriktion wiederum kann viele Ursachen haben (u.a. mangelhafte Ernährung, Rauchen, Alkoholkonsum, Infektionen, Präeklampsie), welche schließlich zu einer chronischen Unterversorgung des Feten mit Nährstoffen und/oder Sauerstoff führen. Die Induktion einer Inflammation durch Hypoxie mit Hilfe von *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) und NF- $\kappa$ B ist ein gut belegtes Phänomen, welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Menschen demonstriert werden konnte (Literaturübersicht in [70]). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass Nabelschnurblut von SGA Frühgeborenen erhöhte Spiegel inflammatorischer Marker aufweist, was eine Aktivierung inflammatorischer Mechanismen auf dem Boden einer chronischen Hypoxie im Feten nahelegt [4]. Mehrere Studien konnten darüber hinaus eine Beteiligung von HIF-1 und NF- $\kappa$ B bei der Regulation der Galectin 3 Expression nachweisen [258, 88, 64]. Die in unserer Arbeit gemessenen Galectin 3 Werte bei SGA Frühgeborenen könnten also ein inflammatorisches Geschehen im Rahmen einer chronischen Hypoxie *in utero* widerspiegeln. Schließlich zeigen die gewonnenen Daten, dass sich die Galectin 3 Ausschüttung im Nabelschnurblut durch *Streptococcus agalactiae* induzieren lässt. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Galectin 3 Ausschüttung bewirkte allerdings lediglich das Sepsis isolat in der hohen Konzentration, was auf eine Beteiligung von Galectin 3 im Rahmen der Gruppe B Streptokokken Sepsis hindeutet. Neben den in der Einleitung ausgeführten Effekten auf die Zellen des angeborenen Immunsystems scheint Galectin 3 auch als Rezeptor für *Candida albicans* sowie Gram positive Bakterien zu fungieren [151, 77, 209]. Diverse Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Fortschritt bzw. der Ausdehnung einer Erkrankung und dem Galectin 3 Spiegel im Serum nachweisen. Beispielsweise haben Krebspatienten im fortgeschrittenem Stadium höhere Galectin 3 Spiegel gegenüber Patienten mit einer weniger fortgeschrittenen Erkrankung bzw. als gesunde Probanden [109]. Die in dieser Studie gewonnenen Daten könnten auf eine virulenzabhängige Regulation der Galectin 3 Expression hindeuten, beispielsweise um bei Kontakt mit einem sehr virulenten Keim eine stärkere Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu erreichen als es für einen weniger virulenten Stamm nötig wäre. Sowohl Virulenzfaktoren, welche eine Galectin 3 Sekretion bewirken als auch die Funktion von Galectin 3 im Rahmen einer Sepsis müssen durch weitere Untersuchungen definiert werden. Des Weiteren muss eine möglicherweise vermehrte Freisetzung intrazellulären Galectin 3 durch vermehrten Zelltod nach Kontakt mit einem Sepsis isolat im Gegensatz zu einem Besiedlungs isolat

in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass sämtliche getestete Gruppe B Streptokokken Isolate unabhängig von ihrer klinischen Manifestation potente Induktoren proinflammatorischer Zytokine sind und somit imstande sind, ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) auszulösen. Der tatsächliche klinische Verlauf hängt einerseits von wirtsspezifischen andererseits von noch zu definierenden Faktoren der Streptokokken ab. Maßgebliche wirtsspezifische Faktoren sind die Keimdichte, mit welcher der Fetus konfrontiert wird, sowie die Kontaktzeit zwischen Fetus und Keim. Jeder mütterliche Keimnachweis während der Schwangerschaft stellt somit ein Risiko für den Fetus bzw. das Neugeborene dar und sollte prophylaktische Maßnahmen veranlassen. Eine horizontale Übertragung ist für *S. agalactiae* beschrieben und spielt vor allem für die *late onset disease* eine Rolle, so dass prophylaktische Maßnahmen beim Patientenkontakt helfen können, eine Übertragung und Erkrankung zu verhindern. Das Signalmolekül Galectin 3 scheint eine Rolle im angeborenen Immunsystem Früh- und Neugeborener und speziell im Rahmen einer GBS Sepsis zu spielen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Ergebnisse zu validieren sowie die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung und die mögliche Beteiligung weiterer Signalwege aufzuklären.

## 6 Zusammenfassung

Gruppe B Streptokokken gehören zu den häufigsten Erregern der early onset disease und tragen mit den überwiegend neurologischen Folgeerkrankungen, die beinahe 15% der erkrankten Kinder betreffen, erheblich zur Morbidität bei Neugeborenen bei. Das Verständnis der immunologischen Vorgänge im Rahmen der Gruppe B Streptokokken Infektion ist nach wie vor limitiert. Neue Erkenntnisse könnten hier helfen, neuartige prophylaktische, diagnostische und therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war neben der Etablierung eines *in vitro* Sepsis Modells die Charakterisierung der Zytokinantwort von Monozyten aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener nach der Stimulation mit Gruppe B Streptokokken. Die Konzentration des Signalmoleküls Galectin 3 in unstimuliertem Nabelschnurblut Früh- und Neugeborener sowie nach Stimulation mit Gruppe B Streptokokken wurde ebenfalls analysiert. Insbesondere lag das Augenmerk auf Unterschieden bei Stimulation mit Sepsis- bzw. mit Besiedlungsisolaten. Des Weiteren erfolgte die Analyse der Überlebensfähigkeit von Gruppe B Streptokokken in Nabelschnurblut im Gegensatz zu Blut von erwachsenen Spendern und hieraus isolierten Granulozyten.

Es erfolgte die Inkubation von Nabelschnurblut gesunder Neugeborener in RPMI 1640 Medium und mit vitalen Gruppe B Streptokokken in unterschiedlichen Konzentrationen. Parallel wurde stets eine Probe mit Lipopolysaccharid sowie eine unstimulierte Probe angesetzt. Es wurden Isolate aus Blutkulturen erkrankter Neugeborener sowie Isolate von Hautabstrichen gesunder Neugeborener verwendet. Die Analyse der Zytokinproduktion in den Monozyten erfolgte mittels FACS. Für jede Probe wurden 2000 CD14 positive Zellen untersucht. Die Daten wurden als Prozentzahl der CD14-positiven Zellen ausgedrückt. Die Analyse der Galectin 3 Sekretion erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Mittels Ausplattierungen der Zellkulturansätze zu festgelegten Zeitpunkten erfolgte die Untersuchung der Überlebensfähigkeit der Gruppe B Streptokokken in Anwesenheit von Nabelschnurblut, Blut erwachsener Probanden

bzw. isolierten Granulozyten.

Sämtliche getestete Gruppe B Streptokokken Isolate sind potente Induktoren proinflammatorischer Zytokine und sind somit imstande, ein *systemic inflammatory response syndrome* auszulösen. Es fanden sich einzelne signifikante Unterschiede in der Zytokininduktion durch unterschiedliche Isolate, welche jedoch nicht mit der klinischen Manifestation korrelierten. Das Signalmolekül Galectin 3 scheint ebenfalls eine Rolle im angeborenen Immunsystem des Früh- und Neugeborenen zu spielen. Die Daten dieser Arbeit zeigen eine positive Korrelation der Galectin 3 Konzentrationen mit dem Gestationsalter und signifikant höhere Galectin 3 Spiegel bei SGA Frühgeborenen. Die Stimulation mit einem GBS Sepsis isolat in hoher Konzentration induzierte im Gegensatz zur niedrigen Streptokokkenkonzentration bzw. Stimulation durch ein Besiedlungs isolat einen signifikanten Anstieg der Galectin 3 Konzentration im Kulturüberstand. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung sowie die mögliche Beteiligung weiterer Signalwege aufzuklären.

# Literaturverzeichnis

- [1] ADERKA, D., J. M. LE und J. VILCEK: *IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice.* J Immunol, 143(11):3517–3523, Dec 1989.
- [2] ADRIAANSE, A. H., L. A. KOLLÉE, H. L. MUYTJENS, J. G. NIJHUIS, A. F. DE HAAN und T. K. ESKES: *Randomized study of vaginal chlorhexidine disinfection during labor to prevent vertical transmission of group B streptococci.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 61(2):135–141, Aug 1995.
- [3] AKIRA, SHIZUO, SATOSHI UEMATSU und OSAMU TAKEUCHI: *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 124(4):783–801, Feb 2006.
- [4] AMARILYO, G., A. OREN, F. B. MIMOUNI, Y. OCHSHORN, V. DEUTSCH und D. MANDEL: *Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age neonates.* J Perinatol, 31(1):30–32, Jan 2011.
- [5] ANCONA, R. J., P. FERRIERI und P. P. WILLIAMS: *Maternal factors that enhance the acquisition of group-B streptococci by newborn infants.* J Med Microbiol, 13(2):273–280, May 1980.
- [6] ANDERSON, D. C., O. ABBASSI, T. K. KISHIMOTO, J. M. KOENIG, L. V. MCINTIRE und C. W. SMITH: *Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro.* J Immunol, 146(10):3372–3379, May 1991.
- [7] ANDERSON, D. C., B. J. HUGHES und C. W. SMITH: *Abnormal mobility of neonatal polymorphonuclear leukocytes. Relationship to impaired redistribution*

- of surface adhesion sites by chemotactic factor or colchicine.* J Clin Invest, 68(4):863–874, Oct 1981.
- [8] AVERY, OSWALD T und GLENN E CULLEN: *The use of the final hydrogen ion concentration in differentiation of streptococcus haemolyticus of human and bovine types.* J Exp Med, 29(2):215–234, Jan 1919.
- [9] AYERS, S.H. und P. RUPP: *Differentiation of hemolytic streptococci from human and bovine sources by the hydrolysis of sodium hippurate.* Journal of Infectious Diseases, 30:388–399, 1922.
- [10] BAKER, C. J., F. F. BARRETT, R. C. GORDON und M. D. YOW: *Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants.* J Pediatr, 82(4):724–729, Apr 1973.
- [11] BARCAITE, EGLE, ARNOLDAS BARTUSEVICIUS, RASA TAMELIENE, MINDAUGAS KLIUCINSKAS, LAIMA MALECKIENE und RUTA NADISAUSKIENE: *Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries.* Acta Obstet Gynecol Scand, 87(3):260–271, 2008.
- [12] BARON, MIRIAM J, GILLES R BOLDOC, MARCIA B GOLDBERG, THIERRY C AUPÉRIN und LAWRENCE C MADOFF: *Alpha C protein of group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism.* J Biol Chem, 279(23):24714–24723, Jun 2004.
- [13] BARONDES, S. H., D. N. COOPER, M. A. GITT und H. LEFFLER: *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins.* J Biol Chem, 269(33):20807–20810, Aug 1994.
- [14] BARTON, L. L., R. D. FEIGIN und R. LINS: *Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants.* J Pediatr, 82(4):719–723, Apr 1973.
- [15] BECKMANN, CHRISTIANE, JOSHUA D WAGGONER, THERESA O HARRIS, GLEN S TAMURA und CRAIG E RUBENS: *Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding.* Infect Immun, 70(6):2869–2876, Jun 2002.

