

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
der Universität Rostock

Ehemaliger Direktor: Prof. (em.) Dr. med. Peter Schuff-Werner

**Neutrophile Granulozyten  
exprimieren unterschiedliche  
RNA-Sequenzen nach Koinkubation  
mit *E. coli*, ESBL-*E.coli*, *S.aureus*  
und MRSA**

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Sebastian Matthias Gottfried Hesse  
geboren am 13.06.1984 in Ulm  
aus München

Rostock, 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Kreikemeyer,  
Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universität Rostock

2. Gutachter: PD Dr. med. habil. Wolf Splettstößer,  
Clinical Microbiology, MVZ Labor Limbach, Hannover

3. Gutachter: Prof. Dr. vet. med. Heinrich Neubauer,  
Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich Löffler Institut, Jena

Eingereicht am 19.08.2014

Verteidigt am 05.05.2015

## **Widmung**

Gewidmet ist diese Arbeit Herrn Dr. Gerold Ernst,  
mein Lehrer im Leistungskurs Biologie am Kolleg St. Blasien im Jahrgang 2003/04.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	Seite: 1
<b>2. Einleitung</b>	Seite: 2
2.1. Vom Hunnenkönig zum Aschenputtel	Seite: 2
2.2. Von der Granulopoese zur Entzündung	Seite: 3
2.3. Die Mechanismen der Pathogenabwehr durch Neutrophile Granulozyten	Seite: 5
2.4. Die Kommunikation mit anderen Zellen des Immunsystems	Seite: 5
2.5. Die Genexpression Neutrophiler Granulozyten	Seite: 7
<b>3. Fragestellung der Arbeit</b>	Seite: 9
<b>4. Material und Methoden</b>	Seite: 10
4.1. Material	Seite: 10
4.1.1. Bakterienstämme	Seite: 10
4.1.2. Software	Seite: 10
4.2. Methoden	Seite: 11
4.2.1. Blutentnahme	Seite: 11
4.2.2. Isolierung humaner Neutrophiler Granulozyten	Seite: 11
4.2.3. Bereitstellung der Bakterienkulturen	Seite: 12
4.2.3.1. Wachstumskurven der Bakterienkulturen	Seite: 12
4.2.4. Koinkubation der Granulozyten mit Bakterien	Seite: 13
4.2.4.1. Opsonisierung der Bakterien	Seite: 13
4.2.4.2. Anlegen der Koinkubationskultur	Seite: 13
4.2.4.3. Ermittlung der tatsächlich eingesetzten Bakterienmenge	Seite: 13
4.2.4.4. Quantifizierung der Phagozytose	Seite: 14
4.2.4.5. Bestimmung des Beginns der Apoptose und Festlegung des Koinkubationszeitraums	Seite: 14
4.2.5. RNA Isolierung	Seite: 15
4.2.5.1. RNA Isolierung mittels TRIzol und RNeasy Kit	Seite: 15
4.2.5.2. Überprüfung der RNA	Seite: 16
4.2.6. Analyse der Expressionsprofile	Seite: 16
4.2.6.1. Expressionsanalyse mittels Microarray	Seite: 16
4.2.6.2. Expressionsanalyse mittels RTqPCR	Seite: 18
4.2.6.3. Korrelation beider Expressionsanalyseverfahren	Seite: 20
<b>5. Ergebnisse</b>	Seite: 21
5.1. Standardisierung der Granulozytenisolierung	Seite: 21
5.2. Wachstumskurven der Erreger	Seite: 22
5.3. Bestimmung der Apoptose und Festlegung des Koinkubationszeitraums	Seite: 23
5.4. Bestimmung der Phagozytoserate und Festlegung der MOI	Seite: 24
5.5. Bestimmung der tatsächlichen MOI	Seite: 25
5.6. RNA Isolierung und Bestimmung der Qualität und Quantität	Seite: 25
5.7. Genexpressionsanalyse mittels Microarray	Seite: 26
5.7.1. Qualitätskontrolle der eingesetzten RNA Samples	Seite: 26
5.7.2. Ermittlung der "Present Call Rate" und Gesamtanzahl der regulierten Gene	Seite: 27
5.7.3. Hauptkomponentenanalyse	Seite: 29
5.8. Genexpressionsanalyse mittels TaqMan RTqPCR	Seite: 30
5.8.1. Gensequenzen mit statistisch signifikanten Expressionsunterschieden	Seite: 31

5.8.2. Gensequenzen mit gleichmäßiger Expressionserhöhung unabhängig von der Bakterienspezies	Seite: 35
5.8.3. Gensequenzen ohne relevante Expressionsregulation	Seite: 37
5.8.4. Korrelation der Genexpressionsanalyse von Microarray und TaqMan	Seite: 39
<b>6. Diskussion</b>	Seite: 40
6.1. Evaluation des Modells	Seite: 40
6.2. Das Expressionsprofil von PMN nach Bakterienkontakt	Seite: 41
6.2.1. Gesamtheitliche Veränderungen im Expressionsprofil	Seite: 41
6.2.2. Differenziell exprimierte Gensequenzen	Seite: 44
6.2.2.1. Die Expression von CLEC7A	Seite: 44
6.2.2.2. Die Expression von EHD1	Seite: 45
6.2.2.3. Die Expression von FOS	Seite: 46
6.2.2.4. Die Expression von ICAM3	Seite: 48
6.2.2.5. Die Expression von IRAK1	Seite: 49
6.2.2.6. Die Expression von IRAK2	Seite: 50
6.2.2.7. Die Expression von KMO	Seite: 52
6.2.2.8. Die Expression von NOP2	Seite: 53
6.2.2.9. Die Expression von RALGDS	Seite: 54
6.2.2.10. Die Expression von SLC11A2	Seite: 55
6.2.2.11. Die Expression von SRP54	Seite: 56
6.2.2.12. Die Expression von TLR6	Seite: 57
6.2.2.13. Die Expression von TPM3	Seite: 58
6.2.2.14. Die Expression von UBTD2	Seite: 59
6.3. Mögliche Einsatzgebiete der gefundenen Expressionsunterschiede in PMN nach Bakterienkontakt	Seite: 60
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	Seite: 62
<b>8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b>	Seite: 69
<b>9. Danksagung</b>	Seite: 71
<b>10. Selbstständigkeitserklärung</b>	Seite: 72
<b>11. Lebenslauf</b>	Seite: 73
<b>12. Anhang</b>	Seite: 75
12.1. Materialien und Geräte	Seite: 75
12.2. Analysewerte der Koinkubationskulturen: tatsächliche MOI, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte	Seite: 79
12.3. Resistenzmuster der Bakterienstämme	Seite: 81
12.4. Einwilligungserklärung der Blutspender	Seite: 82
12.5. Bescheid der Ethikkommission	Seite: 83
<b>13. Abstract</b>	Seite: 84
<b>14. Thesen</b>	Seite: 85

# Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	= Analysis of variance
CRP	= C reaktives Protein
DCs	= Dendritic Cells
<i>E.coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
ESBL	= Extended Spectrum $\beta$ -Laktamase exprimierender <i>E.coli</i> *
ESR	= Erythrozyten Sedimentations Rate
FDR	= False Discovery Rate
GAPDH	= Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
G-CSF	= Granulocyte Colony Stimulating Factor
KbE	= Kolonie bildende Einheiten
LPS	= Lipopolysaccheride
MCT	= Multiple Comparison Test
MOI	= Multiplicity of Infection
MRSA	= Methicillin Resistenter <i>S.aureus</i>
NK	= Natural Killer Cells
OD	= Optic Density
PAMP-Rezeptoren	= Pathogene Associated Molecular Patterns - Rezeptoren
PCA	= Principal Component Analysis
PMN	= Polymorphonuclear Neutrophils
RIN	= RNA Integrity Number
RTqPCR	= Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>S.aureus</i>	= <i>Staphylococcus aureus</i>

\* Anmerkung: Die Abkürzung ESBL bezieht sich offiziell nur auf das Resistenz verleihende Enzym Extended Spectrum  $\beta$ -Laktamase. Der Einfachheit halber wird aber in dieser Arbeit, mit Ausnahme des Titels und der Thesen, ESBL anstatt ESBL-*E.coli* als Abkürzung für die  $\beta$ -Laktamase exprimierende *E.coli* Spezies verwendet

# 1. Zusammenfassung

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob Neutrophile Granulozyten nach Kontakt mit verschiedenen Bakterien unterschiedliche Genexpressionsveränderungen aufweisen. Der Nachweis von differenziell exprimierten Genen könnte dabei Ansatzpunkte zur Generierung neuer Hypothesen über die Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Bakterien liefern.

Zur Beantwortung der Frage wurden Neutrophile Granulozyten und Bakterien in Koinkubationskulturen zusammengebracht. Nach Optimierung und Standardisierung der Rahmenbedingungen (Erstellung der bakteriellen Wachstumskurven, Bestimmung der Phagozytoserate durch die Granulozyten und Apoptoserate der Zellen in Koinkubation mit den Bakterien) erfolgte die Durchführung von acht unabhängigen Koinkubationsversuchen mit jeweils vier Bakterienspezies (*Escherichia coli*, *Extended spectrum  $\beta$ -laktamase exprimierender E. coli*, *Staphylococcus aureus* und *Methicillin resistenter S. aureus*). Nach 120 Minuten Koinkubationszeit wurde aus den Versuchsansätzen die RNA isoliert und hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität überprüft. Die erste Analyse der Genexpression erfolgte mittels Micro-Array (Human Genome U133plus Arrays von Affimetrix), wobei das Hauptaugenmerk auf Gensequenzen gelegt wurde die bei nur einer der Spezies bzw. einer der Obergruppen (Gram-negative und Gram-positive) hochreguliert waren. Zur Validierung der Micro-Array Ergebnisse wurde daraufhin die Expression von 31 Gensequenzen über eine Real-Time PCR bestimmt und semi-quantifiziert (TaqMan Reverse-Transcription quantitative PCR von Applied Biosystems).

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Genaktivierung in Neutrophilen Granulozyten durch Bakterienkontakt sowohl zu Bakterienspezies-unabhängigen Regulierungen als auch zu Bakterien-spezifischen Transkriptionsveränderungen führt. Am eindeutigsten waren die Unterschiede in der Genregulation zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen. Dabei ergab sich als spezifische Antwort auf Gram-negative Bakterien eine Hochregulation von EHD1, IRAK2 und RALGDS.

Nach Kontakt mit Gram-positiven Bakterien kam es zur Hochregulation von ICAM3, TLR6 und TPM3. Unabhängig von der Bakterienspezies, ergab sich in jedem Koinkubationsversuch eine Hochregulation von DNAJB9 und ICAM1.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Genexpression von Neutrophilen Granulozyten nach Kontakt mit verschiedenen Bakterien tatsächlich unterschiedlich ausprägt. Als theoretische Anwendungsmöglichkeit dieser Erkenntnis wäre es denkbar, pathogenabhängige Wirtsreaktionen bei der Infektionsdiagnostik miteinzubeziehen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Vom Hunnenkönig zum Aschenputtel

1883 untersuchte der Evolutionsbiologe Ellie Metchnikof das Wundgewebe von Seesternlarven. Dabei beobachtete er kleine Zellen, die Partikel von eingebrachten Fremdkörpern in sich aufnahmen. Er teilte sie der Gruppe der Phagozyten (Fresszellen) zu und klassifizierte sie weiter als Microphagen (kleine Fresszellen)<sup>1</sup>. Sein Kollege Paul Ehrlich entdeckte sehr ähnliche Zellen im Blut von Menschen, benannte sie nach Anfärbeversuchen als Granulozyten und prägte die bis heute gültige Unterteilung in Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten<sup>2</sup>. Im englischen Sprachgebrauch werden Neutrophile Granulozyten zumeist als "polymorphonuclear neutrophils" bezeichnet und mit PMN abgekürzt. Diese Abkürzung wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen.

Nach ihrer Entdeckung richtete sich der Großteil der Untersuchungen von PMN auf deren gewebeschädigenden Eigenschaften aus. Ihre Funktion im Immunsystem wurde als die einer schnellen und ungerichteten Sturmtruppe angesehen, bildhaft beschrieben von Babior im Jahre 1984: "Phagozyten randalieren wie Attila der Hunnenkönig. Sie nutzen dabei ein ganzes Arsenal an Waffen, welches sowohl die Ziele als auch die nähere Umgebung so differenziert wie ein Artillerie-Bombardement verwüstet"<sup>3</sup>. Inzwischen haben moderne Erkenntnisse über die zellbiologischen Vorgänge in PMN ihren Ruf als "simple Frontkämpfer" allerdings revidiert. Tatsächlich sind sie eine der ersten Zellarten die auf ein Entzündungssignal im Gewebe reagieren und die ersten Abwehrmaßnahmen gegen Bakterien und Pilze initiieren. Sie weisen dabei aber eine so erstaunlich hohe Empfindlichkeit auf verschiedene Reize auf, dass Kumar und Sharman 2010 beschlossen, den Vergleich mit dem Hunnenkönig endgültig ad acta zu legen und ihnen statt dessen den Titel "Cinderella of the innate immune system"<sup>4</sup> zu verleihen.

In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob der Kontakt mit verschiedenen Bakterien in Neutrophilen Granulozyten zur Transkription von unterschiedlichen Genen führt. Zur Einleitung in das Thema folgt nun ein kurzer Überblick über die zellbiologischen Vorgänge von PMN und eine Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen zu ihrer Transkriptionsaktivität.

## 2.2. Von der Granulopoese zur Entzündung

In einem gesunden Erwachsenen reifen täglich etwa  $1-2 \times 10^{11}$  Neutrophile Granulozyten über den myeloischen Arm der Haematopoese aus Stammzellen heran. Dieser Vorgang wird als Granulopoese bezeichnet. Die Stammzelldifferenzierung zu Granulozyten wird dabei über verschiedene Transkriptionsfaktoren und microRNAs gesteuert<sup>5,6</sup>. Mit nur 7-10 Stunden Lebenszeit im peripheren Blut gehören sie zu den kurzlebigsten Zellen des menschlichen Körpers. Der wichtigste Stimulator der Granulozytenproduktion ist G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), wobei ebenso M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), IL-3 (Interleukin 3), IL-6 (Interleukin 6), IL-17 (Interleukin 17) und IL-22 (Interleukin 22) eine Rolle spielen<sup>5,7</sup>. Die Hauptproduzenten von G-CSF und damit Hauptinduktoren der Granulopoese sind Neutrophile Granulozyten, Neutrophil regulatory T-cells, Monozyten und Makrophagen. Ebenso können Endothelzellen, Fibroblasten und andere mesodermale Zellen G-CSF zu synthetisieren<sup>8</sup>. Die Herabregulation der Granulopoese wird über ein mehrgliedriges Netzwerk von Immunzellen geregelt, welches mit der Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen und Dendritische Zellen beginnt. Nach der Aufnahme vermindern sie ihre Produktion von IL-23 (Interleukin 23), dem wichtigsten Stimulator von IL-17A (Interleukin 17A). IL-17A wirkt auf spezialisierte T-Zellen, die als "Neutrophil regulatory T-cells" bezeichnet werden<sup>9</sup>. Für diese ist IL-17A der Stimulus zur Produktion von G-CSF. Durch die Verminderung von IL-23 wird somit die Produktion von G-CSF herabreguliert und somit die Granulopoese verringert<sup>10</sup>.

Etwa die Hälfte der ausgereiften PMN befindet sich als "marginal-pool" in Knochenmark, Leber, Milz und Lunge. Aus diesem werden unter Aufrechterhaltung des homeostatischen Gleichgewichts kontinuierlich Zellen ins Blut abgegeben, wo sie dann dem "circulating-pool" zugerechnet werden<sup>11</sup>. Als wichtigster Regulator der Homeostase zwischen marginal- und circulating-pool wird der Rezeptor CXCR-4 angesehen. Dieser verankert über die Bindung mit SDF1 (Stromal derived factor 1, auch CXCL12 genannt) die Granulozyten im Knochenmark<sup>12</sup>. Neben der direkten Stimulation der Granulopoese vermindert G-CSF die Expression von CXCR4 auf der Oberfläche reifer PMN. Dadurch verlieren diese ihre Verankerung in den Markräumen und werden ins Blut ausgeschwemmt<sup>13</sup>. Im Durchschnitt finden sich bei gesunden Menschen  $4.5 \times 10^9$  PMN im Blut, wobei diese Anzahl im Rahmen ethnischer Differenzen bei Afroamerikanern im Gesundheitszustand auch nur  $1.5 \times 10^9$  betragen kann<sup>14</sup>. Als Teilnehmer des "circulating pools" patrouillieren Neutrophile Granulozyten hauptsächlich in venösen Kapillaren und tasten dort mit ihren beiden Oberflächenproteinen PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) und L-selectin das Endothel

ab<sup>15</sup>. Ein Entzündungsreiz im Gewebe stimuliert Endothelzellen dazu, auf ihrer luminalen Seite Adhäsionsmoleküle der Selektin und Integrin Superfamilie (ICAMs) auszubilden. Wenn Neutrophile auf diese Moleküle treffen, initiieren sie den Vorgang der Diapedese und durchwandern das Endothel, um in das extravaskuläre Gewebe zu gelangen<sup>16</sup>. Im Blut befinden sich PMN in einer Art inertem Zustand, welcher verhindert, dass sie die zellschädigende Ladung ihrer Granula an unpassender Stelle im Körper freisetzen<sup>17</sup>. Sobald sie aber in Kontakt mit entzündungsstimulierten Endothelzellen kommen, initiieren sie ein Aktivierungsprogramm und durchlaufen, bis zu ihrer Ankunft am Ursprungsort des Entzündungsreizes, verschiedene Aktivierungszustände. Sie folgen im Gewebe einem chemotaktischen Gradienten aus körpereigenen (IL-8) und vom Pathogen stammenden (u.a. LPS und fMLP) Molekülen. Diese binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Neutrophilen (FPR1 und Chemokinrezeptoren) welche über die MAPK/ERK Signalkaskade die Bereitschaft zum oxidativen Burst aktivieren<sup>18</sup>. Zusätzlich läuft über eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren (PAMP Rezeptoren - Pathogene-associated molecular pattern receptors), wie etwa der Toll-like-Familie, eine Klassifizierung des eingedrungenen Pathogens<sup>19</sup>.

Die Apoptosevorgänge von PMN weisen zahlreiche Besonderheiten auf, was insbesondere im Zusammenhang mit ihrer physiologisch sehr kurzen Lebenszeit zu verstehen ist. Die Apoptose von PMN nach Bakterienkontakt wurde von Kobayashi et al. untersucht. Sie wiesen nach, dass sechs Stunden nach der Phagozytose von Bakterien in PMN ein Apoptoseprogramm auf der Transkriptionsebene ausgelöst wird und zeitgleich proinflammatorische Gene herabreguliert werden<sup>20</sup>. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass *Streptococcus pyogenes* ein atypisches Apoptoseprogramm in PMN hervorruft, wobei dies im Zusammenhang mit ihrer Pathogenität stehen könnte<sup>21</sup>. Die Begrenzung der Überlebenszeit von PMN ohne Bakterienkontakt scheint zumindest teilweise durch FAS/FASL reguliert zu werden<sup>22</sup>. Widersprüchlich erscheint, dass der Kontakt mit Bakterien sowohl pro- als auch antiapoptotisch auf PMN wirken kann<sup>23</sup>. Eine weitere Aufklärung dieser Vorgänge könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der immunologischen Vorgänge bei akuten und chronischen Infektionen leisten. Eine aktuelle Fragestellung dabei ist, wie und warum es bei bakteriellen Infektionen nach anfänglicher Heraufregulation zu einer Herabregulation der inflammatorischen Signale in den Immunzellen kommt. Boldrick et al. stellten dazu die These auf, dass durch die Herabregulation der unspezifischen Entzündungsreaktion Störsignale gemindert werden und antigenpräsentierende Zellen besser die Induktion der pathogenspezifischen Immunantwort leisten können<sup>24</sup>. Eine kürzlich erschienene Arbeit wies nach, dass beim Menschen PMN im Sepsisverlauf inaktiviert werden<sup>25</sup>.

### **2.3. Die Mechanismen der Pathogenabwehr durch Neutrophile Granulozyten**

Man unterscheidet zwei Arten der Pathogenbekämpfung durch Neutrophile Granulozyten. Zum einen gibt es die Phagozytose, bei der Bakterien endozytotisch aufgenommen, zerstört und als Antigene präsentiert werden<sup>26</sup>. Bei der zweiten Art der Pathogenbekämpfung kommt es zur extrazellulären Absonderung von verschiedenen antimikrobiellen Molekülen<sup>27</sup>. Die Phagozytose wird über Oberflächenrezeptoren der PMN initiiert. Dabei spielen zum einen PAMP-Rezeptoren eine Rolle, die Strukturen auf der Pathogenoberfläche erkennen<sup>28</sup>. Zum anderen verfügen PMN über Fc $\gamma$ -Rezeptoren, welche die Fc-Region von opsonisierenden Antikörpern binden können<sup>29</sup>. Nach der intrazellulären Aufnahme befinden sich die Bakterien in sogenannten Phagosomen. Die molekularen Mechanismen der Bildung und Prozessierung von Phagosomen in PMN scheinen sich dabei grundlegend von denen in Makrophagen zu unterscheiden<sup>26</sup>. Bei der extrazellulären Bekämpfung von Pathogenen setzen PMN mindestens drei verschiedene Stoffklassen ein. Diese umfassen antimikrobielle Proteine, welche in den Granula gespeichert sind, freie Sauerstoffradikale als Produkt des oxidativen Burst und netzartigen Strukturen aus DNA (NETs: Neutrophil extracellular traps)<sup>30,31</sup>. Die Transkription und Translation der antimikrobiellen Proteine von PMN geschehen während der Granulopoese im Knochenmark. Sie sind in den Granula der ausgereiften PMN gespeichert und werden nach Pathogenkontakt in die Phagosomen wie auch die extrazelluläre Umgebung abgegeben<sup>32</sup>. Neben der direkten Abwehr von Pathogenen dienen die von den PMN abgesonderten Moleküle auch der Kommunikation mit anderen Zellen des Immunsystems<sup>33,34</sup>.

### **2.4. Die Kommunikation mit anderen Zellen des Immunsystems**

Neutrophile Granulozyten sind unter den ersten Zellen des Immunsystems die in Kontakt mit eingedrungenen Pathogenen treten. Nachdem ihr Ruf als simple Haudegen ad-acta gelegt worden war, begannen Untersuchungen um festzustellen, ob sie neben ihrer Fähigkeit allgemeine Entzündungsvorgänge auszulösen auch in der Lage sind, spezifisch mit anderen Zellen des Immunsystems zu kommunizieren. Inzwischen ist bekannt, dass PMN mit einer Vielzahl von Zellklassen des Immunsystems kommunizieren und ihre Signale bei der Aktivierung anderer Immunzellen eine tragende Rolle spielen<sup>35,17</sup>.

Die erste Zytokinantwort nach Aktivierung von PMN basiert auf IL-8. Dieses rekrutiert vor allem weitere Granulozyten an den Ort des Entzündungsgeschehens. Ebenso werden IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  ausgeschüttet, die andere Zellen wie Makrophagen und das Endothel dazu anregen, vermehrt Chemoattraktanten für Neutrophile zu bilden<sup>36</sup>. Nachdem die ersten Neutrophilen mit der Zytokinausschüttung begonnen haben, kommt es neben dem Zustrom

von weiteren PMN auch zur Einwanderung von Monozyten. Als Ursache hierfür wurden eine Reihe monozytenspezifischer Chemoattraktanten wie CCL2, CCL3, CCL20 und CCL19 identifiziert<sup>37</sup>. Ebenso sind verschiedene Proteine in den Granula in der Lage, Monozyten anzulocken, so etwa LL-37, Azurocidin und CG<sup>38</sup>. Neutrophile haben einen verstärkenden Effekt auf die microzidale und phagozytotische Aktivität von Monozyten und Makrophagen<sup>26,38</sup>. In Rückkopplung phagozytieren eingewanderte Monozyten nach ihrer Differenzierung zu Makrophagen apoptotische PMN und unterdrücken hierauf die chemotaktische Rekrutierung weiterer Granulozyten<sup>39</sup>. Dendritische Zellen (DCs) werden von Neutrophilen zum Entzündungsort geleitet, aktiviert und auf die Kommunikation mit Th1-Zellen ausgerichtet<sup>40</sup>. Über eine Rezeptor-Rezeptor Interaktion von Mac-1 und DC-SIGN induzieren sie den Maturierungsprozess von DCs<sup>41</sup>. DCs können nach der Phagozytose von apoptotischen PMN jene Antigene präsentieren, welche zuvor von den PMN selbst prozessiert worden waren<sup>42,43</sup>. Für Natural Killer Cells (NK) wurde gezeigt, dass es bei ihnen im Dreierverbund mit PMN und DCs sowohl zu spezifischen Zytokinsignalen als auch direkten Zell-Zell Kontakten kommt<sup>44</sup>. Des Weiteren bestehen verschiedene Kommunikationsnetzwerke zwischen Lymphozyten und PMN. Sowohl für T-Zellen<sup>45</sup> als auch für B-Zellen<sup>46</sup> wurden dabei spezifische Interaktionen mit Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Dabei wurde zum Beispiel festgestellt, dass bei der Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis* PMN die Antigenpräsentation von DCs an Th4-Zellen beeinflussen<sup>43</sup>.

Zum Abschluss dieser Einleitung sei erwähnt, dass die aktuellen Erkenntnisse der immunologischen Forschung die traditionelle Trennung von unspezifischer angeborener Immunabwehr und spezifischer adaptiver Immunantwort zunehmend in Frage stellen. Dabei stellt sich zum einen die Pathogenerkennung des angeborenen Systems durch eine stetig wachsende Anzahl an neu identifizierten Rezeptoren als überraschend differenziert heraus. Ebenso tragen pathogenabhängige Zellinteraktionen dazu bei, dass zwischen verschiedenen Insulten differenziert werden kann. Zum anderen ist erwiesen, dass die adaptive Immunantwort sowohl bei der Initiierung als auch bei der Aufrechterhaltung der Pathogenabwehr von Interaktionen mit Zellen des angeborenen Immunsystems abhängig ist. Zusammenfassend ist festzustellen, dass jede der Immunzellen eine Vielzahl wichtiger Rollen bei diversen Vorgängen einnimmt und eine strikte Trennung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem heutzutage nicht mehr sinnvoll erscheint.

## 2.5. Die Genexpression Neutrophiler Granulozyten

Die aktive Transkription von Genen in Neutrophilen Granulozyten hat sich als integraler Bestandteil ihrer Differenzierung und Funktionsweise herausgestellt. Wie bereits erwähnt, kontrollieren Transkriptionsfaktoren und microRNAs die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu PMN<sup>5,6</sup>. Hinsichtlich der Chemokinproduktion von PMN ist bekannt, dass sie zumindest teilweise auf de-novo Synthesewegen basiert und auf der Transkriptionsebene reguliert wird<sup>45</sup>. Die ersten Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität von ausdifferenzierten PMN wurden bereits in den 1960er Jahren unternommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Phagozytose wie auch die Glykolyse in PMN unabhängig von mRNA- und Proteinsynthese stattfinden können<sup>47</sup>. Obwohl PMN nur über wenige Ribosomen und ein gering ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum verfügen<sup>48</sup>, mehrten sich in den 1980er Jahren die Anzeichen dafür, dass einige ihrer Funktionen trotzdem von einer aktiven Transkription und Translation abhängig sind<sup>49</sup>. Im Verlauf zeigte sich, dass unstimulierte, im Blut zirkulierende PMN, nur eine marginale RNA-Synthese betreiben. Durch Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin aber wird die mRNA abhängige de novo Synthese von Proteinen in PMN angeregt<sup>50</sup>. Des Weiteren wurde festgestellt, dass ausgereifte Neutrophile Granulozyten mRNA-Sequenzen für Proteine des Zytoskeletts (Actin) und der Zellmembran transkribieren und translatieren<sup>51</sup>. IL-4 wurde 1997 als ein Aktivator der Transkription und Proteinsynthese identifiziert, durch den die Zellmorphologie und Apoptose in PMN beeinflusst werden<sup>52</sup>. Im Jahre 1998 wurde von Itoh et al. erstmalig das gesamte Transkriptionsprofil von PMN untersucht. Dabei wurde eine cDNA-Bibliothek aus frisch isolierten Zellen angelegt, wobei diese keinem weiteren Stimulationsreiz ausgesetzt wurden. Eine unspezifische Aktivierung durch den Isolationsvorgang kann aber angenommen werden. Insgesamt wurden 748 Gene als aktiv transkribiert angegeben. Die Hauptgruppen waren nukleäre Proteine, wie DNA-bindende Proteine, sekretorische Proteine und membrangebundene Proteine aus der MHC Klasse und andere Rezeptoren<sup>53</sup>. Eine der ersten Analysen der Transkriptionsaktivität von Neutrophilen nach Bakterienkontakt führten 2001 Weissman et al. durch. Sie untersuchten mittels Northernblot die mRNA aus Koinkubationsversuchen zwischen PMN, *Yersinia pestis* und *E.coli*. Die Arbeit zeigte, dass der Bakterienkontakt gravierende Veränderungen im Expressionsprofil von Granulozyten hervorruft, wobei die Analyse der Gensequenzen durch die verwendete Technologie nur eingeschränkt möglich war<sup>54</sup>. Kobayashi et al. zeigten 2002 mittels Microarrays, dass PMN nach Verlassen des Knochenmarks nur eine marginale Transkriptionsaktivität aufweisen. Nach Phagozytose von Antikörper-bedeckten Latexkügelchen wurde diese jedoch für 279 Gene aktiviert. Weiterhin wurde beschrieben,

dass spezifische Liganden für FcR (Antikörper-Rezeptor) oder CR (Komplement-Rezeptor) jeweils unterschiedliche Gentranskriptionen in den PMN zur Folge haben<sup>55</sup>. Die nächsten Microarray Untersuchungen unternahmen Malcom et al. 2003, diesmal von LPS (Lipopolysaccharid) stimulierten PMN. Die Arbeit bestätigte im Allgemeinen die Transkriptionsinduktion in stimulierten PMN<sup>56</sup>. Ab 2004 kam es dann zu einer Reihe weiterer Expressionsprofiluntersuchungen, u.a. von PMN aus Wunden, um deren Effekt auf die Heilvorgänge der Haut zu untersuchen<sup>57</sup>, Koinkubationsversuche mit *E.coli* und LPS<sup>58</sup> und Untersuchungen zur Geninduktion durch *Anaplasma phagocytophilum*, einer im Phagosom von PMN überlebenden Bakterienspezies<sup>59</sup>. Borjeson et. al. beschäftigten sich 2005 mit der transkriptions-gesteuerten Apoptose in PMN und verglichen die Expressionsveränderungen durch *Streptococcus pyogenes* und *A. phagocytophilum*, wobei letztere Spezies die Apoptose der Neutrophilen um mehrere Stunden bis Tage verzögerte<sup>60</sup>. In einer der aktuellsten Publikationen zu dem Thema untersuchten Davidson et al. 2013 das Expressionsprofil von PMN und Monozyten aus Nabelschnurblut nach vierstündiger LPS Stimulation. Dabei wurden für PMN 789 Gene als hochreguliert und 2107 Gene als herabreguliert angegeben. Signaltransduktionswege mit verstärkter Transkription in PMN waren dabei MAPK, RIG-1-like-receptor signaling und Toll-like-rezeptor pathways. Die Transkription der Teilnehmer des JAK/STAT Signalwegs wurde nur in Monozyten als erhöht festgestellt, nicht jedoch in PMN<sup>61</sup>.