- [16] BENNETT, P. R., M. P. ROSE, L. MYATT und M. G. ELDER: *Preterm labor: stimulation of arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products*. Am J Obstet Gynecol, 156(3):649–655, Mar 1987.
- [17] BERNER, R., J. CSORBA und M. BRANDIS: *Different cytokine expression in cord blood mononuclear cells after stimulation with neonatal sepsis or colonizing strains of Streptococcus agalactiae*. Pediatr Res, 49(5):691–697, May 2001.
- [18] BERNER, R., C. M. NIEMEYER, J. U. LEITITIS, A. FUNKE, C. SCHWAB, U. RAU, K. RICHTER, M. S. TAWFEEK, A. CLAD und M. BRANDIS: *Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis*. Pediatr Res, 44(4):469–477, Oct 1998.
- [19] BERNER, REINHARD, PATRICK WELTER und MATTHIAS BRANDIS: *Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to Streptococcus agalactiae*. Pediatr Res, 51(3):304–309, Mar 2002.
- [20] BETZ, A. L.: *Epithelial properties of brain capillary endothelium*. Fed Proc, 44(10):2614–2615, Jul 1985.
- [21] BEVANGER, L.: *Ibc proteins as serotype markers of group B streptococci*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B, 91(4):231–234, Aug 1983.
- [22] BEVANGER, L. und J. A. MAELAND: *Complete and incomplete Ibc protein fraction in group B streptococci*. Acta Pathol Microbiol Scand B, 87B(1):51–54, Feb 1979.
- [23] BLACKWELL, T. S. und J. W. CHRISTMAN: *Sepsis and cytokines: current status*. Br J Anaesth, 77(1):110–117, Jul 1996.
- [24] BLUMBERG, P. M. und J. L. STROMINGER: *Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes*. Bacteriol Rev, 38(3):291–335, Sep 1974.

- [25] BOLDUC, G. R., M. J. BARON, C. GRAVEKAMP, C. S. LACHENAUER und L. C. MADOFF: *The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells*. Cell Microbiol, 4(11):751–758, Nov 2002.
- [26] BOLDUC, GILLES R und LAWRENCE C MADOFF: *The group B streptococcal alpha C protein binds alpha1beta1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells*. Microbiology, 153(Pt 12):4039–4049, Dec 2007.
- [27] BORDEN, E. C. und P. CHIN: *Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles*. J Lab Clin Med, 123(6):824–829, Jun 1994.
- [28] BOYER, K. M. und S. P. GOTOFF: *Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections*. Antibiot Chemother, 35:267–280, 1985.
- [29] BOYER, K. M. und S. P. GOTOFF: *Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis*. N Engl J Med, 314(26):1665–1669, Jun 1986.
- [30] BRADY, L. J., U. D. DAPHTARY, E. M. AYOUB und M. D. BOYLE: *Two novel antigens associated with group B streptococci identified by a rapid two-stage radioimmunoassay*. J Infect Dis, 158(5):965–972, Nov 1988.
- [31] BRÛLE, F. A. VAN DEN, P. L. FERNANDEZ, C. BUICU, F. T. LIU, P. JACKERS, R. LAMBOTTE und V. CASTRONOVO: *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis*. Dev Dyn, 209(4):399–405, Aug 1997.
- [32] BRYAN, JOSHUA D und DANIEL W SHELVER: *Streptococcus agalactiae CspA is a serine protease that inactivates chemokines*. J Bacteriol, 191(6):1847–1854, Mar 2009.
- [33] BUTTER, M. N. W. und C. E. MOOR: *Streptococcus agalactiae as a cause of meningitis in the newborn, and of bacteraemia in adults*. Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology., 33:439–450, 1967.

- [34] CANNON, J. G., R. G. TOMPKINS, J. A. GELFAND, H. R. MICHIE, G. G. STANFORD, J. W. VAN DER MEER, S. ENDRES, G. LONNEMANN, J. CORSETTI und B. CHERNOW: *Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever*. J Infect Dis, 161(1):79–84, Jan 1990.
- [35] CAREY, R. B., T. K. EISENSTEIN, G. D. SHOCKMAN, T. F. GREBER und R. M. SWENSON: *Soluble group- and type-specific antigens from type III group B Streptococcus*. Infect Immun, 28(1):195–203, Apr 1980.
- [36] CARLIN, AARON F, YUNG-CHI CHANG, THOMAS ARESCHOUG, GUNNAR LINDAHL, NANCY HURTADO-ZIOLA, CHARLES C KING, AJIT VARKI und VICTOR NIZET: *Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5*. J Exp Med, 206(8):1691–1699, Aug 2009.
- [37] CARLIN, AARON F, SATOSHI UCHIYAMA, YUNG-CHI CHANG, AMANDA L LEWIS, VICTOR NIZET und AJIT VARKI: *Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response*. Blood, 113(14):3333–3336, Apr 2009.
- [38] CARR, R.: *Neutrophil production and function in newborn infants*. Br J Haematol, 110(1):18–28, Jul 2000.
- [39] CARR, R., D. PUMFORD und J. M. DAVIES: *Neutrophil chemotaxis and adhesion in preterm babies*. Arch Dis Child, 67(7 Spec No):813–817, Jul 1992.
- [40] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): *Perinatal group B streptococcal disease after universal screening recommendations—United States, 2003–2005*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 56(28):701–705, Jul 2007.
- [41] CHAPMAN, P. B., T. J. LESTER, E. S. CASPER, J. L. GABRILOVE, G. Y. WONG, S. J. KEMPIN, P. J. GOLD, S. WELT, R. S. WARREN und H. F. STARNES: *Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol, 5(12):1942–1951, Dec 1987.

- [42] CHENG, QI, DEBORAH STAFSLIEN, SAI SUDHA PURUSHOTHAMAN und PATRICK CLEARY: *The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin*. *Infect Immun*, 70(5):2408–2413, May 2002.
- [43] CHOLLET-MARTIN, S., P. MONTRAVERS, C. GIBERT, C. ELBIM, J. M. DESMONTS, J. Y. FAGON und M. A. GOUGEROT-POCIDALO: *High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome*. *Infect Immun*, 61(11):4553–4559, Nov 1993.
- [44] CHRISTIE, K., N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN: *A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 22:197–200, 1944.
- [45] COLNOT, C., M. A. RIPOCHE, G. MILON, X. MONTAGUTELLI, P. R. CROCKER und F. POIRIER: *Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice*. *Immunology*, 94(3):290–296, Jul 1998.
- [46] CONGDON, PM: *Streptococcal infection in childbirth and septic abortion*. *Lancet*, 2:1287–1288, 1935.
- [47] COOPER, D. N. und S. H. BARONDES: *God must love galectins; he made so many of them*. *Glycobiology*, 9(10):979–984, Oct 1999.
- [48] CREASEY, A. A., P. STEVENS, J. KENNEY, A. C. ALLISON, K. WARREN, R. CATLETT, L. HINSHAW und F. B. TAYLOR: *Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal Escherichia coli*. *Circ Shock*, 33(2):84–91, Feb 1991.
- [49] CUSUMANO, V., F. GENOVESE, G. MANCUSO, M. CARBONE, M. T. FERA und G. TETI: *Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection*. *Infect Immun*, 64(7):2850–2852, Jul 1996.
- [50] CUSUMANO, VITALIANO, ANGELINA MIDIRI, VALENTINA VALERIA CUSUMANO, ANTONELLA BELLANTONI, GIUSEPPE DE SOSSI, GIUSEPPE TETI, CONCETTA BENINATI und GIUSEPPE MANCUSO: *Interleukin-18 is an essential ele-*

- ment in host resistance to experimental group B streptococcal disease in neonates.* Infect Immun, 72(1):295–300, Jan 2004.
- [51] DAHESH, SAMIRA, MARY E HENSLER, NINA M VAN SORGE, ROBERT E GERTZ, STEPHANIE SCHRAG, VICTOR NIZET und BERNARD W BEALL: *Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics.* Antimicrob Agents Chemother, 52(8):2915–2918, Aug 2008.
- [52] DARLING, C. L.: *Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of Streptococcus agalactiae (Lancefield group B) in clinical material.* J Clin Microbiol, 1(2):171–174, Feb 1975.
- [53] DEVRIESE, L. A.: *Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes.* J Appl Bacteriol, 71(6):478–483, Dec 1991.
- [54] DINARELLO, C. A.: *The endogenous pyrogens in host-defense interactions.* Hosp Pract (Off Ed), 24(11):111–5, 118, 121 passim, Nov 1989.
- [55] DINARELLO, C. A.: *Proinflammatory cytokines.* Chest, 118(2):503–508, Aug 2000.
- [56] DOERY, H. M., B. J. MAGNUSSON, I. M. CHEYNE und J. SULASEKHARAM: *A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin.* Nature, 198:1091–1092, Jun 1963.
- [57] DORAN, KELLY S, JENNIFER C W CHANG, VIVIAN M BENOIT, LARS ECKMANN und VICTOR NIZET: *Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8.* J Infect Dis, 185(2):196–203, Jan 2002.
- [58] DORAN, KELLY S, ERIN J ENGELSON, ARYA KHOSRAVI, HEATHER C MAISEY, IRIS FEDTKE, OZLEM EQUILS, KATHRIN S MICHELSEN, MOSHE ARDITI, ANDREAS PESCHEL und VICTOR NIZET: *Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid.* J Clin Invest, 115(9):2499–2507, Sep 2005.

- [59] DORAN, KELLY S und VICTOR NIZET: *Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy*. Mol Microbiol, 54(1):23–31, Oct 2004.
- [60] DORSCHNER, ROBERT A, KENNETH H LIN, MASAMOTO MURAKAMI und RICHARD L GALLO: *Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response*. Pediatr Res, 53(4):566–572, Apr 2003.
- [61] DRAMSI, SHAYNOOR, ELISE CALIOT, ISABELLE BONNE, STÉPHANIE GUADAGNINI, MARIE-CHRISTINE PRÉVOST, MILA KOJADINOVIC, LILA LALIOUI, CLAIRE POYART und PATRICK TRIEU-CUOT: *Assembly and role of pili in group B streptococci*. Mol Microbiol, 60(6):1401–1413, Jun 2006.
- [62] DROSSOU, V., F. KANAKOUDI, E. DIAMANTI, V. TZIMOULI, T. KONSTANTINIDIS, A. GERMENIS, G. KREMENOPOULOS und V. KATSOUGIANNOPOULOS: *Concentrations of main serum opsonins in early infancy*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 72(3):F172–F175, May 1995.
- [63] DUDLEY, D. J.: *Pre-term labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome?* J Reprod Immunol, 36(1-2):93–109, Nov 1997.
- [64] DUMIC, J., G. LAUC und M. FLÖGEL: *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB*. Cell Physiol Biochem, 10(3):149–158, 2000.
- [65] EDWARDS, M. S., D. L. KASPER, H. J. JENNINGS, C. J. BAKER und A. NICHOLSON-WELLER: *Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci*. J Immunol, 128(3):1278–1283, Mar 1982.
- [66] EDWARDS, M. S., M. A. RENCH, A. A. HAFFAR, M. A. MURPHY, M. M. DESMOND und C. J. BAKER: *Long-term sequelae of group B streptococcal meningitis in infants*. J Pediatr, 106(5):717–722, May 1985.
- [67] EICKHOFF, T. C., J. O. KLEIN, A. K. DALY, D. INGALL und M. FINLAND: *Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci*. N Engl J Med, 271:1221–1228, Dec 1964.

- [68] EISENFELD, L., P. J. KRAUSE, V. HERSON, J. SAVIDAKIS, P. BANNON, E. MADERAZO, C. WORONICK, C. GIULIANO und L. BANCO: *Longitudinal study of neutrophil adherence and motility*. J Pediatr, 117(6):926–929, Dec 1990.
- [69] ELOLA, M. T., C. WOLFENSTEIN-TODEL, M. F. TRONCOSO, G. R. VASTA und G. A. RABINOVICH: *Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival*. Cell Mol Life Sci, 64(13):1679–1700, Jul 2007.
- [70] ELTZSCHIG, HOLGER K und PETER CARMELIET: *Hypoxia and inflammation*. N Engl J Med, 364(7):656–665, Feb 2011.
- [71] EMERSON, T. E., D. C. LINDSEY, G. J. JESMOK, M. L. DUERR und M. A. FOURNEL: *Efficacy of monoclonal antibody against tumor necrosis factor alpha in an endotoxemic baboon model*. Circ Shock, 38(2):75–84, Oct 1992.
- [72] FACKLAM, R. R., J. F. PADULA, E. C. WORTHAM, R. C. COOKSEY und H. A. ROUNTREE: *Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media*. J Clin Microbiol, 9(6):665–672, Jun 1979.
- [73] FARNWORTH, SARAH L, NEIL C HENDERSON, ALISON C MACKINNON, KIRSTEN M ATKINSON, TOM WILKINSON, KEVIN DHALIWAL, KATSUTOSHI HAYASHI, A. JOHN SIMPSON, ADRIANO G ROSSI, CHRISTOPHER HASLETT und TARIQ SETHI: *Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function*. Am J Pathol, 172(2):395–405, Feb 2008.
- [74] FERRIERI, P., P. P. CLEARY und A. E. SEEDS: *Epidemiology of group-B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants*. J Med Microbiol, 10(1):103–114, Feb 1977.
- [75] FLUEGGE, KIRSTEN, ANETTE SIEDLER, BEATE HEINRICH, JUERGEN SCHULTE-MOENTING, MARIA-JANTJE MOENNIG, DOROTHEE B BARTELS, OLAF DAMMANN, RUEDIGER VON KRIES, REINHARD BERNER und GERMAN PEDIATRIC SURVEILLANCE UNIT STUDY GROUP: *Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany*. Pediatrics, 117(6):e1139–e1145, Jun 2006.

- [76] FONG, Y., K. J. TRACEY, L. L. MOLDAWER, D. G. HESSE, K. B. MANOGUE, J. S. KENNEY, A. T. LEE, G. C. KUO, A. C. ALLISON und S. F. LOWRY: *Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia*. J Exp Med, 170(5):1627–1633, Nov 1989.
- [77] FRADIN, C., D. POULAIN und T. JOUAULT: *beta-1,2-linked oligomannosides from Candida albicans bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3*. Infect Immun, 68(8):4391–4398, Aug 2000.
- [78] FRANCIOSI, R. A., J. D. KNOSTMAN und R. A. ZIMMERMAN: *Group B streptococcal neonatal and infant infections*. J Pediatr, 82(4):707–718, Apr 1973.
- [79] FROL'OVÁ, LENKA, KAREL SMETANA, DANA BOROVSÁ, ANDREA KITANOVIČOVÁ, KLÁRA KLIMEŠOVÁ, IVANA JANATKOVÁ, KARIN MALÍČKOVÁ, MILAN LUKÁŠ, PAVEL DRASTICH, ZDENĚK BENEŠ, LUDMILA TUČKOVÁ, JOACHIM C MANNING, SABINE ANDRÉ, HANS-JOACHIM GABIUS und HELENA TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ: *Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD?* Inflamm Res, 58(8):503–512, Aug 2009.
- [80] FRY, R. M.: *Fatal infections by hemolytic streptococcus Group B*. Lancet, 231:199–201, 1938.
- [81] GAHR, M., M. SCHULZE, D. SCHEFFCZYK, C. P. SPEER und J. H. PETERS: *Diminished release of lactoferrin from polymorphonuclear leukocytes of human neonates*. Acta Haematol, 77(2):90–94, 1987.
- [82] GALINIER, ANNE, BRIGITTE PÉRIQUET, WILLY LAMBERT, JÉSUS GARCIA, CORINNE ASSOULINE, MICHEL ROLLAND und JEAN-PAUL THOUVENOT: *Reference range for micronutrients and nutritional marker proteins in cord blood of neonates appropriated for gestational ages*. Early Hum Dev, 81(7):583–593, Jul 2005.
- [83] GARDOSI, J.: *New definition of small for gestational age based on fetal growth potential*. Horm Res, 65 Suppl 3:15–18, 2006.

- [84] GEORGOPAPADAKOU, N. H. und F. Y. LIU: *Penicillin-binding proteins in bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 18(1):148–157, Jul 1980.
- [85] GESELLSCHAFT FÜR NEONATOLOGIE UND PÄDIATRISCHE INTENSIVMEDIZIN: *Prophylaxe der Neugeborenssepsis - frühe Form - durch Streptokokken der Gruppe B*. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2008.
- [86] GIBSON, R. L., V. NIZET und C. E. RUBENS: *Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells*. Pediatr Res, 45(5 Pt 1):626–634, May 1999.
- [87] GOMEZ, R., F. GHEZZI, R. ROMERO, H. MUÑOZ, J. E. TOLOSA und I. ROJAS: *Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology*. Clin Perinatol, 22(2):281–342, Jun 1995.
- [88] GREIJER, A. E., P. VAN DER GROEP, D. KEMMING, A. SHVARTS, G. L. SEMENZA, G. A. MEIJER, M. A. VAN DE WIEL, J. A M BELIEN, P. J. VAN DIEST und E. VAN DER WALL: *Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)*. J Pathol, 206(3):291–304, Jul 2005.
- [89] GROOTE, D. DE, P. F. ZANGERLE, Y. GEVAERT, M. F. FASSOTTE, Y. BEGUIN, F. NOIZAT-PIRENNE, J. PIRENNE, R. GATHY, M. LOPEZ und I. DEHART: *Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation*. Cytokine, 4(3):239–248, May 1992.
- [90] GUTEKUNST, HEIKE, BERNHARD J EIKMANN und DIETER J REINSCHIED: *The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes Streptococcus agalactiae invasion into epithelial cells*. Infect Immun, 72(6):3495–3504, Jun 2004.
- [91] HAMILTON, ANDREA, DAVID L POPHAM, DAVID J CARL, XAVIER LAUTH, VICTOR NIZET und AMANDA L JONES: *Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B streptococcus to antimicrobial peptides*. Infect Immun, 74(11):6179–6187, Nov 2006.

- [92] HANSEN, P. ARNE: *A note on the name streptococcus agalactiae Lehmann and Neumann*. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy, 3:21–23, 1953.
- [93] HARE, RONALD: *The classification of hæmolytic streptococci nose and throat of normal human beings by means of precipitin and biochemical tests*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 41(3):499–512, 1935.
- [94] HARRIS, M. C., M. SHALIT und F. S. SOUTHWICK: *Diminished actin polymerization by neutrophils from newborn infants*. Pediatr Res, 33(1):27–31, Jan 1993.
- [95] HARRIS, THERESA O, DANIEL W SHELVER, JOHN F BOHNSACK und CRAIG E RUBENS: *A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen*. J Clin Invest, 111(1):61–70, Jan 2003.
- [96] HAUPT, HERBERT: *The correct species name of the streptococcus of bovine mastitis*. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy, 2:104–106, 1952.
- [97] HENNEKE, P., O. TAKEUCHI, J. A. VAN STRIJP, H. K. GUTTORMSEN, J. A. SMITH, A. B. SCHROMM, T. A. ESPEVIK, S. AKIRA, V. NIZET, D. L. KASPER und D. T. GOLENBOCK: *Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci*. J Immunol, 167(12):7069–7076, Dec 2001.
- [98] HENNEKE, PHILIPP, SHAYNOOR DRAMSI, GIUSEPPE MANCUSO, KAMILA CHRAIBI, ELISABETH PELLEGRINI, CHRISTIAN THEILACKER, JOHANNES HÜBNER, SANDRA SANTOS-SIERRA, GIUSEPPE TETI, DOUGLAS T GOLENBOCK, CLAIRE POYART und PATRICK TRIEU-CUOT: *Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis*. J Immunol, 180(9):6149–6158, May 2008.
- [99] HENNEKE, PHILIPP, INGA OSMERS, KARL BAUER, NORBERT LAMPING, HANS T VERSMOLD und RALF R SCHUMANN: *Impaired CD14-dependent and independent response of polymorphonuclear leukocytes in preterm infants*. J Perinat Med, 31(2):176–183, 2003.