Zusammengenommen weisen sämtliche Untersuchungen darauf hin, dass die aktive Gentranskription eine tragende Rolle bei der Funktion von PMN spielt. Erste Bemühungen die bisher publizierten Ergebnisse zu einem Gesamtbild im Sinne der Systembiologie zusammenzufügen unternahmen Theilgaard-Monch et al. im Jahr 2006<sup>17</sup>. Sie postulieren mindestens zwei verschiedene Phasen der phagozytoseinduzierten Gentranskription in PMN, eine frühe und eine späte. Genaue Zeitpunkte für beide Phasen werden nicht angegeben, sie beziehen sich vielmehr auf spezifische Funktionen in der frühen und späten Entzündungsantwort. Im Bezug auf andere Publikationen erscheint es jedoch sinnvoll, die frühe Phase den ersten drei Stunden nach PMN Aktivierung durch Pathogenkontakt zuzuordnen. Die späte Phase wäre dann dem Zeitraum zwischen sechs und 24 Stunden zuzurechnen. In der ersten Phase kommt es zu Pathogenkontakt, Phagozytose und Entzündungsförderung durch PMN. Über Zytokine werden PMN, Makrophagen, DCs und T-Zellen angelockt, Fibroblasten zur Wundheilung angeregt und die Angiogenese gefördert. In der späten Phase kommt es zur transkriptionellen Apoptoseinduktion in PMN.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich nach 120 Minuten Koinkubation mit verschiedenen Bakterien unterschiedliche Genaktivitäten in PMN nachweisen lassen.

### 3. Fragestellung der Arbeit

In den letzten Jahren kam es zu zahlreichen neuen Erkenntnissen über Neutrophile Granulozyten. Lange Zeit verkannt als simpel und Schaden-bringend, stehen sie heute als essentieller Bestandteil der angeborenen Abwehr und zentrale Schaltstelle der gesamten Immunantwort im Fokus zahlreicher Forschungsvorhaben. Durch den Nachweis einer aktiven Gentranskription von PMN nach Bakterienkontakt bieten sich moderne Genanalyseverfahren zur Untersuchung ihrer Funktionsweise an. Ein direkter Vergleich der Transkriptionsantwort von PMN auf *E.coli*, ESBL, *S.aureus* und MRSA wurde bisher noch nicht unternommen.

Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, ob sich der Kontakt mit *E. coli*, ESBL, *S. aureus* und MRSA im Genexpressionsmuster von Neutrophilen Granulozyten unterschiedlich ausprägt. Dazu sollten frisch aus Blut isolierte humane PMN zusammen mit Bakterien in sogenannten Koinkubationskulturen zusammengebracht werden. Die aus diesen Versuchsansätzen isolierte mRNA sollte daraufhin mittels Microarray analysiert werden. Aus dieser Analyse als differenziell exprimiert hervorgegangene Gensequenzen sollten im Anschluss per real-time PCR verifiziert und quantifiziert werden. Ziel dieser Untersuchungen sollte der Nachweis von bakterienpepezifischen Genaktivierungen in den PMN sein.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte befinden sich im Anhang unter Kapitel 12.1.

#### 4.1.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind Bestandteil der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Krankenhaushygiene (IMIKRO) der Universität Rostock. Die Resistenzmuster der Bakterien finden sich im Anhang, Kapitel 12.3.

Tabelle 1: Herkunft der zur Koinkubation eingesetzten Bakterienstämme

Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH 5 alpha 1972 ( <i>E.coli</i> )	K12 <i>Escherichia coli</i> strain (ATCC: PTA-4079)
Extended Spectrum Beta-lactamase Exprimierender <i>Escherichia Coli</i> (ESBL)	Klinikisolat des Universitätsklinikums Rostock, Einmalkatheterurin
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S.aureus</i> )	Wundausstrich (ATCC: 29213)
Methicilin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Klinikisolat des Universitätsklinikums Rostock, Rachenabstrich

#### 4.1.2 Software

Tabelle 2: Software zur Datenanalyse

Software	Hersteller
Chip Inspector	Genomatix Software GmbH, Bayerstr. 85a ,80335 München, Deutschland
QR-Manager	Life Technologies Corporation , 5791 Van Allen Way Carlsbad, California 92008, USA
R	www.r-project.org, Version 2.15.3
Excel	Microsoft Deutschland GmbH Konrad-Zuse-Str. 1, 85716 München, Deutschland
Prism5	GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa La Jolla, CA 92037, USA

## **4.2. Methoden**

### **4.2.1 Blutentnahme**

Alle Probanden waren Freiwillige und haben sich ohne Vergütung zur Blutspende bereit erklärt (8 Spender insgesamt, 5 Frauen und 3 Männer im Alter von 22 bis 45 Jahren). Vor der Blutentnahme wurde von jedem Spender eine Einwilligungserklärung unterschrieben, die im Anhang unter Kapitel 12.4 angefügt ist. Der Durchführung der Versuche wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock zugestimmt, der Bescheid findet sich im Anhang unter Kapitel 12.5. Bei der Blutentnahme wurden jedem Probanden jeweils 22 Röhrchen à 7 ml Blut (Gesamtmenge 154 ml) mit Lithium-Heparin als Antikoagulans entnommen. Zusätzlich wurden 4 Röhrchen à 7 ml zur Serumgewinnung und ein 7 ml Röhrchen mit EDTA-Antikoagulans abgenommen. Vor Isolierung der Granulozyten erfolgte für jede Blutspende die Bestimmung des CRP (C-reaktives Protein) mit dem Beckman Coulter AU Analyzer durch Immunopräzipitation und ein großes Blutbild mit dem XE5000 Hematology Analyzer von Sysmex mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie im Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock. Dabei ist ein CRP Wert über 5 mg/l als Ausschlusskriterium gewählt worden, ebenso führten vom Referenzbereich abweichende Blutbilder zum Ausschluss. Den Probanden wurden keine Vorgaben wie etwa zum Nüchternzustand gemacht.

### **4.2.2 Isolierung humaner Neutrophiler Granulozyten**

Die Granulozytenisolierung erfolgte durch isopyknische Zentrifugation mit Hilfe eines Dichtegradientenmediums (PolymorphPrep, Progen, Deutschland) aus Lithium-Heparin antikoaguliertem Vollblut. In die mit 6 ml PolymorphPrep gefüllten Polystyrolröhrchen (Gesamtvolumen 12 ml) wurden je 3-5 ml Blut zugegeben und für 30 min bei 641 g und 20 °C zentrifugiert (gedämpft abgebremst). Danach wurde die Plasma- und Lymphozytenschicht abpipettiert und die Granulozytenschicht in 6 neuen 12 ml-Greiner-Röhrchen gesammelt. Nach Zugabe von einer Volumeneinheit eiskaltem 0,45 % NaCl wurde kurz gemischt und die Proben dann erneut für 10 min bei 641 g und 20 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets mit 2 ml eiskaltem Aqua dest. versetzt und mit der Pipette mehrmals aufgezogen. Nach Lyse der Erythrozyten wurden 2 ml 1,7 % NaCl zugegeben und erneut zentrifugiert (10 min bei 641 g und 20 °C). Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml RPMI 1640 aufgenommen. Mit 450 µl der Suspension wurde im body-fluid Kanal des XE 5000 der Firma

Sysmex die Zellzahl der PMN bestimmt. Für die Vitalitätskontrolle wurden 25 µl der Zellsuspension mit 35 µl Trypanblaulösung versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert, im Anschluss wurden 100 Zellen hinsichtlich der Farbstoffaufnahme beurteilt.

### **4.2.3 Bereitstellung der Bakterienkulturen**

Die Bakterien wurden auf Spezies-entsprechenden Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Diese Kulturform wurde zum Ausplattieren der Verdünnungsreihen und zur Passagierung/Aufbewahrung der Kulturen genutzt. Für die Experimente wurden Keime aus einer exponentiell wachsenden Flüssigmedium-Kultur eingesetzt. Zunächst wurde am Vorabend des Experiments eine Über-Nacht-Kultur wie folgt hergestellt: Der Keim wurde in 35 ml Spezies-entsprechendem Medium durch Beimpfen mit einer Impföse ausgebracht und bei 37 °C 16 h im Schüttler bei 180 rpm ohne CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Die im Experiment verwendete Bakterienkultur mit 100 ml Medium wurde durch ein Aliquot aus der Über-Nacht-Kultur auf eine Optische Dichte (OD) von 0,2 eingestellt und bei 37 °C für 2,5 h im Schüttler ohne CO<sub>2</sub> Begasung bei 180 rpm inkubiert. Die Keimdichte wurde über die Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm am Photometer ermittelt. Ab einer OD von über 1 wurde dabei mit einer Verdünnung von 1:10 gearbeitet. Im Anhang finden sich unter Kapitel 12.1 in Tabelle 9 und 10 die verwendeten Nährmedien für die jeweiligen Bakterienspezies.

#### **4.2.3.1 Wachstumskurven der Bakterienkulturen**

Für jedes Bakterium wurde das spezifische Wachstumsverhalten untersucht, um das jeweilige Zeitfenster des exponentiellen Wachstums und die dazugehörige Kolonie bildenden Einheiten (KbE = Anzahl der Bakterien in einer festgelegten Menge Flüssigmedium) zu bestimmen. Wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben, wurden von den jeweiligen Bakterienstämmen Kulturen angelegt und zu aufeinander folgenden Zeitpunkten im Abstand von jeweils 30 bis 60 Minuten ein Aliquot von 400 µl entnommen. Aus je 100 µl der entnommenen Probe wurde jeweils dreimal eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt, wobei jeweils die Verdünnungen von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-7</sup> auf Agarplatten ausgestrichen wurden. Die beimpften Agarkulturen wurden nach 24 h Wachstumszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zur Bestimmung der KbE ausgezählt. Diese Wachstumskinetiken wurden zur Bestätigung 5-7 mal bestimmt. Mit einem weiteren Aliquot wurde zu jedem Entnahmezeitpunkt die OD gemessen.

## **4.2.4 Koinkubation der Granulozyten mit Bakterien**

### **4.2.4.1 Opsonisierung der Bakterien**

Parallel zur Granulozytenisolierung wurden aus den für das Experiment angesetzten Kulturen der entsprechenden Bakterien (Kulturbedingungen siehe Kapitel 4.2.3) die benötigte Menge zur Opsonisierung entnommen. Mit Hilfe der OD wurde ermittelt, ob sich die jeweilige Kultur gemäß der zuvor gewonnenen Wachstumskurven (siehe Kapitel 4.2.3.1) in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Die für die Koinkubation benötigte Keimzahl wurde nach entsprechender Berechnung entnommen. Ein weiteres Aliquot der Bakterienkultur wurde zeitgleich zur Bestimmung der tatsächlichen KbE ausgestrichen (siehe Kapitel 4.2.4.3). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 4000 g für 10 min pelletiert und in frischem Medium mit einem Anteil von 10 % Serum des jeweiligen Spenders resuspendiert. Danach wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die so opsonisierten Bakterien wurden für die Koinkubation eingesetzt.

### **4.2.4.2 Anlegen der Koinkubationskultur**

Pro Zellkulturschale wurden 16 x 10<sup>6</sup> PMN in 2 ml RPMI 1640 mit 10 % Serum aufgegeben. Vor Einsatz der PMN zur Koinkubation wurden sie in den Petrischalen für mindestens 20 Minuten auf Eis gekühlt. Es wurden je fünf Zellkulturschalen angelegt, von denen vier mit den jeweiligen Bakterienspezies versetzt wurden und eine als Negativkontrolle diente. Die Kulturschalen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 120 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und die darin befindlichen Granulozyten durch Zentrifugation (10 min, 300 g) sedimentiert. Die Pellets wurden in den Bakterien zugeordneten Röhrchen gesammelt. Auf die in den Petrischalen verbliebenen Granulozyten wurde im Anschluss 1 ml TRIzol zur Zellyse gegeben. Daraufhin wurden sie gründlich mit Zellspateln abgeschabt und nach vollständiger Lyse auf das Pellet im zugehörigen Röhrchen überführt, um dieses ebenfalls zu lysieren. Das TRIzol-Lysat wurde daraufhin bei –80 °C gelagert und im Anschluss, wie unter Kapitel 4.2.5 beschrieben, weiterbearbeitet.

### **4.2.4.3 Ermittlung der tatsächlich eingesetzten Bakterienmenge**

Aus den jeweiligen eingesetzten Bakterienkulturen wurde zeitgleich zu den Inkubationsversuchen ein Aliquot in den Verdünnungen von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-7</sup> zur Bestimmung der tatsächlichen Bakterienanzahl ausgestrichen. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die jeweiligen KbE ausgezählt und damit das tatsächliche Verhältnis von Bakterien zu Granulozyten am Versuchstag ermittelt.

#### **4.2.4.4 Quantifizierung der Phagozytose**

Der Nachweis der Phagozytose der Bakterien durch die Granulozyten erfolgte in einem Vorversuch mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierzu wurde eine exponentiell wachsende Bakterienkultur angelegt und die gemessene OD und die entsprechend angenommenen KbEs durch Ausstrichkulturen überprüft. Die Färbung der Bakterien erfolgte mittels Vybrant CFDA-SE (Carboxy-Fluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) Cell Tracer Kit nach Herstellerangaben. Die so gefärbten Bakterien wurden dann wie unter Kapitel 4.2.4 zur Koinkubation eingesetzt, wobei zur Ermittlung der optimalen Multiplicity of Infection (MOI = Verhältniss PMN zu Bakterien) für die Zeitpunkte 30, 60, 90 und 120 min jeweils ein Verhältnis von 1 zu 2, 1 zu 5, 1 zu 10 und 1 zu 15 angesetzt wurde. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand aus den Kulturen vorsichtig abgenommen und die PMN mit 1-2 Tropfen Evan's Blue Lösung (15 Tropfen Evan's Blue Stammlösung in 60 ml 1xPBS) gefärbt. Durch anschließende Fluoreszenzmikroskopie und Auszählung von 100 Granulozyten konnte der Prozentsatz von PMN die Bakterien phagozytiert hatten bestimmt werden.

#### **4.2.4.5 Bestimmung des Beginns der Apoptose und Festlegung des Koinkubationszeitraums**

Im Rahmen dieser Vorversuche sollte ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt die Koinkubationszeit beendet werden muss. Die Zielvorgabe war dabei, dass einerseits die phagozytoseinitiierte Genexpression lange genug ablief, um genügend RNA zu liefern, andererseits aber die apoptotische Enzymkaskade im Großteil der Zellen noch nicht aktiviert worden war. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit Hilfe des Cell Death Detection ELISaplus. Der Test basiert auf der Bestimmung von Nucleosomen (Histongebundene DNA-Fragmente, die zellphysiologisch zu Beginn der Apoptose gebildet werden) im Sandwich-ELISA. Die Isolierung der Granulozyten aus Li-Heparin-Vollblut erfolgte wie unter Kapitel 4.2.2 beschrieben. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 ohne Phenol aufgenommen und eine Konzentration von 100 000 Zellen /ml eingestellt. Die Koinkubationskultur wurde, wie unter Kapitel 4.2.3.4 beschrieben, angesetzt und 30 min mit 10 % autologem Serum opsonisiert. Die Verhältnisse Granulozyt zu Bakterien betragen 1:10 und 1:1. Für jeden Zeitpunkt wurde eine 96er Kulturplatte angelegt. Die genutzten Wells wurden mit je 20 µl Serum vorbeschichtet, die in den Wells verblieben. In jedes Well wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben. Es wurden Inkubationszeiträume von 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 min gewählt, wobei für den Zeitpunkt 0 (nicht infizierte Granulozyten unmittelbar vor der Koinkubation) direkt ein Zellpellet lysiert wurde. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit

wurden die Zellen 10 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig aus den einzelnen Wells entnommen und ebenfalls auf Nukleosomen untersucht. Das Zellpellet in jedem Well wurde mit 200 µl Lysepuffer lysiert. Dazu wurde die Probe mehrmals mit der Pipette auf- und abgezogen und die Probe mindestens 30 min bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert. Danach wurde der ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt und bei 405 nm im Mikroplattenspektralphotometer gegen Substratlösung als Blank gemessen. Der Apoptosenachweis geschah sowohl für die Zelllysate als auch die Überstände der Koinkubationskulturen, um auch möglicherweise vom Gefäßgrund abgelöste apoptotische Zellen zu erfassen.