- [100] HENNEKE, PHILIPP, OSAMU TAKEUCHI, RICHARD MALLEY, EGIL LIEN, ROBIN R. INGALLS, MASON W. FREEMAN, TANYA MAYADAS, VICTOR NIZET, SHIZUO AKIRA, DENNIS L. KASPER und DOUGLAS T. GOLENBOCK: *Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways.* J Immunol, 169(7):3970–3977, Oct 2002.
- [101] HENSLE, MARY E, DARIN QUACH, CHIA-JUN HSIEH, KELLY S DORAN und VICTOR NIZET: *CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus.* Microb Pathog, 44(1):84–88, Jan 2008.
- [102] HILL, H. R., J. F. BOHNSACK, E. Z. MORRIS, N. H. AUGUSTINE, C. J. PARKER, P. P. CLEARY und J. T. WU: *Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement.* J Immunol, 141(10):3551–3556, Nov 1988.
- [103] HOOD, M., A. JANNEY und G. DAMERON: *Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period.* Am J Obstet Gynecol, 82:809–818, Oct 1961.
- [104] HÄRTEL, C., G. BEIN, M. MÜLLER-STEINHARDT und H. KLÜTER: *Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples.* J Immunol Methods, 249(1-2):63–71, Mar 2001.
- [105] HÄRTEL, C., I. OSTHUES, J. RUPP, B. HAASE, K. RÖDER, W. GÖPEL, E. HERTING und C. SCHULTZ: *Characterisation of the host inflammatory response to Staphylococcus epidermidis in neonatal whole blood.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 93(2):F140–F145, Mar 2008.
- [106] HSU, D. K., R. Y. YANG, Z. PAN, L. YU, D. R. SALOMON, W. P. FUNG-LEUNG und F. T. LIU: *Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses.* Am J Pathol, 156(3):1073–1083, Mar 2000.
- [107] HUNOLSTEIN, C. VON, S. D’ASCENZI, B. WAGNER, J. JELÍNKOVÁ, G. ALFARONE, S. RECCHIA, M. WAGNER und G. OREFICI: *Immunochemistry of cap-*

- sular type polysaccharide and virulence properties of type VI Streptococcus agalactiae (group B streptococci)*. Infect Immun, 61(4):1272–1280, Apr 1993.
- [108] HYVARINEN, M., P. ZELTZER, W. OH und E. R. STIEHM: *Influence of gestational age on serum levels of alpha-1 fetoprotein, IgG globulin, and albumin in newborn infants*. J Pediatr, 82(3):430–437, Mar 1973.
- [109] IURISCI, I., N. TINARI, C. NATOLI, D. ANGELUCCI, E. CIANCHETTI und S. IACOPELLI: *Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients*. Clin Cancer Res, 6(4):1389–1393, Apr 2000.
- [110] JACKSON, R. J., M. L. DAO und D. V. LIM: *Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci*. Infect Immun, 62(12):5647–5651, Dec 1994.
- [111] JACOBSEN, B. B., B. PEITERSEN, H. J. ANDERSEN und L. HUMMER: *Serum concentrations of thyroxine-binding globulin, prealbumin and albumin in healthy fullterm, small-for-gestational age and preterm newborn infants*. Acta Paediatr Scand, 68(1):49–55, Jan 1979.
- [112] JELÍNKOVÁ, J. und J. MOTLOVÁ: *Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V*. J Clin Microbiol, 21(3):361–362, Mar 1985.
- [113] JENNINGS, H. J., K. G. ROSELL und D. L. KASPER: *Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type-III group B Streptococcus*. Can J Biochem, 58(2):112–120, Feb 1980.
- [114] JENNINGS, H. J., K. G. ROSELL und D. L. KASPER: *Structure and serology of the native polysaccharide antigen of type Ia group B streptococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(5):2931–2935, May 1980.
- [115] JIANG, SHENG-MEI, MICHAEL J CIESLEWICZ, DENNIS L KASPER und MICHAEL R WESSELS: *Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus*. J Bacteriol, 187(3):1105–1113, Feb 2005.
- [116] JOACHIM, AGRICOLA, MECKY I MATEE, FURAHA A MASSAWE und ELIGIUS F LYAMUYA: *Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Mu-*

*himbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance.* BMC Public Health, 9:437, 2009.

- [117] JOHNSON, D. R. und P. FERRIERI: *Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes.* J Clin Microbiol, 19(4):506–510, Apr 1984.
- [118] JONES, A. L., K. M. KNOLL und C. E. RUBENS: *Identification of Streptococcus agalactiae virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis.* Mol Microbiol, 37(6):1444–1455, Sep 2000.
- [119] JONES, AMANDA L, ROBERT H MERTZ, DAVID J CARL und CRAIG E RUBENS: *A streptococcal penicillin-binding protein is critical for resisting innate airway defenses in the neonatal lung.* J Immunol, 179(5):3196–3202, Sep 2007.
- [120] JONES, AMANDA L, RACHEL H V NEEDHAM, ANNE CLANCY, KATHERINE M KNOLL und CRAIG E RUBENS: *Penicillin-binding proteins in Streptococcus agalactiae: a novel mechanism for evasion of immune clearance.* Mol Microbiol, 47(1):247–256, Jan 2003.
- [121] JONES, NICOLA, JOHN F BOHNSACK, SHINJI TAKAHASHI, KAREN A OLIVER, MAN-SUEN CHAN, FRANK KUNST, PHILIPPE GLASER, CHRISTOPHE RUSNIOK, DERRICK W M CROOK, ROSALIND M HARDING, NAIEL BISHARAT und BRIAN G SPRATT: *Multilocus sequence typing system for group B streptococcus.* J Clin Microbiol, 41(6):2530–2536, Jun 2003.
- [122] JÜRGENS, D., B. STERZIK und F. J. FEHRENBACH: *Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity.* J Exp Med, 165(3):720–732, Mar 1987.
- [123] JUNG, T., U. SCHAUER, C. HEUSSER, C. NEUMANN und C. RIEGER: *Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.* J Immunol Methods, 159(1-2):197–207, Feb 1993.
- [124] JUUL, S. E., M. G. KINSELLA, W. E. TRUOG, R. L. GIBSON und G. J. REDDING: *Lung hyaluronan decreases during group B streptococcal pneumonia in neonatal piglets.* Am J Respir Crit Care Med, 153(5):1567–1570, May 1996.

- [125] KARLSSON, ANNA, KARIN CHRISTENSON, MUSTAFA MATLAK, ÅSE BJÖRSTAD, KELLY L BROWN, ESBJÖRN TELEMÖ, EMMA SALOMONSSON, HAKON LEFFLER und JOHAN BYLUND: *Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils*. *Glycobiology*, 19(1):16–20, Jan 2009.
- [126] KENGATHARAN, K. M., S. DE KIMPE, C. ROBSON, S. J. FOSTER und C. THIEMERMANN: *Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure*. *J Exp Med*, 188(2):305–315, Jul 1998.
- [127] KIMPE, S. J. DE, M. KENGATHARAN, C. THIEMERMANN und J. R. VANE: *The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22):10359–10363, Oct 1995.
- [128] KITT, THEODOR: *Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie für Thierärzte und Studierende der Thiermedizin*. Verlag Moritz Perles, Wien, 1893.
- [129] KJAERGAARD, N., R. B. HELMIG, H. C. SCHÖNHEYDER, N. ULDBJERG, E. S. HANSEN und H. MADSEN: *Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus in vitro*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 83(2):165–169, Apr 1999.
- [130] KLEIN, R. B., T. J. FISCHER, S. E. GARD, M. BIBERSTEIN, K. C. RICH und E. R. STIEHM: *Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children*. *Pediatrics*, 60(4):467–472, Oct 1977.
- [131] KOCH, A. E., P. J. POLVERINI, S. L. KUNKEL, L. A. HARLOW, L. A. DIPIETRO, V. M. ELNER, S. G. ELNER und R. M. STRIETER: *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. *Science*, 258(5089):1798–1801, Dec 1992.
- [132] KOENIG, JOYCE M und WILLIAM J KEENAN: *Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis*. *Pediatr Clin North Am*, 56(3):689–708, Table of Contents, Jun 2009.

- [133] KOGAN, G., J. R. BRISSON, D. L. KASPER, C. VON HUNOLSTEIN, G. OREFICI und H. J. JENNINGS: *Structural elucidation of the novel type VII group B Streptococcus capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy*. Carbohydr Res, 277(1):1–9, Nov 1995.
- [134] KOGAN, G., D. UHRÍN, J. R. BRISSON, L. C. PAOLETTI, A. E. BLODGETT, D. L. KASPER und H. J. JENNINGS: *Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B Streptococcus capsular polysaccharide*. J Biol Chem, 271(15):8786–8790, Apr 1996.
- [135] KUHN, D. B., W. G. ALVORD und J. I. GALLIN: *Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans*. J Infect Dis, 171(1):145–152, Jan 1995.
- [136] KUWABARA, I. und F. T. LIU: *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin*. J Immunol, 156(10):3939–3944, May 1996.
- [137] LAMONT, R. F., M. ROSE und M. G. ELDER: *Effect of bacterial products on prostaglandin E production by amnion cells*. Lancet, 2(8468):1331–1333, Dec 1985.
- [138] LANCEFIELD, R. C., M. MCCARTY und W. N. EVERLY: *Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens*. J Exp Med, 142(1):165–179, Jul 1975.
- [139] LANCEFIELD, REBECCA C: *A Serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci*. J Exp Med, 57(4):571–595, Mar 1933.
- [140] LANCEFIELD, REBECCA C: *Loss of the properties of hemolysin and pigment formation without change in immunological specificity in a strain of streptococcus haemolyticus*. J Exp Med, 59(4):459–469, Mar 1934.
- [141] LANCEFIELD, REBECCA C: *A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B)*. J Exp Med, 59(4):441–458, Mar 1934.

- [142] LANCEFIELD, REBECCA C: *Two serological types of group B hemolytic streptococci with related, but not identical, type-specific substances.* J Exp Med, 67(1):25–40, Jan 1938.
- [143] LANCEFIELD, REBECCA C und RONALD HARE: *The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women.* J Exp Med, 61(3):335–349, Feb 1935.
- [144] LANG, SHENHUI und MICHAEL PALMER: *Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin.* J Biol Chem, 278(40):38167–38173, Oct 2003.
- [145] LAUER, PETER, CIRA D RINAUDO, MARCO SORIANI, IMMACULADA MARGARIT, DOMENICO MAIONE, ROBERTO ROSINI, ANNA RITA TADDEI, MARIROSA MORA, RINO RAPPUOLI, GUIDO GRANDI und JOHN L TELFORD: *Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus.* Science, 309(5731):105, Jul 2005.
- [146] LAURENT, T. C. und J. R. FRASER: *Hyaluronan.* FASEB J, 6(7):2397–2404, Apr 1992.
- [147] LEHMANN, K. B. und R NEUMANN: *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik.* Verlag Lehmann, M<sup>u</sup>nchen, 1896.
- [148] LEWIS, AMANDA L, VICTOR NIZET und AJIT VARKI: *Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B Streptococcus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101(30):11123–11128, Jul 2004.
- [149] LI, J., D. L. KASPER, F. M. AUSUBEL, B. ROSNER und J. L. MICHEL: *Inactivation of the alpha C protein antigen gene, bca, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B Streptococcus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 94(24):13251–13256, Nov 1997.
- [150] LI, S. und M. J. JEDRZEJAS: *Hyaluronan binding and degradation by Streptococcus agalactiae hyaluronate lyase.* J Biol Chem, 276(44):41407–41416, Nov 2001.

- [151] LI, YUBIN, MOUSA KOMAI-KOMA, DEREK S GILCHRIST, DANIEL K HSU, FU-TONG LIU, TABITHA SPRINGALL und DAMO XU: *Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation*. J Immunol, 181(4):2781–2789, Aug 2008.
- [152] LIBERT, C., A. VINK, P. COULIE, P. BROUCKAERT, B. EVERAERDT, J. VAN SNICK und W. FIERS: *Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models*. Eur J Immunol, 22(10):2625–2630, Oct 1992.
- [153] LIN, B., S. K. HOLLINGSHEAD, J. E. COLIGAN, M. L. EGAN, J. R. BAKER und D. G. PRITCHARD: *Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase*. J Biol Chem, 269(48):30113–30116, Dec 1994.
- [154] LIU, GEORGE Y, KELLY S DORAN, TOBY LAWRENCE, NICOLE TURKSON, MANUELA PULITI, LUCIANA TISSI und VICTOR NIZET: *Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(40):14491–14496, Oct 2004.
- [155] MAISEY, HEATHER C, MARY HENSLER, VICTOR NIZET und KELLY S DORAN: *Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells*. J Bacteriol, 189(4):1464–1467, Feb 2007.
- [156] MAISEY, HEATHER C, DARIN QUACH, MARY E HENSLER, GEORGE Y LIU, RICHARD L GALLO, VICTOR NIZET und KELLY S DORAN: *A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence*. FASEB J, 22(6):1715–1724, Jun 2008.
- [157] MANCUSO, G., V. CUSUMANO, F. GENOVESE, M. GAMBUZZA, C. BENINATI und G. TETI: *Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci*. Infect Immun, 65(9):3731–3735, Sep 1997.
- [158] MANCUSO, G., F. TOMASELLO, M. MIGLIARDO, D. DELFINO, J. COCHRAN, J. A. COOK und G. TETI: *Beneficial effects of interleukin-6 in neonatal mouse*

*models of group B streptococcal disease.* Infect Immun, 62(11):4997–5002, Nov 1994.

- [159] MANCUSO, GIUSEPPE, ANGELINA MIDIRI, CONCETTA BENINATI, CARMELO BIONDO, ROBERTA GALBO, SHIZUO AKIRA, PHILIPP HENNEKE, DOUGLAS GOLENBOCK und GIUSEPPE TETI: *Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease.* J Immunol, 172(10):6324–6329, May 2004.
- [160] MANCUSO, GIUSEPPE, ANGELINA MIDIRI, CARMELO BIONDO, CONCETTA BENINATI, SEBASTIANA ZUMMO, ROBERTA GALBO, FRANCESCO TOMASELLO, MARIA GAMBUZZA, GIANCARLO MACRÌ, ALESSIA RUGGERI, TOMAS LEANDERSON und GIUSEPPE TETI: *Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria.* J Immunol, 178(5):3126–3133, Mar 2007.
- [161] MARCHLEWICZ, B. A. und J. L. DUNCAN: *Properties of a hemolysin produced by group B streptococci.* Infect Immun, 30(3):805–813, Dec 1980.
- [162] MARÓDI, L., P. C. LEIJH und R. VAN FURTH: *Characteristics and functional capacities of human cord blood granulocytes and monocytes.* Pediatr Res, 18(11):1127–1131, Nov 1984.
- [163] MARISCALCO, M. M., M. H. TCHARMTCHI und C. W. SMITH: *P-Selectin support of neonatal neutrophil adherence under flow: contribution of L-selectin, LFA-1, and ligand(s) for P-selectin.* Blood, 91(12):4776–4785, Jun 1998.
- [164] MARQUES, M. B., D. L. KASPER, M. K. PANGBURN und M. R. WESSELS: *Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci.* Infect Immun, 60(10):3986–3993, Oct 1992.
- [165] MARTIN, T. R., J. T. RUZINSKI, C. E. RUBENS, E. Y. CHI und C. B. WILSON: *The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lungs of infant and adult rats.* J Infect Dis, 165(2):306–314, Feb 1992.

- [166] MCCracken, G. H.: *Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections*. J Pediatr, 82(4):703–706, Apr 1973.
- [167] McEvoy, L. T., H. ZAKEM-CLOUD und M. F. TOSI: *Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age*. Blood, 87(9):3929–3933, May 1996.
- [168] MERZ, A. J. und M. SO: *Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 16:423–457, 2000.
- [169] MICHEL, J. L., L. C. MADOFF, D. E. KLING, D. L. KASPER und F. M. AUSUBEL: *Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity*. Infect Immun, 59(6):2023–2028, Jun 1991.
- [170] MICHIE, H. R., K. R. MANOGUE, D. R. SPRIGGS, A. REVHAUG, S. O'DWYER, C. A. DINARELLO, A. CERAMI, S. M. WOLFF und D. W. WILMORE: *Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration*. N Engl J Med, 318(23):1481–1486, Jun 1988.
- [171] MICHON, F., J. R. BRISSON, A. DELL, D. L. KASPER und H. J. JENNINGS: *Multiantennary group-specific polysaccharide of group B Streptococcus*. Biochemistry, 27(14):5341–5351, Jul 1988.
- [172] MICHON, F., R. CHALIFOUR, R. FELDMAN, M. WESSELS, D. L. KASPER, A. GAMIAN, V. POZSGAY und H. J. JENNINGS: *The alpha-L-(1—2)-trirhamnopyranoside epitope on the group-specific polysaccharide of group B streptococci*. Infect Immun, 59(5):1690–1696, May 1991.
- [173] MICHON, F., E. KATZENELLENBOGEN, D. L. KASPER und H. J. JENNINGS: *Structure of the complex group-specific polysaccharide of group B Streptococcus*. Biochemistry, 26(2):476–486, Jan 1987.
- [174] MIGULA, WALTER: *System Der Bakterien: Handbuch Der Morphologie, Entwicklungsgeschichte Und Systematik Der Bakterien*. Jena: Fischer, 1897-1900.
- [175] MØLLER, M., A. C. THOMSEN, K. BØRCH, K. DINESEN und M. ZDRAVKOVIC: *Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women*. Lancet, 2(8394):69–70, Jul 1984.

- [176] MOHAMED, MOHAMED A, SUSANNE CUNNINGHAM-RUNDLES, CHARLES R DEAN, TAREK A HAMMAD und MIRJANA NESIN: *Levels of pro-inflammatory cytokines produced from cord blood in-vitro are pathogen dependent and increased in comparison to adult controls.* Cytokine, 39(3):171–177, Sep 2007.
- [177] MOON, B. K., Y. J. LEE, P. BATTLE, J. M. JESSUP, A. RAZ und H. R. KIM: *Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis.* Am J Pathol, 159(3):1055–1060, Sep 2001.
- [178] MUNCH-PETERSEN, E., R. CHRISTIE und R. T. SIMMONS: *Further notes on a lytic phenomenon shown by group b streptococci.* Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 23:193–195, 1945.
- [179] MURPHY, J. M., O. M. STUART und F. I. REED: *An evaluation of the CAMP test for the identification of Streptococcus agalactiae in routine mastitis testing.* Cornell Vet, 42(1):133–147, Jan 1952.
- [180] MUSSER, J. M., S. J. MATTINGLY, R. QUENTIN, A. GOUDEAU und R. K. SELANDER: *Identification of a high-virulence clone of type III Streptococcus agalactiae (group B Streptococcus) causing invasive neonatal disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 86(12):4731–4735, Jun 1989.
- [181] NAGANO, Y., N. NAGANO, S. TAKAHASHI, K. MURONO, K. FUJITA, F. TAGUCHI und Y. OKUWAKI: *Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B beta-haemolytic streptococci.* J Med Microbiol, 35(5):297–303, Nov 1991.
- [182] NIZET, V., R. L. GIBSON, E. Y. CHI, P. E. FRAMSON, M. HULSE und C. E. RUBENS: *Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells.* Infect Immun, 64(9):3818–3826, Sep 1996.
- [183] NIZET, V., R. L. GIBSON und C. E. RUBENS: *The role of group B streptococci beta-hemolysin expression in newborn lung injury.* Adv Exp Med Biol, 418:627–630, 1997.