## **4.2.5 RNA Isolierung**

### **4.2.5.1 RNA Isolierung mittels TRIzol und RNeasy Kit**

Für die RNA-Isolierung wurde aus den Granulozyten ein Lysat mit TRIzol hergestellt und anschließend eine gegenüber den Herstellerangaben modifizierte RNA-Isolierung mit RNeasy-Säulchen gewählt. Die Zellen wurden in 0,2 ml TRIzol /  $1 \times 10^6$  Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mittels einer Pipette lysiert. Das Lysat wurde anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform je ml TRIzol. Nach 15 sec starkem manuellem Schütteln der Probe sowie 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 15 min bei 6 °C und 1200 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden pro 1 ml wässriger Phase 3,5 ml RLT-Puffer und 2,5 ml abs. Ethanol zugegeben, gemischt und in 0,7 ml Aliquots auf die vom Hersteller mitgelieferte RNeasy-Säule gegeben, die bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert wurde. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das gesamte Volumen auf eine Säule aufgetragen war. Es schloss sich folgender Waschschrift an: Zugabe von 350 µl RW1 Puffer auf die Säule, die bei 8000 g 15 sec zentrifugiert wurde, der Unterstand wurde verworfen. Durch Zugabe von 80 µl DNase Lösung (QIAGEN) und Inkubation der Probe für 15 min bei 20-30 °C wurden die DNA-Kontaminationen beseitigt. Danach erfolgte direkt die Zugabe von 350 µl RW1 Puffer auf die Säule, die bei 8000 g, 15 sec zentrifugiert wurde. Der Unterstand wurde verworfen. Die Membran wurde durch Zugabe von 500 µl RPE Puffer und Zentrifugation bei 8000 g, 15 sec gewaschen, der Unterstand verworfen. Anschließend wurde noch einmal 500 µl RPE Puffer auf das Säulchen gegeben und bei 8000 g 2 min zentrifugiert, der Unterstand wurde verworfen. Dabei wurde beim letzten Schritt darauf geachtet, dass die Säule keinen Kontakt mehr mit dem Unterstand hatte. Zum Eluieren der RNA wurde das Säulchen in ein frisches

Tube eingesetzt und anschließend 50 µl RNase freies Wasser aufgegeben und bei 8000 g 1 min zentrifugiert. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

#### **4.2.5.2 Überprüfung der RNA**

Als standardisierter Qualitätsmaßstab der RNA diene die RNA-Integrity-Number (RIN). Die Messung erfolgt mit 1 µl RNA Isolat mittels RNA-PicoLabChip und dem 2100 Bioanalyzer der Firma Agilent. Dabei wird die RNA über eine Elektrophorese in Einzelfragmente aufgetrennt. Die Degradation des Materials zeigt sich durch die Abnahme des Verhältnisses zwischen den Banden der ribosomalen 18S und 28S Untereinheiten und dem vermehrten Auftreten kurzer RNA-Fragmente. Die dem System zugehörige Software berechnet aus diesen Parametern die RIN, wobei ab einem RIN-Wert über 5 das Material für Expressionsanalysen geeignet ist<sup>62</sup>. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch photometrische Messung mit dem NanoDrop.

#### **4.2.6 Analyse der Expressionsprofile**

Die Analyse der Expressionsprofile erfolgte in zwei Schritten. Als erstes wurde mittels Microarrays eine Übersicht des gesamten Genexpressionsmusters angefertigt. Als zweites wurden 32 Gene ausgewählt, um über eine semi-quantitative PCR validiert zu werden.

##### **4.2.6.1 Expressionsanalyse mittels Microarray**

Die Analyse des Expressionsprofils erfolgte mittels des Human Genome U133 Plus 2.0 Array des Herstellers Affymetrix. Es erfasst mittels 54.000 „probesets“ etwa 47.000 Transkripte, abgeleitet von 38.500 annotierten Genen. Dabei wurden Markierungs- und Hybridisierungsprotokolle des Herstellers Affymetrix zu Bearbeitung von 3'-IVT Microarrays (3' - in vitro translation) benutzt. Die Gene werden auf den Microarrays durch jeweils 11 bis 20 Oligospezifitäten repräsentiert, denen zusätzlich je ein Feld mit einem artifiziell eingeführten „Mismatch-Oligonukleotid“ zugeordnet ist, das sich lediglich um ein Nukleotid vom „Perfectmatch-Oligonukleotid“ unterscheidet. Die Spezifität der Hybridisierung und die Quantität der vorhandenen cRNA wird durch den Abfall der Fluoreszenzemission auf dem Mismatch-Feld gegenüber dem Perfectmatch-Feld kontrolliert. Die Redundanz von 11fach bis 20fach erlaubt es mit Hilfe der Systemsoftware (MicroArray Suite 5.0 bzw. GCOS 1.4) eine Signifikanzberechnung der erhaltenen Signale durchzuführen. Eine Hintergrundberechnung und -subtraktion erfolgt automatisch. Eine Normalisierung anhand ausgewählter Gene kann ebenso verwendet werden wie ein „global scaling“

Algorithmus um die Expressionsanalysedaten mehrerer hybridisierter Arrays zu vergleichen. Zur Durchführung der Affymetrix GeneChip Hybridisierungen wurden im Proteomzentrum Rostock „Standardized Operating Procedures“<sup>63</sup> definiert und nach diesem Verfahren im Labor für Immunologie der Universität Rostock unter Leitung von Herrn Dr. Koczan durchgeführt. Pro Bakterienspezies wurde die RNA aus mindestens drei Koinkubationsversuchen für die Microarrayanalyse ausgewählt. Die für die Chips eingesetzte RNA Menge betrug jeweils 500 ng.

Der erste Schritt zur Bearbeitung der Rohdaten der Microarray Experimente erfolgte mit der Software ChipInspector von Genomatix. ChipInspector extrahiert die Expressionswerte von Microarrays auf Ebene der einzelnen Sonden und annotiert diese über die Gendatenbank ELDorado. Die statistische Auswertung erfolgt dabei nach einem Algorithmus von Goss Tusher<sup>64</sup>. Die Microarray Daten werden zunächst auf der Einzelsondenebene normalisiert. Dabei werden die Expressionswerte mittels t-Test gegen einen zufällig permutierten, künstlichen Hintergrund überprüft. Im Anschluss geschieht eine relative Quantifizierung der Werte durch Berechnung des Verhältnis der Expressionswerte der Koinkubationsansätze (Granulozyten mit Bakterien) und der entsprechenden Negativkontrollen (Granulozyten ohne Bakterienkontakt). Dieses Verhältnis der verschiedenen Genexpressionslevel wird im Englischen als Foldchange bezeichnet und in dieser Arbeit ebenso verwendet. Im Anschluss an die Normalisierung und relativen Quantifizierung erfolgte die Annotierung der Einzelsonden. Bei der Auswertung wurden die Stringenzbedingungen mit einer Falschpositivrate (FDR = False Discovery Rate) von maximal 0,2 % sehr streng gewählt. Die so aufbereiteten Daten wurden als Excel-Datei exportiert. In einer Übersichtstabelle wurden alle Gene mit den entsprechenden Foldchangewerten zusammengestellt und mit den Ergebnissen aus Publikationen, die ebenfalls das Expressionsprofil von PMN untersucht haben, ergänzt<sup>65,58,66,21,60</sup>. Anhand dieser Tabelle wurden insgesamt 32 Gene für die Belegung des TaqMan Arrays ausgewählt. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf jene Gene gelegt, die bei einzelnen Bakterienspezies oder Hauptgruppen (Gram-positiv und Gram-negativ) als unterschiedlich reguliert angezeigt wurden.

#### 4.2.6.2 Expressionsanalyse mittels RTqPCR

Die Validierung der mit dem Microarray gefundenen differentiellen Genexpressionsdaten geschah für insgesamt 32 Kandidatengene mittels der Reverse-Transkriptase basierten Polymerase-Kettenreaktion (RTqPCR = reverse-transkriptase quantitative polymerase-chain-reaction) durch das TaqMan low-density-array von Applied Biosystems. Dieses ermöglicht mit hoher Sensitivität und geringem RNA Mengeneinsatz (800 ng für 384 Reaktionen) die Semiquantifizierung von Expressionswerten. Es wurde das sogenannte "user-customized-array" genutzt, bei dem der Anwender die für die zu untersuchenden Gensequenzen passenden Primer der einzelnen PCR Reaktionen selbst bestimmt. Dabei wurde ein Format gewählt, bei welchem 32 genspezifische Reaktionen in Dreifachbestimmung für die gleiche Probe durchgeführt werden können. Bei der Auswahl der Primer-Sondenkombinationen wurde auf die vom Hersteller getestete mRNA-Spezifität geachtet, welche durch intronüberspannende Sequenzen die spezifische Amplifikation von cDNA sicherstellt. Um falsch-positive Replikationen von eventuell verunreinigenden, bakteriellen Nukleinsäuren zu vermeiden, wurden ausschließlich humanspezifische Gensequenzen ausgewählt. Zur Normalisierung diente GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase) als Referenzgen, die Werte für GAPDH der Einzelproben sind im Anhang in den Tabellen 12 und 13 vermerkt. Die reverse Transkription wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Je Reaktion wurden 2 µl 10xRT-Puffer, 0,8 µl dNTP's (100 mM), 2 µl 10x random hexamers, 1 µl reverse Transkriptase, 1 µl RNASE-Inhibitor und 3,2 µl PCR-Wasser gemischt. Hierzu wurden 250 ng RNA-Isolat und PCR-Wasser ad 20 µl gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 25 °C, 2 h bei 37 °C und 10 min bei 85 °C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PCR-Wasser auf 110 µl aufgefüllt und mit 110 µl des PCR-Mastermixes versetzt. Je 100 µl dieses Ansatzes wurden in einen Kanal des TaqMan low-density-Arrays gegeben. Jede Probe wurde dabei in 2 aufeinanderfolgende Kanäle gefüllt, die jeder 48 Vesikel versorgen. In diesen liegen die genspezifischen Assays in Form von lyophilisierten Primer-Sonden-Kombinationen vor. Durch Zentrifugation erfolgt die simultane Befüllung der Vesikel mit jeweils einem Mikroliter der cDNA Reaktionsansätze. Durch Quetschung der Aluminiumunterseite der Arrayplatten werden die Vesikel versiegelt, so daß im Verlauf der PCR Reaktion keine Durchmischung der genspezifischen Reaktionen stattfindet. Das Konfigurationssetup und die Assay-Info-File für den TaqMan werden vom Hersteller als Datei für die spezifische Plattenkonfiguration mitgeliefert und wurden entsprechend den Vorgaben im Plate-Wizard aktiviert. Das Thermoprofile wurde auf 45 repeats (Zykluswiederholungen) eingestellt. Nach deren Abschluss speichert das System die RTqPCR Daten als SDS Datei.

Die Berechnung der RTqPCR Expressionswerte der einzelnen Gene erfolgte mit dem RQ Manager. Zur ersten Normalisierung wurde jedem Reaktionsablauf GAPDH als Referenzgen zugeordnet. Daraufhin erfolgte die relative Quantifizierung durch Vergleich mit der Negativkontrolle nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  - Methode von Livak und Schmittgen<sup>67</sup>. Das Prinzip der Quantifizierung beruht darauf, die Anzahl der Genkopien der Zielsequenzen beim Erreichen des Threshold Levels (= Ct Wert) zuerst anhand des Threshold Levels des Referenzgens in der selben Probe zu normalisieren (=  $\Delta Ct$ ). Dadurch werden natürlich auftretende Schwankungen in der DNA Menge pro Vesikel ausgeglichen. Im folgenden Schritt wird die Anzahl der Genkopien in der Negativkontrolle mit jener aus dem Sampel verglichen, wodurch sich der relative Unterschied der Expressionswerte ergibt (=  $\Delta\Delta Ct$ ). Durch den Logarithmus zur Basis 2 errechnet sich dann der Foldchange Wert. Aus diesem geht hervor, um welches Vielfache sich die Anzahl der Zielgensequenzen in dem untersuchten Sample im Verhältnis zur Negativkontrolle verändert hat. Ein Foldchangewert von 1 (=  $2^0$ ) bedeutet dabei keine Veränderung, das heißt, dass in der untersuchten Probe und in der zugehörigen Negativkontrolle dieselbe Anzahl von Genkopien enthalten war. Alle Werte unter 1 weisen auf eine Verminderung der Expression hin, alle Werte größer als 1 bedeuten eine Steigerung. Im nächsten Schritt wurden die so errechneten einzelnen Foldchangewerte in dem Programm Prism5 tabellarisch zusammengestellt und nach Bakterien gruppiert. Durch den sehr anspruchsvollen Versuchsaufbau konnte es trotz zahlreicher Kontrollen nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass es zu Schwankungen in der Qualität der RNA kam. Es erschien daher sinnvoll, die  $\Delta\Delta Ct$  der einzelnen Gene auf Ausreißer zu testen. Dazu wurde Grubb's test for outliers (Grubbs Ausreißertest) angewand. Dieser ermittelt aus der Gruppe der Werte, die von den jeweiligen Genen und einzelnen Bakterienspezies ermittelt wurde, jene, deren sogenannter Z-Wert einen bestimmten Bereich überschreitet. Dabei spiegelt sich wider, wie weit die einzelnen Werte vom Mittelwert der Gesamtmenge unter Berücksichtigung der Standartabweichung entfernt sind. Die Berechnung erfolgte über den online verfügbaren Quickcalcs Rechner von Graphpad<sup>68</sup>, welcher auf der Publikation von Vic Barnett und Toby Lewis basiert<sup>69</sup>. Die Berechnung erfolgte dabei pro Gruppe nur einmal und wurde nach Ausschluss des Ausreißerwertes nicht wiederholt.

Die verschiedenen Expressionswerte pro Gen, die sich aus den einzelnen Koinkubationsexperimenten pro Bakterium ergaben, wurden nach Entfernung der Ausreißer über eine Einzelfaktor-ANOVA (Analysis of variance) daraufhin überprüft, ob sich die Mittelwerte der Gruppen insgesamt voneinander unterscheiden. Bei einem  $p \leq 0.005$  wurde als Posttest Tukey's-Multiple-Comparison-Test (Tukey's MCT) angewendet. Dieser berechnet die Signifikanz der Unterschiede aller Mittelwerte der einzelnen Gruppen untereinander. Die Ergebnisse der RTqPCR Analysen wurden als Scatter-Blot mit Einzelwerten, Mittelwert und

95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Aufteilung erfolgte nach Gensequenzen mit statistisch signifikanten Expressionsunterschieden in Kapitel 5.8.1, Gensequenzen mit gleichmäßig hohen Expressionswerten über dem Threshold von 1.5 in Kapitel 5.8.2 und Gensequenzen ohne Threshold überschreitender Expressionsregulation in Kapitel 5.8.3. Für die Festlegung einer relevanten Foldchange-Veränderung als Threshold gibt es aktuell keine verbindlichen Regeln. In Anlehnung an Empfehlungen aktueller Publikationen wurde für diese Arbeit ein Threshold von 1.5 für eine relevante Expressionsregulation angenommen<sup>70,71</sup>.

#### **4.2.6.3 Korrelation beider Expressionsanalyseverfahren**

Um die Ergebnisse von RTqPCR und Microarray miteinander zu korrelieren, erfolgte die Eintragung der logdiff-Werte beider Verfahren nach Bakterienspezies getrennt in ein Koordinatensystem und Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r^2$  nach Pearson.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Standardisierung der Granulozytenisolierung

Die unter Kapitel 4.2.2 beschriebene Granulozytenisolierung aus heparinisiertem Vollblut lieferte PMN in einer Ausbeute von 20 bis 45%. Die ermittelte Reinheit betrug mindestens 96% (Durchschnittlich 97,7%). Die Vitalität lag bei allen verwendeten Isolaten über 95%.

Tabelle 3: Ergebnisse der Granulozytenisolierung

Versuchsdatum	Abnahmemenge von Lithium-Heparin Vollblut (ml)	Ausbeute Granulozyten absolut ( $\times 10^6$ )	Vitalität (in % von 100 Zellen)	Reinheitsgrad (%)	CRP (mg/l)
30.09.09	154	434,3	> 95	96,3	< 1,00
19.11.09	154	443,5	> 95	98,3	< 1,00
07.01.10	154	592,9	> 95	97,9	< 1,00
14.01.10	154	448,1	> 95	97,8	< 1,00
11.06.10	154	463,5	> 95	98	< 1,00
12.07.10	154	471,2	> 95	96,8	< 1,00
15.07.10	154	554,4	> 95	98,1	< 1,00
20.07.10	154	398,9	> 95	98,3	< 1,00

## 5.2. Wachstumskurven der Erreger

Die Wachstumskurven aller eingesetzten Bakterienspezies (*E.coli*, ESBL, *S.aureus* und MRSA) wurden bestimmt. Dadurch konnte anhand der OD der für die Experimente eingesetzten Bakterienkulturen nach einer bestimmten Wachstumszeit ermittelt werden, mit welcher KbE die Bakterien sich in ihrem exponentiellen Wachstum befinden. In Abbildung 1 sind diese Kurven dargestellt.

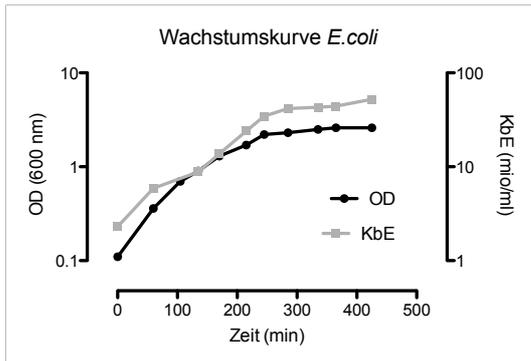


Abbildung 1a: Zunahme von OD und KbE der Flüssigkultur von *E.coli* über die Zeit

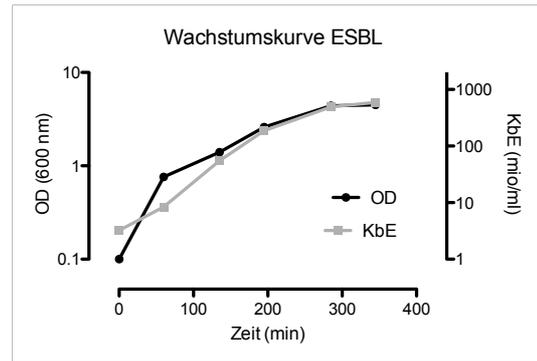


Abbildung 1b: Zunahme von OD und KbE der Flüssigkultur von ESBL über die Zeit

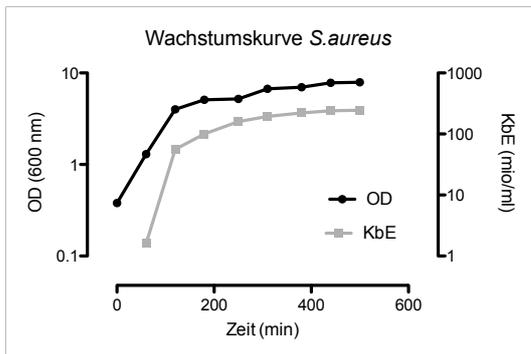


Abbildung 1c: Zunahme von OD und KbE der Flüssigkultur von *S.aureus* über die Zeit

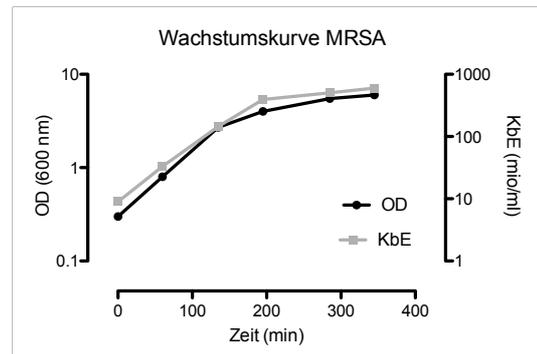


Abbildung 1d: Zunahme von OD und KbE der Flüssigkultur von MRSA über die Zeit

Abbildung 1 a-d: Wachstumskurven der verwendeten Bakterienspezies in Flüssigkultur

Über den ermittelten funktionellen Zusammenhang von Zunahme der OD und KbE aufgrund des bakteriellen Wachstums über die Zeit konnte die MOI für die eigentlichen Koinkubationsexperimente kontrolliert werden. Dies erfolgte über die vor Oponisierung ermittelte OD, die zusätzlich bei jedem Experiment retrospektiv durch Ermittlung der KbE überprüft wurde. Durchschnittlich lag die MOI bei 8,9. Die Bakterienverhältnisse aller Einzelversuche sind im Anhang unter Tabelle 12 und 13 aufgeführt.

### 5.3. Bestimmung der Apoptose und Festlegung des Koinkubationszeitraums

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte für *E.coli* und *S.aureus* als jeweilige Vertreter der in den Versuchen eingesetzten Bakterienspezies. Durch die Untersuchungen konnte die optimale Inkubationsdauer von 120 Minuten festgelegt werden. Die Experimente zeigten, dass weder bei einem Granulozyten/Erreger Verhältnis von 1:10 noch von 1:1 bis zu einem Zeitpunkt von 120 Minuten eine verstärkte Apoptose der polymorphkernigen Granulozyten durch die Koinkubation eintritt. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Zelllysaten und den entsprechenden Überständen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass sich apoptotischen Zellen abgelöst hatten und somit ein falsch-negatives Ergebnis in den Zelllysaten ermittelt worden wäre. Die Graphiken der Nucleosomenbestimmung sind in Abbildung 2 dargestellt.

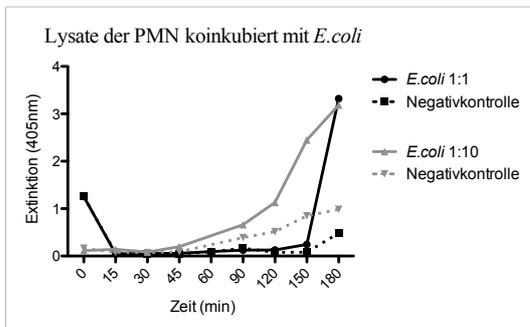


Abbildung 2a: Zunahme der Nucleosomen in dem Lysat der Koinkubate mit *E.coli* über die Zeit

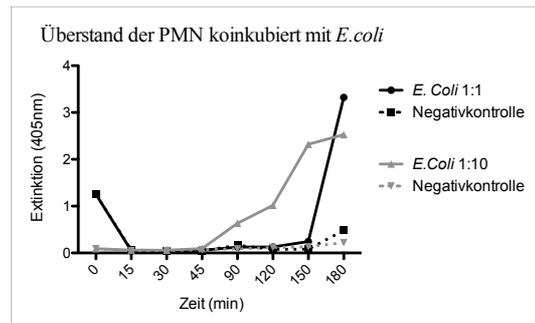


Abbildung 2b: Zunahme der Nucleosomen im Überstand der Koinkubate mit *E.coli* über die Zeit

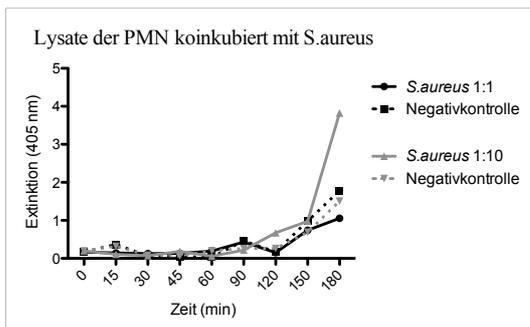


Abbildung 2c: Zunahme der Nucleosomen in dem Lysat der Koinkubate mit *S.aureus* über die Zeit

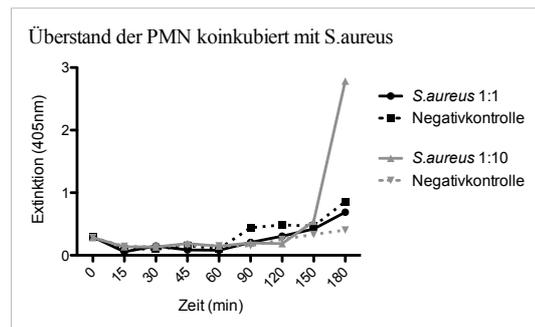


Abbildung 2d: Zunahme der Nucleosomen im Überstand der Koinkubate mit *S.aureus* über die Zeit

Abbildung 2 a-d: Nachweis der Apoptoserate in den Koinkubationskulturen von PMN und Bakterien

## 5.4. Bestimmung der Phagozytoserate und Festlegung der MOI

Die Bestimmung erfolgte durch Beurteilung von 100 Granulozyten nach Koinkubation mit gefärbten Bakterien im Fluoreszenz-Mikroskop nach 30, 60, 90 und 120 Minuten Koinkubationszeit. Zur Ermittlung der optimalen MOI wurde für jeden Zeitpunkt jeweils ein Ansatz mit einem Verhältnis von 1 zu 2, 1 zu 5, 1 zu 10 und 1 zu 15 hergestellt. Abbildung 3 stellt die ermittelten Werte als Kurven dar. Die Versuche haben gezeigt, dass bei einer MOI von 1:5 bis 1:15 nach 120 Minuten Koinkubation mindestens über 60% der Granulozyten Bakterien aufgenommen hatten oder in direktem Oberflächenkontakt standen. Eine leichte Abweichung zeigte sich dabei für das Bakterium *Escherichia coli*, bei dem die maximal erreichbare Phagozytoserate im untersuchten Zeitabschnitt knapp unter 50% lag.

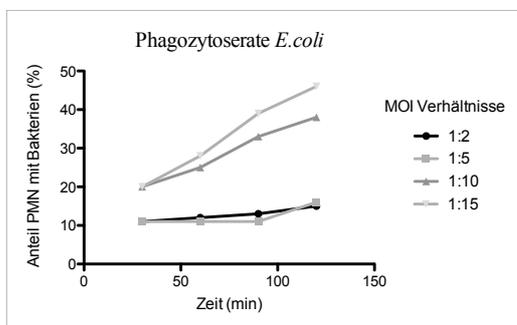


Abbildung 3a:  
Zunahme der Phagozytoserate von *E.coli* durch PMN in Abhängigkeit von Zeit und MOI

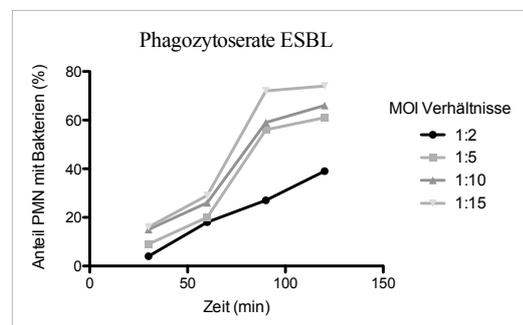


Abbildung 3b:  
Zunahme der Phagozytoserate von ESBL durch PMN in Abhängigkeit von Zeit und MOI

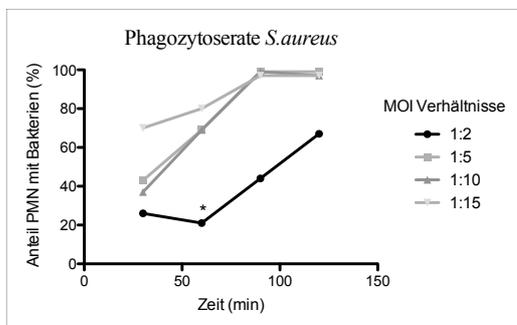


Abbildung 3c:  
Zunahme der Phagozytoserate von *S.aureus* durch PMN in Abhängigkeit von Zeit und MOI.  
\* Das scheinbare Absinken der Phagozytoserate ist der geringen Bakterienanzahl zuzuschreiben und als Artefakt zu werten.

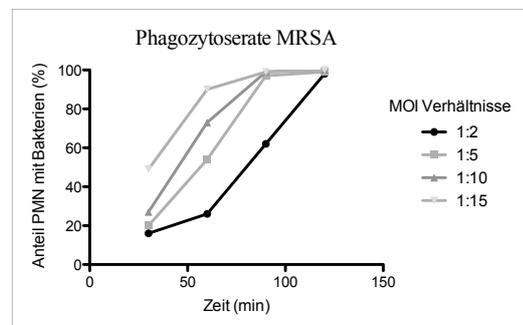


Abbildung 3d:  
Zunahme der Phagozytoserate von MRSA durch PMN in Abhängigkeit von Zeit und MOI

Abbildung 3 a-d: Phagozytoseraten verschiedener Bakterienspezies durch PMN

Aus den Ergebnissen der Phagozytoseversuche schlussfolgernd wurde für die Versuche dieser Arbeit ein Verhältnis von 1:10 (Granulozyten zu Bakterien) und eine Koinkubationszeit von 120 Minuten ausgewählt. Die Vorversuche zeigten auch, dass experimentelle Schwankungen der MOI von 20% keinen Einfluss auf die Phagozytoserate haben.

## **5.5. Bestimmung der tatsächlichen MOI**

Nach Rückrechnung der retrospektiv ermittelten Werte der KbE ergab die MOI durchschnittlich 8,9. Die MOI aller Einzelversuche findet sich im Anhang unter Tabelle 12 und Tabelle 13.

## **5.6. RNA Isolierung und Bestimmung der Qualität und Quantität**

Die Quantität der RNA wurde mittels Nano-Drop Messung bestimmt. Als Qualitätsfaktor diente die RIN, gemessen durch RNA-Picochips im Bioanalyzer der Firma Agilent. Pro Versuch konnten jeweils 30-50 µl Isolat mit einem RNA Gehalt von durchschnittlich 50 ng/µl gewonnen werden. Die RIN betrug im Durchschnitt 6,9, ein für Expressionsanalysen gut geeigneter Qualitätswert<sup>62</sup>. Im Anhang befindet sich unter Tabelle 12 und Tabelle 13 eine Auflistung aller Einzelversuche mit Angabe der isolierten RNA-Menge und zugehöriger RIN.

## 5.7. Genexpressionsanalyse mittels Microarray

### 5.7.1 Qualitätskontrolle der eingesetzten RNA Samples

Ein Qualitätskriterium für RNA errechnet sich aus der Ratio zwischen degradierten 3' und 5' Enden. Die Probes (DNA Hybridisierungsstränge) auf den Chips erkennen dabei mehrere verschiedene Regionen, manche näher am 3' Ende, andere näher am 5'. Die Analyse der einzelnen Signalintensitäten auf beiden Regionen erlaubt somit eine Einschätzung des Degradationszustandes. Für die Proben dieser Arbeit ergab sich dabei eine einheitliche Unbelassenheit der RNA (Abbildung 4a). Die globale Verteilung der Signalintensitäten aller untersuchten Proben wird nach Logarithmierung durch eine Darstellung als Histogramm untersucht (Abbildung 4b). Eine grobe Abweichung einzelner Kurven würde dabei auf einen großen Unterschied in der Gesamtmenge aller Gene hinweisen, was bei der Analyse von theoretisch ähnlichen Proben auf eine fehlerhafte Hybridisierung oder sehr unterschiedliche Genexpressionsmuster hinweisen würde. Dies ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben nicht der Fall. Beide Ergebnisse zeigen, dass die verwendete RNA nicht degradiert und von hoher Qualität war.

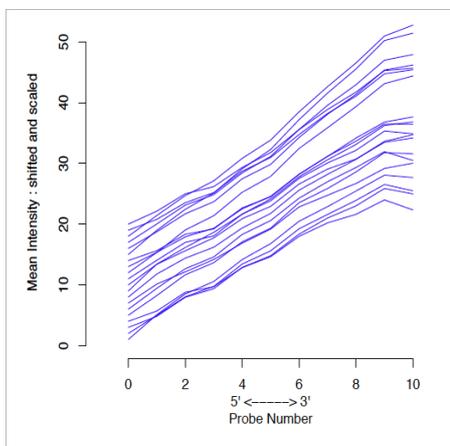


Abbildung 4a: RNA Degradationsplot mit Nachweis der Unbelassenheit der Proben

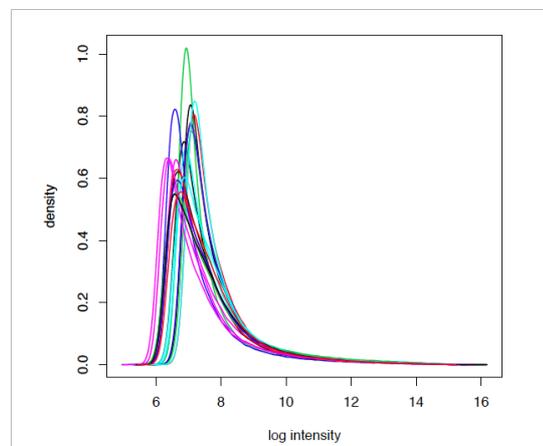


Abbildung 4b: Histogramm der globalen Signalintensitäten. Es sind keine groben Abweichungen einzelner Proben erkennbar.