- [184] NIZET, V., K. S. KIM, M. STINS, M. JONAS, E. Y. CHI, D. NGUYEN und C. E. RUBENS: *Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci*. *Infect Immun*, 65(12):5074–5081, Dec 1997.
- [185] NIZET, VICTOR: *Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis*. *Trends Microbiol*, 10(12):575–580, Dec 2002.
- [186] NOCARD, E. und H. MOLLEREAU: *Sur une mammite contagieuse des vaches laitières*. *Annales de l’Institut Pasteur*, 1:109, 1887.
- [187] NORLING, LUCY V, MAURO PERRETTI und DIANNE COOPER: *Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response*. *J Endocrinol*, 201(2):169–184, May 2009.
- [188] PAHWA, S. G., R. PAHWA, E. GRIMES und E. SMITHWICK: *Cellular and humoral components of monocyte and neutrophil chemotaxis in cord blood*. *Pediatr Res*, 11(5):677–680, May 1977.
- [189] PASS, M. A., B. M. GRAY, S. KHARE und H. C. DILLON: *Prospective studies of group B streptococcal infections in infants*. *J Pediatr*, 95(3):437–443, Sep 1979.
- [190] PEOPLES, JOHN DENTON, SANDY CHEUNG, MIRJANA NESIN, HONG LIN, A. M FRANCESCA TATAD, DAN THANH HOANG, JEFFREY M PERLMAN und SUSANNA CUNNINGHAM-RUNDLES: *Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens*. *Am J Perinatol*, 26(9):647–657, Oct 2009.
- [191] PERILLO, N. L., M. E. MARCUS und L. G. BAUM: *Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death*. *J Mol Med*, 76(6):402–412, May 1998.
- [192] PLUMMER, H.: *A Serological Study of Haemolytic Streptococci*. *J Bacteriol*, 30(1):5–20, Jul 1935.
- [193] POLL, T. VAN DER, H. R. BÜLLER, H. TEN CATE, C. H. WORTEL, K. A. BAUER, S. J. VAN DEVENTER, C. E. HACK, H. P. SAUERWEIN, R. D. ROSENBERG und J. W. TEN CATE: *Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects*. *N Engl J Med*, 322(23):1622–1627, Jun 1990.

- [194] POLL, T. VAN DER, M. LEVI, C. E. HACK, H. TEN CATE, S. J. VAN DEVENTER, A. J. EERENBERG, E. R. DE GROOT, J. JANSEN, H. GALLATI und H. R. BÜLLER: *Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees*. J Exp Med, 179(4):1253–1259, Apr 1994.
- [195] POYART, C., E. PELLEGRINI, O. GAILLOT, C. BOUMAILA, M. BAPTISTA und P. TRIEU-CUOT: *Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of Streptococcus agalactiae*. Infect Immun, 69(8):5098–5106, Aug 2001.
- [196] PREISER, J. C., D. SCHMARTZ, P. VAN DER LINDEN, J. CONTENT, P. VANDEN BUSSCHE, W. BUURMAN, W. SEBALD, E. DUPONT, M. R. PINSKY und J. L. VINCENT: *Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog*. Cytokine, 3(1):1–4, Jan 1991.
- [197] PRITCHARD, D. G., B. LIN, T. R. WILLINGHAM und J. R. BAKER: *Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase*. Arch Biochem Biophys, 315(2):431–437, Dec 1994.
- [198] PRITZLAFF, C. A., J. C. CHANG, S. P. KUO, G. S. TAMURA, C. E. RUBENS und V. NIZET: *Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus*. Mol Microbiol, 39(2):236–247, Jan 2001.
- [199] RAJAGOPAL, LAKSHMI, ANTHONY VO, AURELIO SILVESTRONI und CRAIG E RUBENS: *Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiol, 62(4):941–957, Nov 2006.
- [200] REDL, H., G. SCHLAG, M. CESKA, J. DAVIES und W. A. BUURMAN: *Interleukin-8 release in baboon septicemia is partially dependent on tumor necrosis factor*. J Infect Dis, 167(6):1464–1466, Jun 1993.
- [201] REGAN, J. A., M. A. KLEBANOFF und R. P. NUGENT: *The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy*. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol, 77(4):604–610, Apr 1991.

- [202] ROONEY, S. A.: *The surfactant system and lung phospholipid biochemistry*. Am Rev Respir Dis, 131(3):439–460, Mar 1985.
- [203] ROSA-FRAILE, MANUEL, JAVIER RODRÍGUEZ-GRANGER, ALI HAIDOUR-BENAMIN, JUAN MANUEL CUERVA und ANTONIO SAMPEDRO: *Granadaene: proposed structure of the group B Streptococcus polyenic pigment*. Appl Environ Microbiol, 72(9):6367–6370, Sep 2006.
- [204] RUBENS, C. E., M. R. WESSELS, L. M. HEGGEN und D. L. KASPER: *Transposon mutagenesis of type III group B Streptococcus: correlation of capsule expression with virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 84(20):7208–7212, Oct 1987.
- [205] SACCHI, F., N. H. AUGUSTINE, M. M. COELLO, E. Z. MORRIS und H. R. HILL: *Abnormality in actin polymerization associated with defective chemotaxis in neutrophils from neonates*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 84(1):32–39, 1987.
- [206] SAMEN, ULRIKE, BERNHARD J EIKMANN, DIETER J REINSCHIED und FRÉDÉRIC BORGES: *The surface protein Srr-1 of Streptococcus agalactiae binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells*. Infect Immun, 75(11):5405–5414, Nov 2007.
- [207] SANO, HIDEKI, DANIEL K HSU, JOHN R APGAR, LAN YU, BHAVYA B SHARMA, ICHIRO KUWABARA, SHOZO IZUI und FU-TONG LIU: *Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages*. J Clin Invest, 112(3):389–397, Aug 2003.
- [208] SANTI, ISABELLA, MARIA SCARSELLI, MASSIMO MARIANI, ALFREDO PEZZICOLI, VEGA MASIGNANI, ANNARITA TADDEI, GUIDO GRANDI, JOHN L TELFORD und MARCO SORIANI: *BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood*. Mol Microbiol, 63(3):754–767, Feb 2007.
- [209] SATO, SACHIKO und JULIE NIEMINEN: *Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity*. Glycoconj J, 19(7-9):583–591, 2004.

- [210] SATO, SACHIKO, NATHALIE OUELLET, ISABELLE PELLETIER, MARIE SIMARD, ANN RANCOURT und MICHEL G BERGERON: *Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia*. J Immunol, 168(4):1813–1822, Feb 2002.
- [211] SBARRA, A. J., G. B. THOMAS, C. L. CETRULO, C. SHAKR, A. CHAUDHURY und B. PAUL: *Effect of bacterial growth on the bursting pressure of fetal membranes in vitro*. Obstet Gynecol, 70(1):107–110, Jul 1987.
- [212] SCHINDLER, R., J. MANCILLA, S. ENDRES, R. GHORBANI, S. C. CLARK und C. A. DINARELLO: *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. Blood, 75(1):40–47, Jan 1990.
- [213] SCHOONMAKER, J. N., D. W. LAWELLIN, B. LUNT und J. A. MCGREGOR: *Bacteria and inflammatory cells reduce chorioamniotic membrane integrity and tensile strength*. Obstet Gynecol, 74(4):590–596, Oct 1989.
- [214] SCHRAG, STEPHANIE, RACHEL GORWITZ, KRISTI FULTZ-BUTTS und ANNE SCHUCHAT: *Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC*. MMWR Recomm Rep, 51(RR-11):1–22, Aug 2002.
- [215] SCHRAG, STEPHANIE J., SARA ZYWICKI, MONICA M. FARLEY, ARTHUR L. REINGOLD, LEE H. HARRISON, LEWIS B. LEFKOWITZ, JAMES L. HADLER, RICHARD DANILA, PAUL R. CIESLAK und ANNE SCHUCHAT: *Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis*. N Engl J Med, 342(1):15–20, 2000.
- [216] SCHUBERT, AXEL, KATHERINA ZAKIKHANY, MARK SCHREINER, RONALD FRANK, BARBARA SPELLERBERG, BERNHARD J EIKMANN und DIETER J REINSCHIED: *A fibrinogen receptor from group B Streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites*. Mol Microbiol, 46(2):557–569, Oct 2002.
- [217] SCHUCHAT, A., K. ROBINSON, J. D. WENGER, L. H. HARRISON, M. FARLEY, A. L. REINGOLD, L. LEFKOWITZ und B. A. PERKINS: *Bacterial meningitis in*

*the United States in 1995. Active Surveillance Team.* N Engl J Med, 337(14):970–976, Oct 1997.

- [218] SCHULTZ, CHRISTIAN: *Intracytoplasmic detection of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytes by flow cytometry.* Methods Mol Biol, 215:29–39, 2003.
- [219] SCHULTZ, CHRISTIAN, CHRISTINA ROTT, PETRA TEMMING, JULIA VON PUTTKAMMER, and PETER BUCSKY: *Influence of specimen age and use of different negative controls in determination of intracytoplasmic levels of cytokines after whole-blood culture assay.* Clin Diagn Lab Immunol, 9(2):295–298, Mar 2002.
- [220] SEIFERT, KYLE N, ELISABETH E ADDERSON, APRIL A WHITING, JOHN F BOHNSACK, PAULA J CROWLEY, and L. JEANNINE BRADY: *A unique serine-rich repeat protein (srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype iii streptococcus agalactiae.* Microbiology, 152(Pt 4):1029–1040, Apr 2006.
- [221] SELBY, P., S. HOBBS, C. VINER, E. JACKSON, A. JONES, D. NEWELL, A. H. CALVERT, T. MCELWAIN, K. FEARON, and J. HUMPHREYS: *Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations.* Br J Cancer, 56(6):803–808, Dec 1987.
- [222] SHAPPELL, S. B., C. TOMAN, D. C. ANDERSON, A. A. TAYLOR, M. L. ENTMAN, and C. W. SMITH: *Mac-1 (cd11b/cd18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils.* J Immunol, 144(7):2702–2711, Apr 1990.
- [223] SIBOO, IAN R, HENRY F CHAMBERS, and PAUL M SULLAM: *Role of srp, a serine-rich surface protein of staphylococcus aureus, in binding to human platelets.* Infect Immun, 73(4):2273–2280, Apr 2005.
- [224] SITKIEWICZ, IZABELA, NICOLE M GREEN, NINA GUO, ANN MARIE BONGIOVANNI, STEVEN S WITKIN, and JAMES M MUSSER: *Transcriptome adaptation of group b streptococcus to growth in human amniotic fluid.* PLoS One, 4(7):e6114, 2009.