Abbildung 4 a-b: RNA Degradationsplot und Histogramm der globalen Signalintensitäten

### 5.7.2 Ermittlung der "Present Call Rate" und Gesamtanzahl der regulierten Gene

Alle Probesets, die auf den Arrays vom Hintergrund nicht zu unterschieden sind, werden als absent ermittelt und müssen bei der weiteren Analyse nicht mehr beachtet werden. Hierbei wurde ein MAS5-Algorithmus verwendet und darüber die Einteilung der Probesets in P = present (anwesend), M= marginal (grenzwertig) und A = absent (abwesend) vorgenommen (Abbildung 5). Die Present Call Rate, also der Anteil an anwesenden Probesets, betrug im Durchschnitt 35% (entspricht etwa 2000 Genen) ohne stark abweichende einzelne Proben. Dieses Ergebnis ist für Neutrophile Granulozyten zu erwarten<sup>58</sup>. In bisherigen Publikationen wurden zwischen 748<sup>53</sup> und 3000<sup>55</sup> Gene bei aktivierten PMN als exprimiert beschrieben.

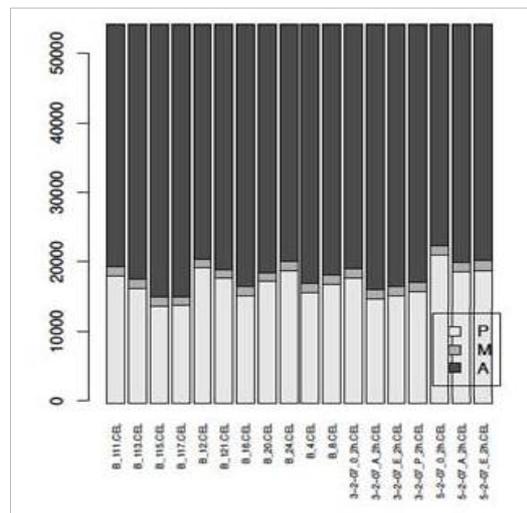


Abbildung 5: Balkendiagramm der Anteile von als present (P), marginal (M) und absent (A) detektierten Probesets auf den Microarrays

Tabelle 4 zeigt die Gesamtanzahl der positiv und negativ regulierten Gene auf den Microarrays nach den Ausschlusskriterien der Software "Chip Inspector" (False discovery rate < 0,2 %). Für jede Bakterienspezies werden dabei durchschnittlich 152 Gene positiv reguliert. Bei den negativ regulierten Genen zeigen sich größere Unterschiede, wobei auffällt, dass in den PMN durch die multiresistenten Klinikisolate ESBL und MRSA durchschnittlich dreimal so viele Gene herabreguliert wurden wie durch die Antibiotika-sensitiveren Spezies.

Tabelle 4: Gesamtanzahl der regulierten Gene nach 120 min Koinkubation mittels Microarray Analyse

Bakterienspezies (n = Anzahl der analysierten Koinkubationsversuche)	Anzahl der positiv regulierten Gene der PMN nach 120 Minuten Koinkubation	Anzahl der negativ regulierten Gene der PMN nach 120 Minuten Koinkubation	False Discovery Rate (%)
<i>E.coli</i> (n = 4)	186	227	0,0
ESBL (n = 3)	184	839	0,1
<i>S.aureus</i> (n = 4)	149	281	0,0
MRSA (n = 3)	130	519	0,1

### 5.7.3 Hauptkomponentenanalyse

In einer Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) wird die Beziehung der einzelnen Samples unter Einbeziehung der Gesamtheit aller exprimierten Gene veranschaulicht. Hierbei wird ersichtlich, ob sich die Samples aus gleichen Gruppen (z.B. alle Proben einer Bakterienspezies oder alle Proben eines Spenders) zu Clustern zusammenfinden. In der ersten Analyse (Abbildung 6a) zeigt sich bereits eine grobe Unterteilung der Hauptgruppen. Entlang der Abszisse (PC1) reihen sich links die Negativkontrollen (Con) auf, in der Mitte stehen die Gram-positiven (S.aureus und MRSA) und rechts die Gram-negativen Bakterienspezies (E.coli und ESBL). Jedoch zeigt sich auch ein gewisser Spendereffekt, da Proben aus derselben Blutentnahme auf der Ordinate (PC2) nahe beieinander stehen. Abbildung 6b zeigt die PCA nach Eliminierung des Donoreffektes. Hier gruppieren sich nun klar die Ergebnisse der Negativkontrollen, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienspezies zusammen.

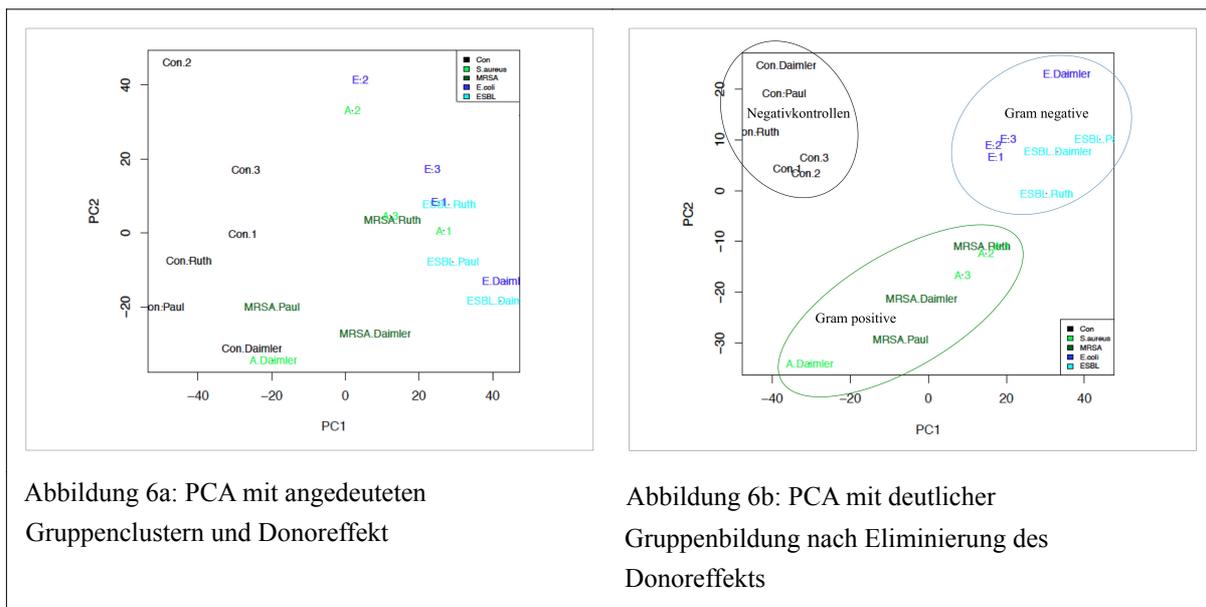


Abbildung 6 a-b: PCA Analysen der Microarrays mit erkennbarer Clusterbildung der Gruppen nach jeweiliger Bakterienspezies

## 5.8. Genexpressionsanalyse mittels TaqMan RTqPCR

Das Ziel der TaqMan RTqPCR Analyse war die Validierung und Semi-quantifizierung der Gene, die in den Microarray Studien als potentiell unterschiedlich reguliert gefunden worden waren. Das Anwender-definierte TaqMan Array wurde dabei zur Analyse der folgenden Gene zusammengestellt: ADAM22, AP1S2, CALCA, CLEC7A, DNAJB9, EHD1, FNDC3B, FOS, ICAM1, ICAM2, ICAM3, IL10, IL10RA, IRAK1, IRAK2, IRAK3, JDP2, KMO, NOP2, PARVB, PIM3, RALGDS, SLC11A2, SRP54, TLR2, TLR4, TLR6, TPM3, U2AF1, UBTD2 und ZEB2.

Eine signifikant unterschiedliche Genexpression wurde für folgende Sequenzen gefunden: CLEC7A, EHD1, FOS, ICAM3, IRAK1, IRAK2, KMO, NOP2, RALGDS, SCL11A, SRP54, TLR6, TPM3 und UBTD2. Die Scatterplots der entsprechenden RTqPCR Analysen finden sich in alphabetischer Reihenfolge auf Abbildung 7 bis 10. Eine von der koinkubierten Baktereinspezies unabhängig hochregulierte Genexpression über dem Threshold von 1.5 ergab sich für die Gensequenzen ADAM22, DNAJB9, FNDC3B, ICAM1, PIM3, TLR2, U2AF1 und ZEB2, dargestellt in Abbildung 11 und 12. Für folgende Gensequenzen ergab sich keine relevante Expressionsveränderung durch die Koinkubation mit Bakterien: AP1S2, CALCA, ICAM2, IL10, IL10RA, IRAK3, JDP2, PARVB, TLR4. Die zugehörigen Graphen finden sich in den Abbildungen 13 und 14. Für CALCA erbrachte kein Versuchsansatz auswertbare RTqPCR Ergebnisse, entsprechend sind die Ergebnisse dieser Gensequenz auch nicht graphisch dargestellt.

## 5.8.1 Gensequenzen mit statistisch signifikanten Expressionsunterschieden

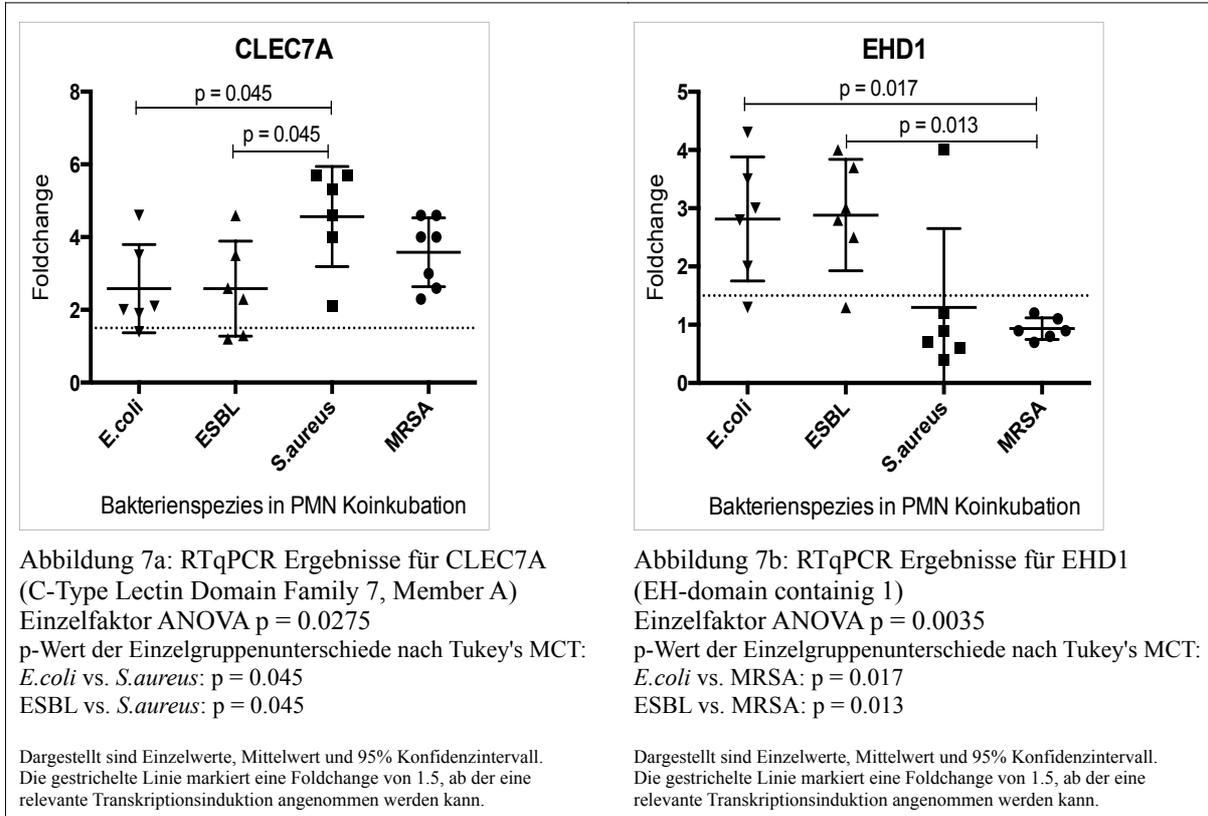


Abbildung 7 a-b: RTqPCR Ergebnisse von CLEC7A und EHD1

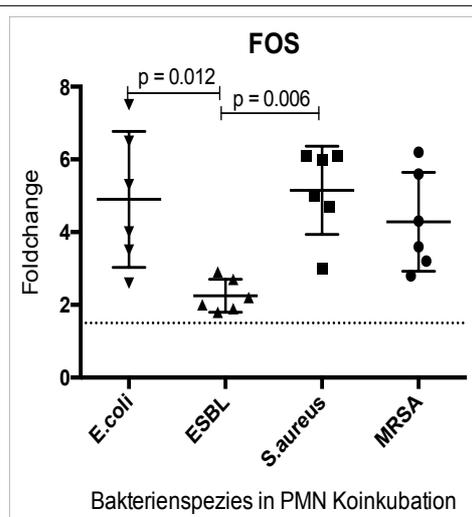


Abbildung 8a: RTqPCR Ergebnisse für FOS (FBJ murine osteosarcoma oncogene homolog) Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0047$ .  
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *ESBL*:  $p = 0.012$   
*ESBL* vs. *S.aureus*:  $p = 0.006$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

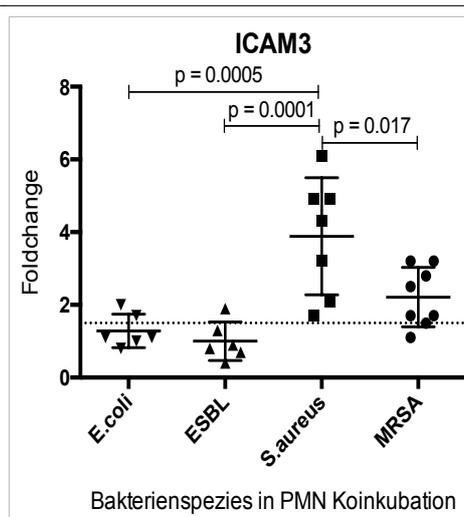


Abbildung 8b: RTqPCR Ergebnisse für ICAM3 (Intracellular adhesion molecule 3) Einzelfaktor ANOVA  $p < 0.0001$ .  
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.0005$   
*ESBL* vs. *S.aureus*:  $p = 0.0001$   
*S.aureus* vs. *MRSA*:  $p = 0.017$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

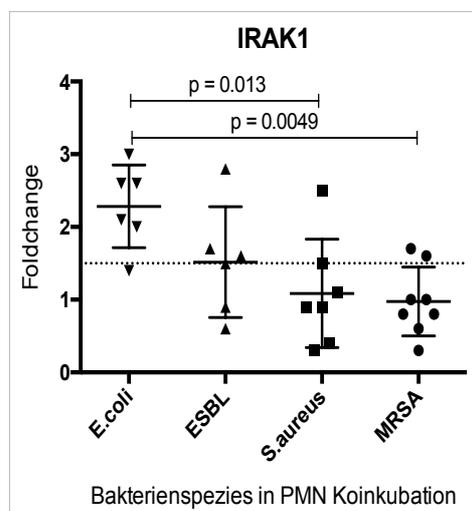


Abbildung 8c: RTqPCR Ergebnisse für IRAK1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1) Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0049$ .  
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.013$   
*ESBL* vs. *S.aureus*:  $p = 0.0049$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