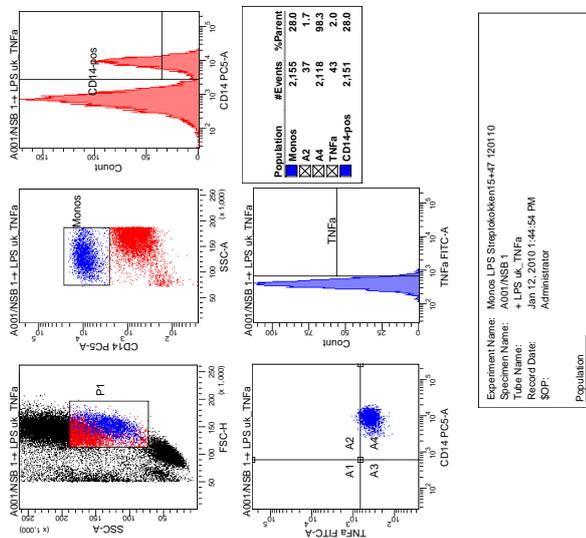
- [225] SKALKKA, B. and J. SMOLA: *Lethal effect of camp-factor and uberis-factor—a new finding about diffusible exosubstances of streptococcus agalactiae and streptococcus uberis.* Zentralbl Bakteriol A, 249(2):190–194, 1981.
- [226] SOBEL, J. D., P. MYERS, M. E. LEVISON, and D. KAYE: *Comparison of bacterial and fungal adherence to vaginal exfoliated epithelial cells and human vaginal epithelial tissue culture cells.* Infect Immun, 35(2):697–701, Feb 1982.
- [227] SORGE, NINA M VAN, DARIN QUACH, MICHAEL A GURNEY, PAUL M SUL-LAM, VICTOR NIZET, and KELLY S DORAN: *The group b streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier.* J Infect Dis, 199(10):1479–1487, May 2009.
- [228] SPELLERBERG, B., S. MARTIN, C. BRANDT, and R. LÜTTICKEN: *The cyl genes of streptococcus agalactiae are involved in the production of pigment.* FEMS Microbiol Lett, 188(2):125–128, Jul 2000.
- [229] SPELLERBERG, B., E. ROZDZINSKI, S. MARTIN, J. WEBER-HEYNEMANN, N. SCHNITZLER, R. LÜTTICKEN, and A. PODBIELSKI: *Lmb, a protein with similarities to the brai adhesin family, mediates attachment of streptococcus agalactiae to human laminin.* Infect Immun, 67(2):871–878, Feb 1999.
- [230] SPRATT, B. G. and K. D. CROMIE: *Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria.* Rev Infect Dis, 10(4):699–711, 1988.
- [231] STERZIK, B. and F. J. FEHRENBACH: *Reaction components influencing camp factor induced lysis.* J Gen Microbiol, 131(4):817–820, Apr 1985.
- [232] STEWARDSON-KRIEGER, P. B. and S. P. GOTOFF: *Risk factors in early-onset neonatal group b streptococcal infections.* Infection, 6(2):50–53, 1978.
- [233] STRIETER, R. M., S. L. KUNKEL, and R. C. BONE: *Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation.* Crit Care Med, 21(10 Suppl):S447–S463, Oct 1993.
- [234] TAKAHASHI, S., Y. NAGANO, N. NAGANO, O. HAYASHI, F. TAGUCHI, and Y. OKUWAKI: *Role of c5a-ase in group b streptococcal resistance to opsonophagocytic killing.* Infect Immun, 63(12):4764–4769, Dec 1995.

- [235] TAKAMATSU, DAISUKE, BARBARA A BENSING, HUI CHENG, GARY A JARVIS, IAN R SIBOO, JOSÉ A LÓPEZ, J. MCLEOD GRIFFISS, and PAUL M SULLAM: *Binding of the streptococcus gordonii surface glycoproteins gspb and hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein ibalpha*. Mol Microbiol, 58(2):380–392, Oct 2005.
- [236] TAKEUCHI, O., K. HOSHINO, T. KAWAI, H. SANJO, H. TAKADA, T. OGAWA, K. TAKEDA, and S. AKIRA: *Differential roles of tlr2 and tlr4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, 11(4):443–451, Oct 1999.
- [237] TAMURA, G. S., J. M. KUYPERS, S. SMITH, H. RAFF, and C. E. RUBENS: *Adherence of group b streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components*. Infect Immun, 62(6):2450–2458, Jun 1994.
- [238] TAMURA, G. S. and C. E. RUBENS: *Group b streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase*. Mol Microbiol, 15(3):581–589, Feb 1995.
- [239] TENENBAUM, TOBIAS, CHRISTIANE BLOIER, RÜDIGER ADAM, DIETER J REINSCHIED, and HORST SCHROTEN: *Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein fbsa of streptococcus agalactiae*. Infect Immun, 73(7):4404–4409, Jul 2005.
- [240] TENENBAUM, TOBIAS, BARBARA SPELLERBERG, RÜDIGER ADAM, MARKUS VOGEL, KWANG SIK KIM, and HORST SCHROTEN: *Streptococcus agalactiae invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein lmb*. Microbes Infect, 9(6):714–720, May 2007.
- [241] TREVISAN, V.: *I generi e le specie delle batteriacee*. 1889.
- [242] VOIGT, MANFRED, NIELS ROCHOW, SEBASTIAN STRAUBE, VOLKER BRIESE, DIRK OLBERTZ, and GERHARD JORCH: *Birth weight percentile charts based on daily measurements for very preterm male and female infants at the age of 154-223 days*. J Perinat Med, 38(3):289–295, May 2010.

- [243] VYAKARNAM, A., S. F. DAGHER, J. L. WANG, and R. J. PATTERSON: *Evidence for a role for galectin-1 in pre-mrna splicing*. Mol Cell Biol, 17(8):4730–4737, Aug 1997.
- [244] WALD, E. R., I. BERGMAN, H. G. TAYLOR, D. CHIPONIS, C. PORTER, and K. KUBEK: *Long-term outcome of group b streptococcal meningitis*. Pediatrics, 77(2):217–221, Feb 1986.
- [245] WEIGERT, JOHANNA, MARKUS NEUMEIER, JOSEF WANNINGER, SABRINA BAUER, STEFAN FARKAS, MARCUS N SCHERER, ANDREAS SCHNITZBAUER, ANDREAS SCHÄFFLER, CHARALAMPOS ASLANIDIS, JÜRGEN SCHÖLMERICH, and CHRISTA BUECHLER: *Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 95(3):1404–1411, Mar 2010.
- [246] WEIHOFEN, ULRIKE: *Proliferationsverhalten von B-Streptokokken und Phagozytose durch neutrophile Granulozyten in Beziehung zum klinischen Verlauf bei neonatalen Infektionen*. Doktorarbeit, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2004.
- [247] WEIMAN, SHANNON, SAMIRA DAHESH, AARON F CARLIN, AJIT VARKI, VICTOR NIZET und AMANDA L LEWIS: *Genetic and biochemical modulation of sialic acid O-acetylation on group B Streptococcus: phenotypic and functional impact*. Glycobiology, 19(11):1204–1213, Nov 2009.
- [248] WEIMAN, SHANNON, SATOSHI UCHIYAMA, FENG-YING C LIN, DONALD CHAFFIN, AJIT VARKI, VICTOR NIZET und AMANDA L LEWIS: *O-Acetylation of Sialic Acid on Group B Streptococcus Inhibits Neutrophil Suppression and Virulence*. Biochem J, Mar 2010.
- [249] WENNEKAMP, JULIA und PHILIPP HENNEKE: *Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis*. Immunol Rev, 225:114–127, Oct 2008.
- [250] WESSELS, M. R., C. E. RUBENS, V. J. BENEDÍ und D. L. KASPER: *Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 86(22):8983–8987, Nov 1989.

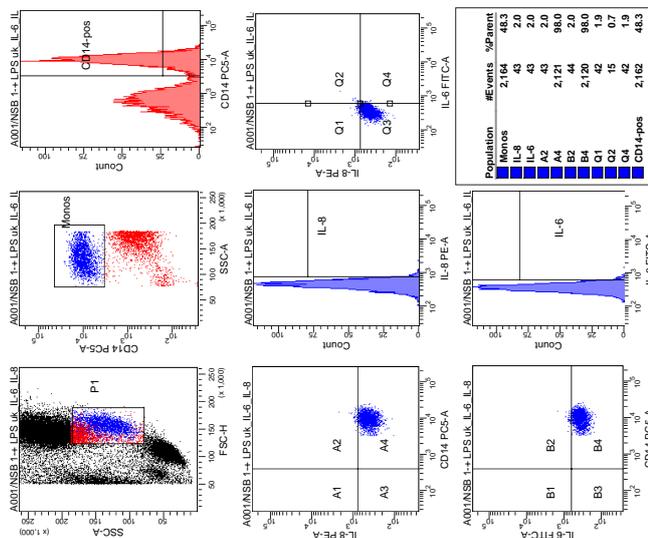
- [251] WILKINSON, H. W. und R. G. EAGON: *Type-specific antigens of group B type Ic streptococci*. Infect Immun, 4(5):596–604, Nov 1971.
- [252] WILKINSON, H. W. und M. D. MOODY: *Serological relationships of type I antigens of group B streptococci*. J Bacteriol, 97(2):629–634, Feb 1969.
- [253] WINRAM, S. B., M. JONAS, E. CHI und C. E. RUBENS: *Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells In vitro*. Infect Immun, 66(10):4932–4941, Oct 1998.
- [254] WOLACH, B., D. SONNENSCHNEIN, R. GAVRIELI, O. CHOMSKY, A. POMERANZ und I. YULI: *Neonatal neutrophil inflammatory responses: parallel studies of light scattering, cell polarization, chemotaxis, superoxide release, and bactericidal activity*. Am J Hematol, 58(1):8–15, May 1998.
- [255] YANG, R. Y., D. K. HSU und F. T. LIU: *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(13):6737–6742, Jun 1996.
- [256] ZEE, K. J. VAN, L. E. DEFORGE, E. FISCHER, M. A. MARANO, J. S. KENNEY, D. G. REMICK, S. F. LOWRY und L. L. MOLDAWER: *IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration*. J Immunol, 146(10):3478–3482, May 1991.
- [257] ZEE, K. J. VAN, E. FISCHER, A. S. HAWES, C. A. HÉBERT, T. G. TERRELL, J. B. BAKER, S. F. LOWRY und L. L. MOLDAWER: *Effects of intravenous IL-8 administration in nonhuman primates*. J Immunol, 148(6):1746–1752, Mar 1992.
- [258] ZENG, YAN, KEITH G DANIELSON, TODD J ALBERT, IRVING M SHAPIRO und MAKARAND V RISBUD: *HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc*. J Bone Miner Res, 22(12):1851–1861, Dec 2007.