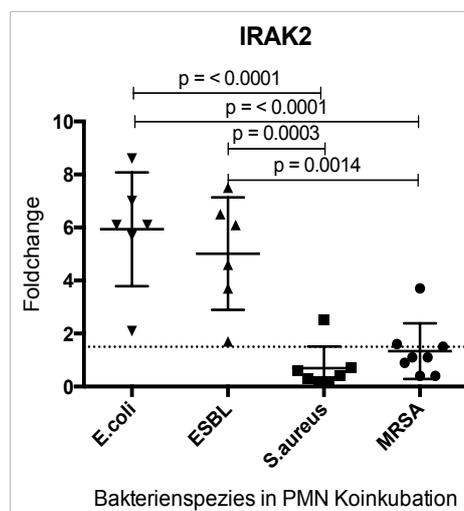


Abbildung 8d: RTqPCR Ergebnisse für IRAK2 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 2) Einzelfaktor ANOVA  $p < 0.0001$ .  
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p < 0.0001$   
*E.coli* vs. *MRSA*:  $p < 0.0001$   
*ESBL* vs. *S.aureus*:  $p = 0.0003$   
*ESBL* vs. *MRSA*:  $p = 0.0014$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 8 a-d: RTqPCR Ergebnisse von FOS, ICAM3, IRAK1 und IRAK2

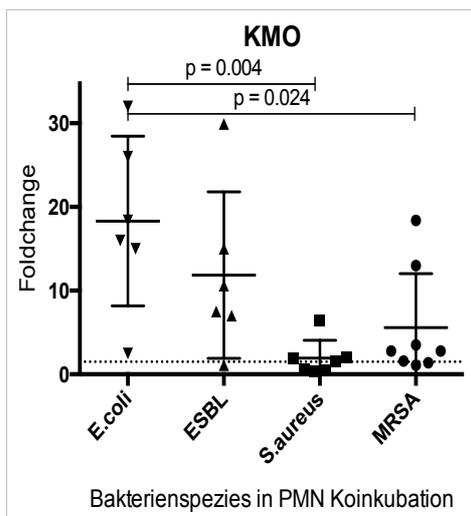


Abbildung 9a: RTqPCR Ergebnisse für KMO (Kynurenine 3-monooxygenase)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.004$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.004$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p = 0.024$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

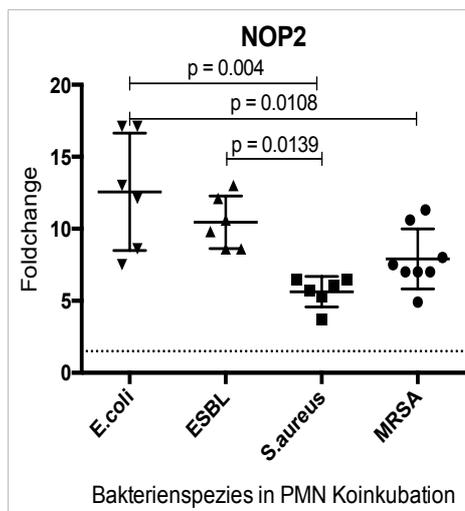


Abbildung 9b: RTqPCR Ergebnisse für NOP2 (NOP2 nucleolar protein homolog (yeast))  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0004$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.0004$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p = 0.0108$   
 ESBL vs. *S.aureus*:  $p = 0.0139$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

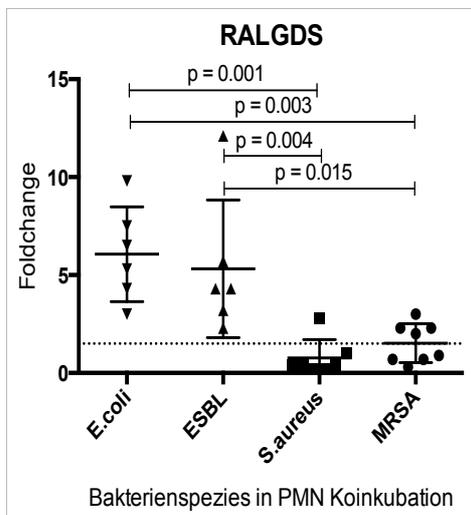


Abbildung 9c: RTqPCR Ergebnisse für RALGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0002$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.001$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p = 0.003$   
 ESBL vs. *S.aureus*:  $p = 0.004$   
 ESBL vs. MRSA:  $p = 0.015$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

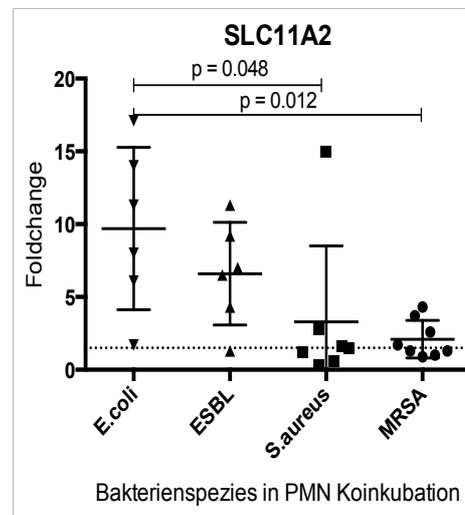


Abbildung 9d: RTqPCR Ergebnisse für SCL11A2 (Soulte carrier family 11 member 2)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0117$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.048$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p = 0.012$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 9 a-d: RTqPCR Ergebnisse für KMO, NOP2, RALGDS und SLC11A

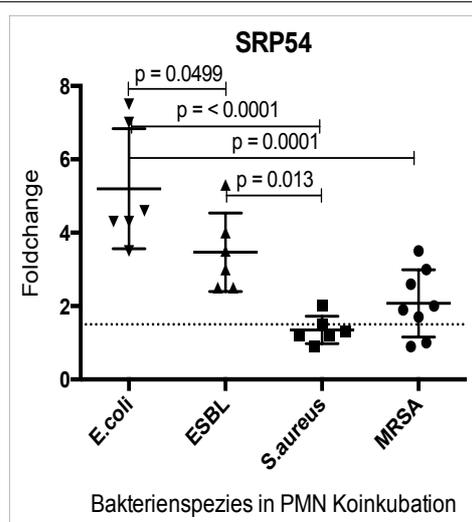


Abbildung 10a: RTqPCR Ergebnisse für SRP54 (Signal recognition particle 54kDa)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p < 0.0001$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. ESBL:  $p = 0.0499$   
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p < 0.0001$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p = 0.0001$   
 ESBL vs. *S.aureus*:  $p = 0.013$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

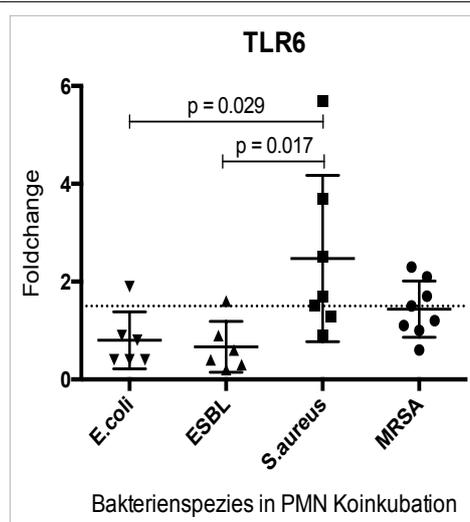


Abbildung 10b: RTqPCR Ergebnisse für TLR6 (Toll-like receptor 6)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.012$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p = 0.029$   
 ESBL vs. *S.aureus*:  $p = 0.017$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

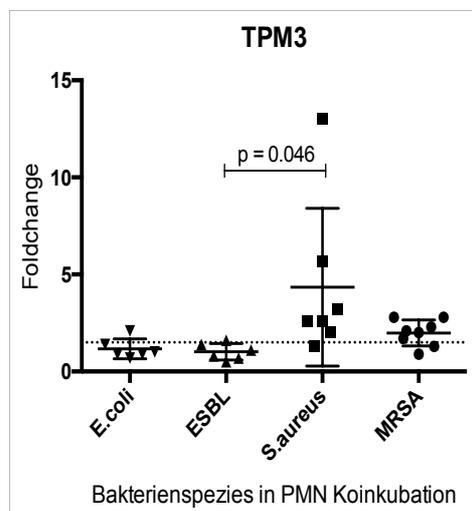


Abbildung 10c: RTqPCR Ergebnisse für TPM3 (Tropomyosin 3)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p = 0.0324$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
 ESBL vs. *S.aureus*:  $p = 0.046$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

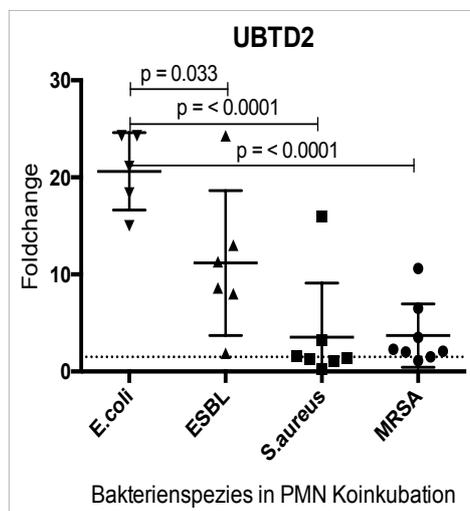


Abbildung 10d: RTqPCR Ergebnisse für UBTD2 (Ubiquitin domain containing 2)  
 Einzelfaktor ANOVA  $p < 0.0001$   
 p-Wert der Einzelgruppenunterschiede nach Tukey's MCT:  
*E.coli* vs. ESBL:  $p = 0.033$   
*E.coli* vs. *S.aureus*:  $p < 0.0001$   
*E.coli* vs. MRSA:  $p < 0.0001$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall.  
 Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 10 a-d: RTqPCR Ergebnisse für SRP54, TLR6, TPM3, UBTD2

## 5.8.2 Gensequenzen mit gleichmäßiger Expressionserhöhung unabhängig von der Bakterienspezies

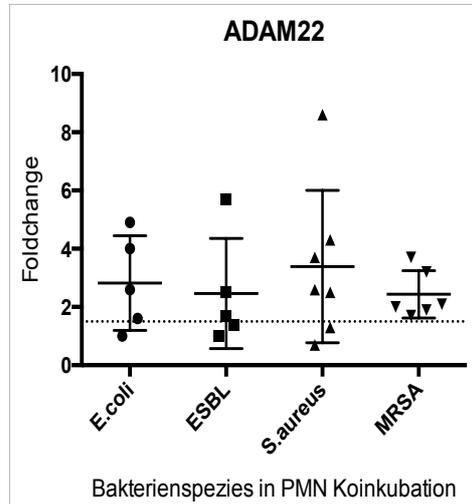


Abbildung 11a: RTqPCR Ergebnisse für ADAM22 (ADAM Metallopeptidase Domain 22)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.7925$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

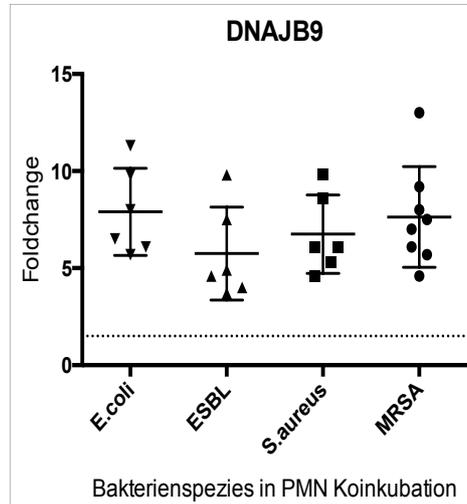


Abbildung 11b: RTqPCR Ergebnisse für DNAJB9 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.3806$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

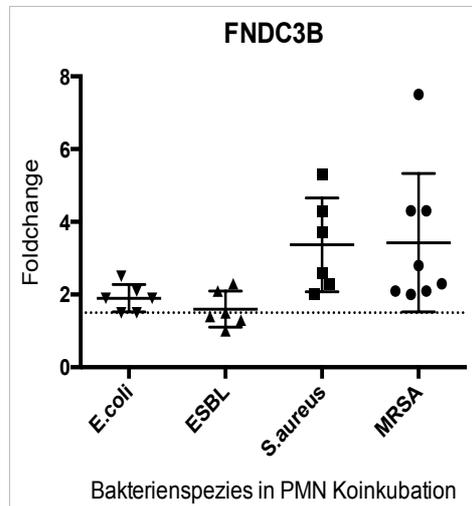


Abbildung 11c: RTqPCR Ergebnisse für FNDC3B (Fibronectin type 3 domain containing 3B)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.0275$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

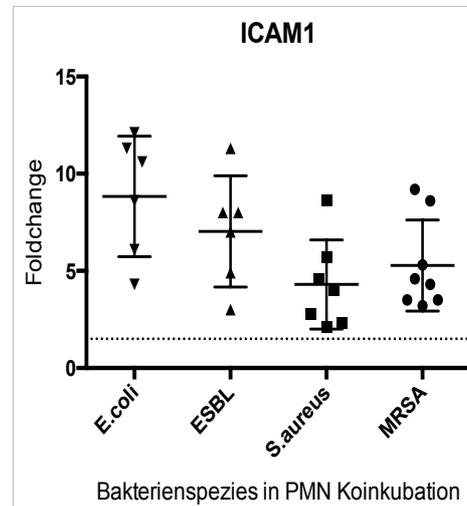


Abbildung 11d: RTqPCR Ergebnisse für ICAM1 (Intracellular adhesion molecule 1)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.0249$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 11 a-d: RTqPCR Ergebnisse von ADAM22, DNAJB9, FNDC3B und ICAM1

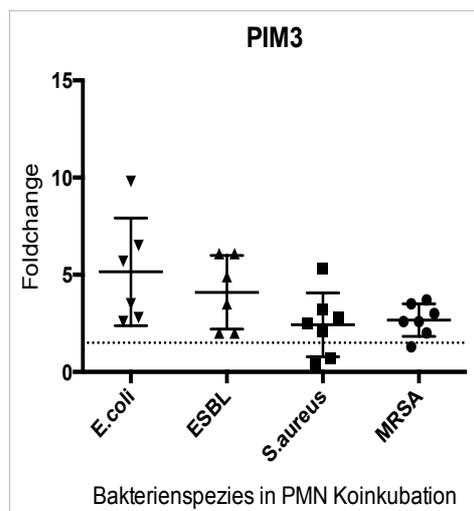


Abbildung 12a: RTqPCR Ergebnisse für PIM3 (Pim3 oncogene)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.0527$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

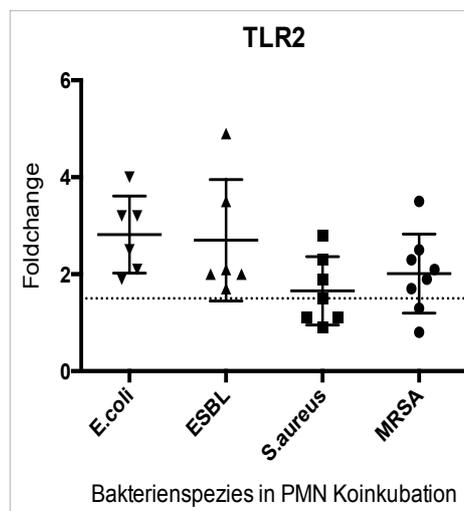


Abbildung 12b: RTqPCR Ergebnisse für TLR2 (Toll-like receptor 2)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.0852$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

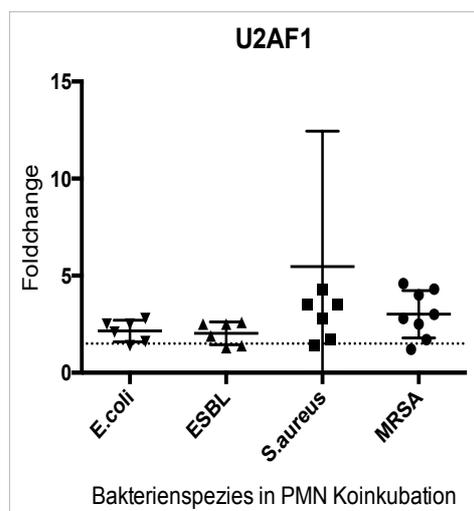


Abbildung 12c: RTqPCR Ergebnisse für U2AF1 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.3031$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