# Anhang



Experiment Name: Monos LPS Streptokokken15+47 120110  
 Specimen Name: A001NSB 1  
 Tube Name: + LPS uk, TNFα  
 Record Date: Jan 12, 2010 1:44:54 PM  
 SOP: Administrator  
 Population

(b)

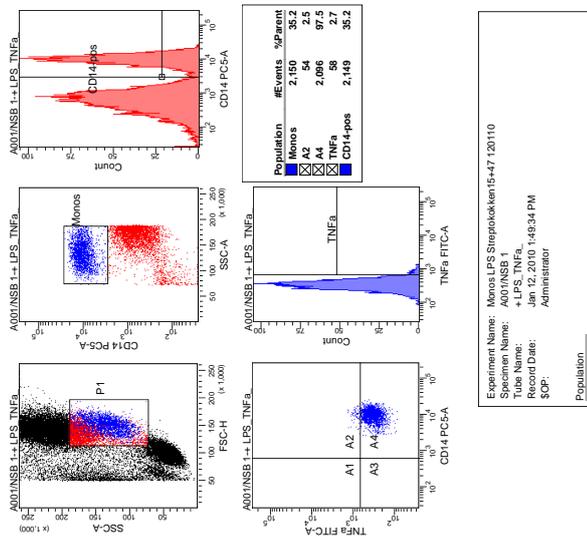


Experiment Name: Monos LPS Streptokokken15+47 120110  
 Specimen Name: A001NSB 1  
 Tube Name: + LPS uk, IL-6, IL-8  
 Record Date: Jan 12, 2010 1:44:09 AM  
 SOP: Administrator  
 Population

(a)

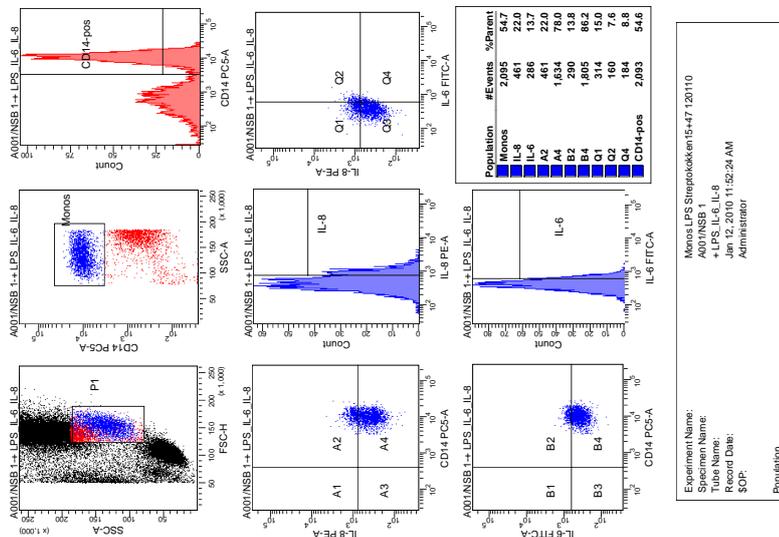
Abbildung 6.1

Grafische und tabellarische Ausgabe der Messdaten des FACS Canto™. Messung von IL-6, IL-8 und TNFα, vorinkubiert mit unkonjugierten Antikörpern, nach Stimulation mit LPS. Die zu messenden Werte sind hier auf 2% eingestellt.



Experiment Name: Monos LPS Streptokokken 15-47 120110  
 Specimen Name: A00/NSB 1  
 Tube Name: + LPS, TNFα  
 Record Date: Jan 12, 2010 1:49:34 PM  
 SOP: Administrator  
 Population: \_\_\_\_\_

(b)

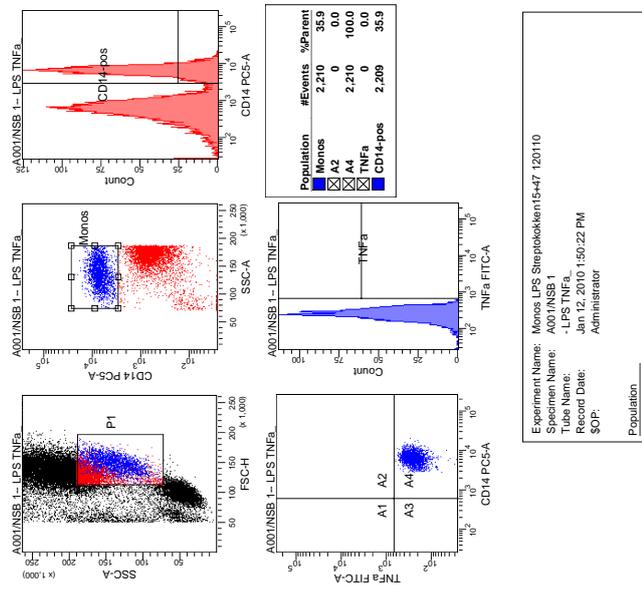


Experiment Name: Monos LPS Streptokokken 15-47 120110  
 Specimen Name: A00/NSB 1  
 Tube Name: + LPS, IL-6, IL-8  
 Record Date: Jan 12, 2010 11:52:24 AM  
 SOP: Administrator  
 Population: \_\_\_\_\_

(a)

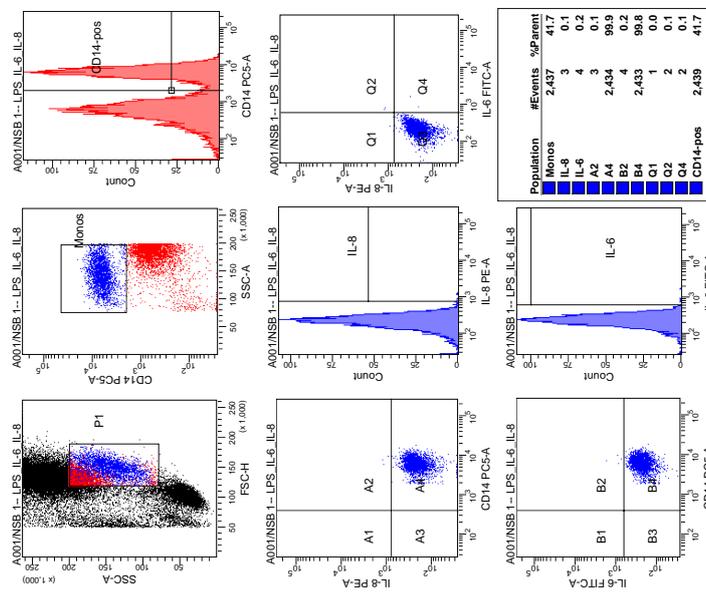
Abbildung 6.2

Grafische und tabellarische Ausgabe der Messdaten des FACS Canto™. Messung von IL-6, IL-8 und TNFα nach Stimulation mit LPS



Experiment Name: Monos LPS Streptokokken15+47 120110  
 Specimen Name: A001NSB 1  
 Tube Name: - LPS TNFα  
 Record Date: Jan 12, 2010 1:50:22 PM  
 SOP: Administrator  
 Population

(b)



Experiment Name: Monos LPS Streptokokken15+47 120110  
 Specimen Name: A001NSB 1  
 Tube Name: - LPS IL-6 IL-8  
 Record Date: Jan 12, 2010 11:54:10 AM  
 SOP: Administrator  
 Population

(a)

Abbildung 6.3 Grafische und tabellarische Ausgabe der Messdaten des FACS Canto™. Messung von IL-6, IL-8 und TNFα ohne Stimulation

## 7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Egbert Herting für die Möglichkeit an seiner Klinik eine Doktorarbeit durchführen zu können, sowie für die Überlassung der GBS Stämme für meine Arbeit.

Ich danke des Weiteren Herrn PD Dr. Christoph Härtel für die Überlassung des Themas sowie für die exzellente Betreuung während der gesamten Zeit der Dissertation.

Mein Dank gilt ferner Frau Anja Sewe sowie Frau Gabi Walter für ihre großartige und fundierte Betreuung und Hilfe während der Arbeit im Labor.

Ich danke allen Hebammen des Kreißsaals für die regelmäßige Entnahme von Nabelschnurblut.

Ich danke meiner Familie für die stetige Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

## 8 Lebenslauf

Name: Martin Demmert  
Geburtsdatum: 13.10.1982  
Geburtsort: Stralsund  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: deutsch



### **Schulbildung**

1989 - 1993 Grundschule Bad Schwartau  
1993 - 2002 Leibniz Gymnasium Bad Schwartau  
06/2002 Abitur

### **Zivildienst**

2002 - 2003 Zivildienst in der Asklepiosklinik Bad Schwartau

### **Studium**

2003 - 2009 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck  
08/2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
11/2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Beruf**

seit 10/2010 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am UKSH Campus Lübeck

### **Doktorarbeit**

2009 - 2012 Gruppe B-Streptokokken-Sepsis - Charakterisierung von Signalwegen und immunmodulatorischer Beeinflussung

## 9 Publikationen

- G. STICHTENOTH, M. DEMMERT, B. BOHNHORST, A. STEIN, S. EHLERS, F. HEITMANN, E. RIEGER-FACKELDEY, D. OLBERTZ, C. ROLL, M. EMEIS, M. MÖGEL, H. SCHIFFMANN, C. WIEG, J. WINTGENS, E. HERTING, W. GÖPEL, C. HÄRTEL: *Major Contributors to Hospital Mortality in Very-Low-Birth-Weight Infants: Data of the Birth Year 2010 Cohort of the German Neonatal Network*. Klin Padiatr. 2012 Mar 22.
- M. DEMMERT, K. FAUST, M.K. BOHLMANN, B. TRÖGER, W. GÖPEL, E. HERTING, C. HÄRTEL: *Galectin-3 in cord blood of term and preterm infants*. Clin Exp Immunol. 2012 Feb;167(2):246-51.
- K. FAUST, M. DEMMERT, M. BENDIKS, W. GÖPEL, E. HERTING, C. HÄRTEL: *Intrapartum colonization with Streptococcus pneumoniae, early-onset sepsis and deficient specific neonatal immune responses*. Arch Gynecol Obstet. 2012 Mar;285(3):599-604. Epub 2011 Jul 30.
- M. DEMMERT, K. FAUST, B. TRÖGER, M. BENDIKS, W. GÖPEL, E. HERTING, C. HÄRTEL: *Gruppe B-Streptokokken-Sepsis - In vitro Zytokinantwort und Stimulierbarkeit von Galectin 3*. Posterbeitrag auf der 37. Jahrestagung der GNPI, 26. - 28. Mai 2011, Mannheim.
- B. HAASE, K. FAUST, M. HEIDEMANN, T. SCHOLZ, M. DEMMERT, B. TRÖGER, A. HERZ, C. HÄRTEL: *The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by Staphylococcus epidermidis*. Inflamm Res. 2011 Mar;60(3):227-32.