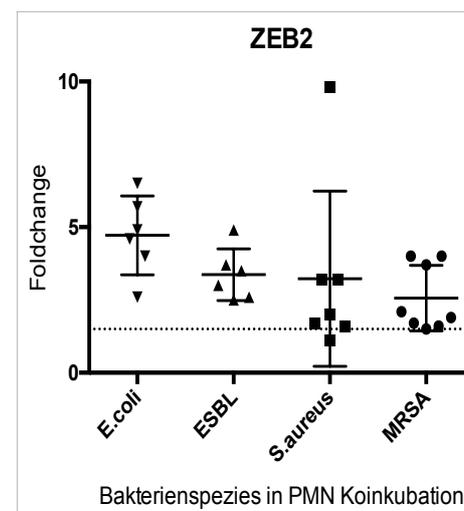


Abbildung 12d: RTqPCR Ergebnisse für ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2)  
Einzelfaktor ANOVA  $P = 0.2095$

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 12 a-d: RTqPCR Ergebnisse von PIM3, TLR2, U2AF1 und ZEB2

### 5.8.3 Gensequenzen ohne relevante Expressionsregulation

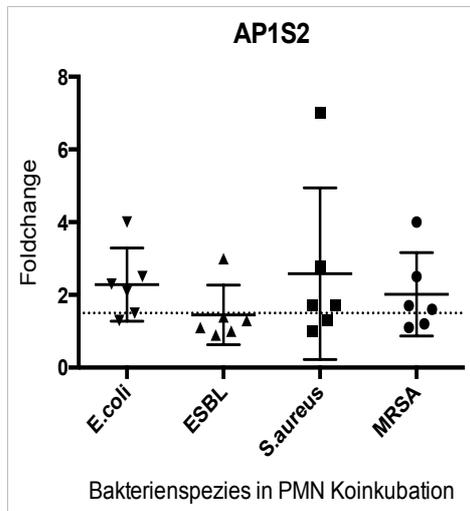


Abbildung 13a: RTqPCR Ergebnisse für AP1S2 (Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.5542

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

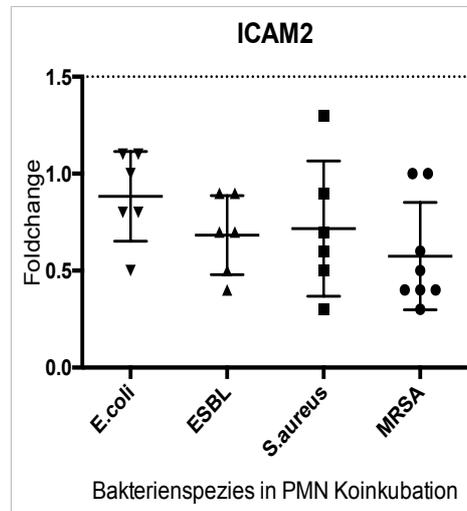


Abbildung 13b: RTqPCR Ergebnisse für ICAM2 (Intracellular adhesion molecule 2)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.2443

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

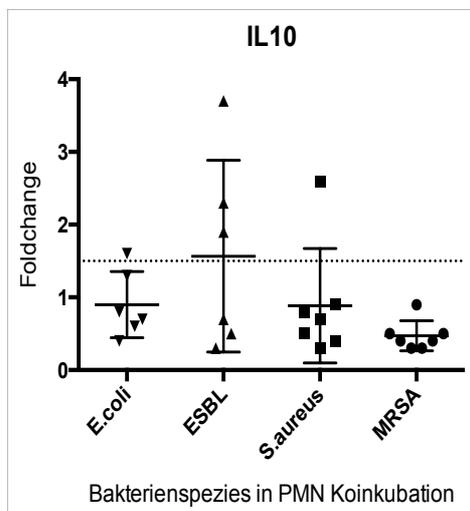


Abbildung 13c: RTqPCR Ergebnisse für IL10 (Interleukin 10)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.1293

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

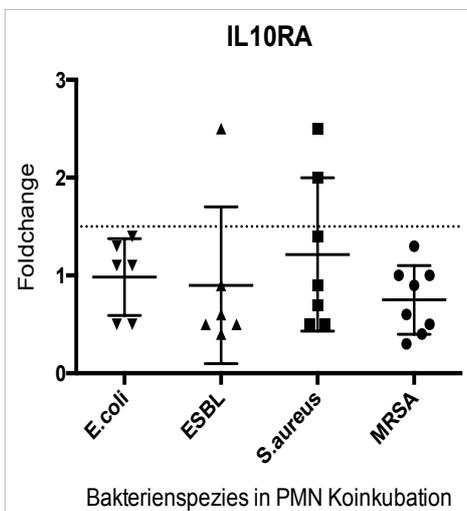


Abbildung 13d: RTqPCR Ergebnisse für IL10RA (Interleukin 10 rezeptor alpha)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.5362

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 13 a-d: RTqPCR Ergebnisse von AP1S2, ICAM2, IL10 und IL10RA

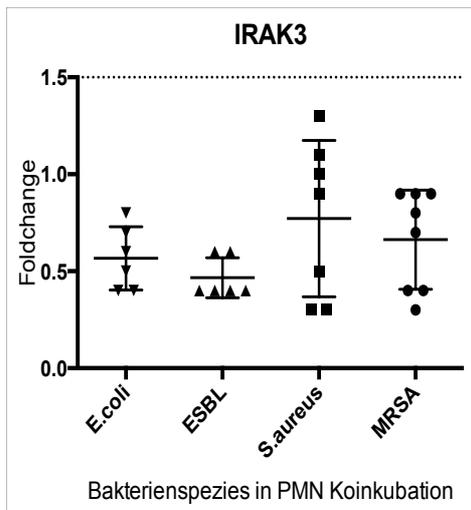


Abbildung 14a: RTqPCR Ergebnisse für IRAK3 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 3)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.2232

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

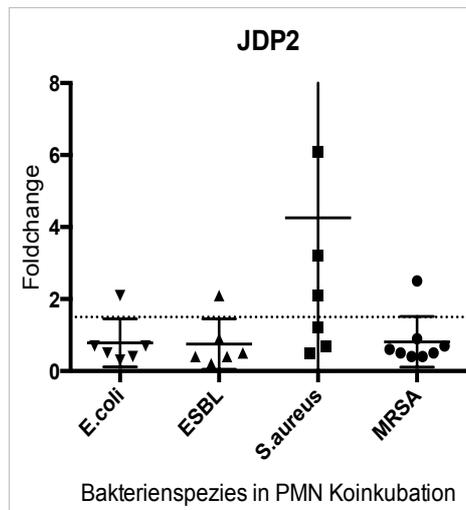


Abbildung 14b: RTqPCR Ergebnisse für JDP2 (Jun dimerization protein 2)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.0843

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

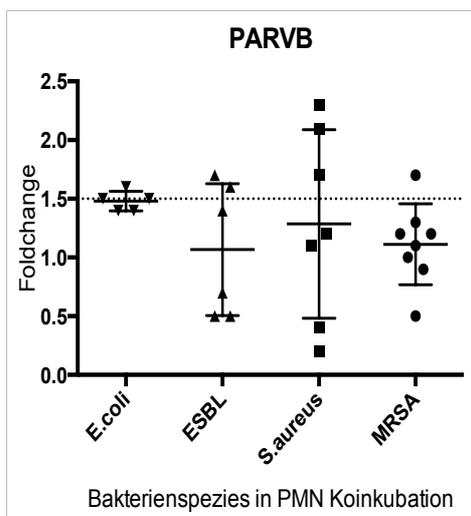


Abbildung 14c: RTqPCR Ergebnisse für PARVB (Parvin, beta)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.5617

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

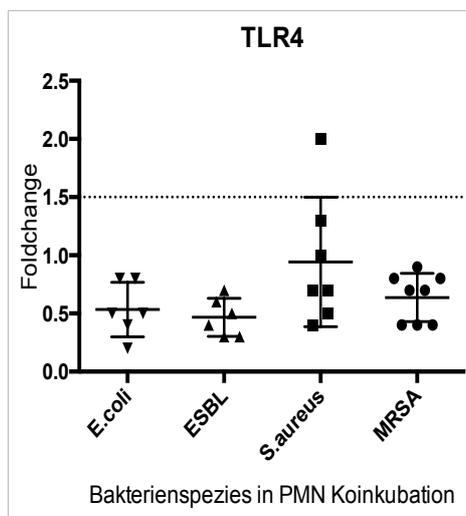


Abbildung 14d: RTqPCR Ergebnisse für TLR4 (Toll-like receptor 4)  
Einzelfaktor ANOVA P = 0.0732

Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Die gestrichelte Linie markiert eine Foldchange von 1.5, ab der eine relevante Transkriptionsinduktion angenommen werden kann.

Abbildung 14 a-d: RTqPCR Ergebnisse von IRAK3, JDP2, PARVB und TLR4

### 5.8.4 Korrelation der Genexpressionsanalyse von Microarray und TaqMan

Zum Vergleich der durch Microarray und TaqMan ermittelten Expressionswerte wurden die Ergebnisse beider Verfahren für jede Bakterienspezies getrennt als logdiff-Werte gegeneinander in ein Koordinatensystem aufgetragen (siehe Abbildung 15). Als Korrelationskoeffizienten ergaben sich jeweils: *E.coli*:  $r^2 = 0.77$ , ESBL:  $r^2 = 0.75$ , *S.aureus*:  $r^2 = 0.45$ , MRSA:  $r^2 = 0.57$ . Es zeigt sich, dass beide Analyseverfahren ähnliche Aussagen ergaben und miteinander vergleichbar sind. Dabei muss beachtet werden, dass die Verfahren in ihrer Methodik und Sensitivität jeweils große Unterschiede aufweisen.

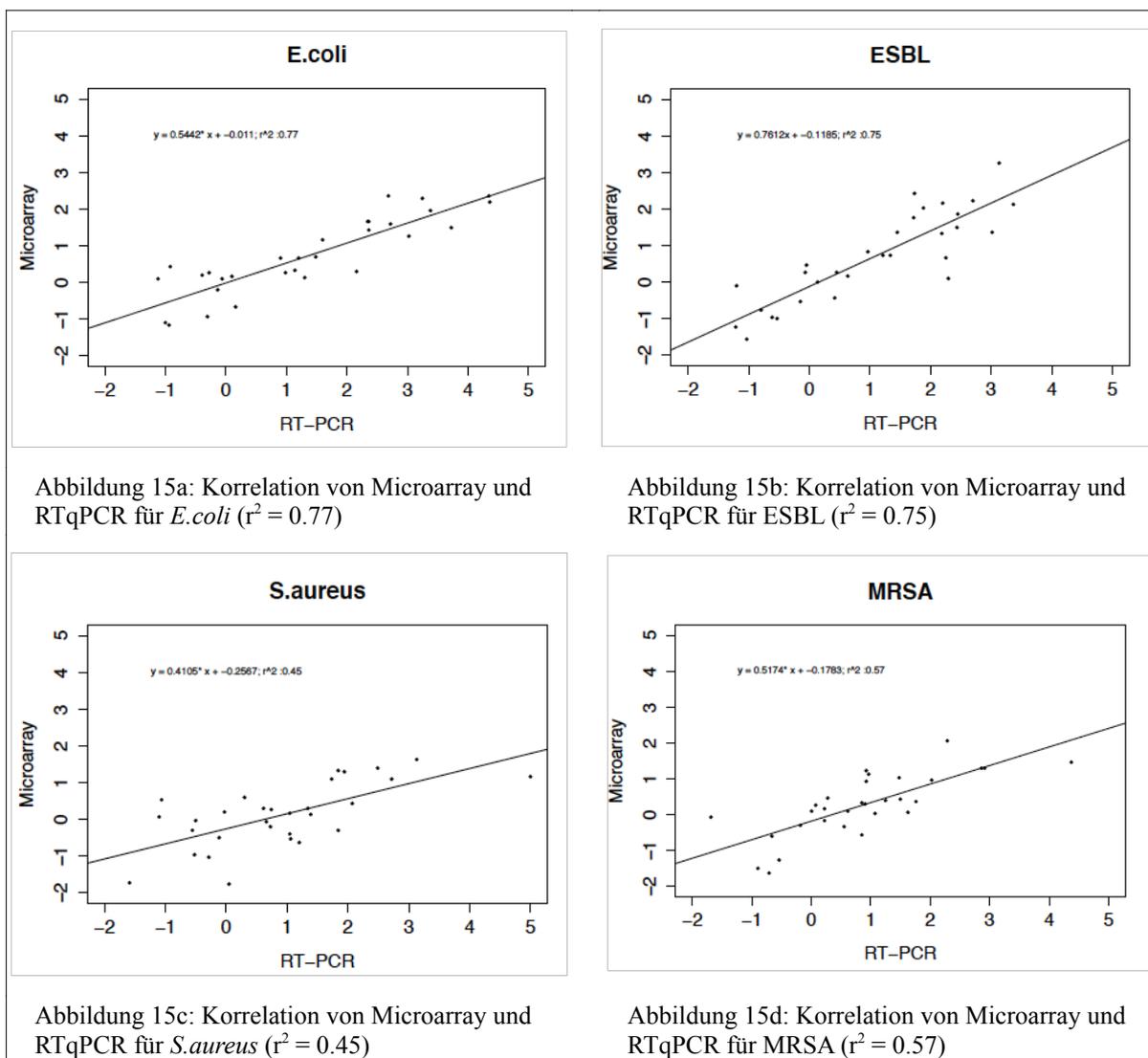


Abbildung 15 a-d:

Korrelation von Microarray und RTqPCR Ergebnissen für alle Bakterienspezies

## 6. Diskussion

### 6.1. Evaluation des Modells

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell zur Analyse der Genexpression Neutrophiler Granulozyten in Koinkubation mit verschiedenen Bakterienspezies hat sich als reproduzierbar erwiesen und lieferte RNA in einer für Expressionsanalysen geeigneten Qualität. Besonders anspruchsvoll bei der Umsetzung waren der hohe Arbeitsaufwand (ca. 11 Stunden vom ersten Ansetzen der Bakterienflüssigkulturen bis zum Isolieren der RNA), der Umstand, dass in der Anfangsphase zwei Leute parallel arbeiten müssen (Ansetzen der Bakterienkulturen und gleichzeitige Isolierung der Granulozyten) und die Herausforderung mit mehreren Bakterienspezies gleichzeitig ohne Cross-Kontaminierung zu arbeiten. Die Dichtegradientenzentrifugation mittels Polymorphprep der Firma Progen lieferte mit relativ geringem Aufwand Granulozyten in einer ausgezeichneten Reinheit von über 96%. Ferner ist zu beachten, dass die Zellreinheit durch einen für die medizinischen Diagnostik validierten, hochsensitiven und spezifischen Durchflusszytometer bestimmt wurde (XE-5000 der Firma Sysmex). Der Großteil der bisherigen Arbeiten zu dem Thema zählte zur Reinheitsbestimmung lediglich 100 Zellen mikroskopisch aus. Zur Einhaltung der über die Phagozytosebestimmung festgelegten MOI von 1:10 wurde die K<sub>B</sub>E der Bakterienflüssigkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Dabei wurde im Durchschnitt in allen Koinkubationsversuchen eine MOI von 1:8,9 erreicht, ein zufriedenstellendes und gut reproduzierbares Ergebnis. Bei der Phagozytoserate fiel auf, dass für *Escherichia coli* die maximale Phagozytoserate bei 50% aller Granulozyten nachgewiesen werden konnte. Es wurde nicht geprüft, ob eine längere Koinkubationszeit dabei zu einer höheren Phagozytoserate geführt hätte, da die Untersuchung der Apoptoserate gezeigt hat, dass es nach 120 Minuten Inkubationszeit zu einer verstärkten Nucleosomenbildung in den Versuchsansätzen kommt. Der Grund für die geringere Phagozytoserate bleibt unbekannt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen jedoch, dass es im Vergleich mit der Negativkontrolle zu einer spezifischen Genaktivierung in den Granulozyten kommt. Die Isolierung der RNA mittels TRIzol und modifiziertem RNeasy Mini-Kit entsprachen dem allgemein üblichen Verfahren. Es kann angenommen werden, dass die Beschränkung der Koinkubation auf einen Zeitpunkt vor Einsatz der Apoptose ein wichtiger Schritt ist, um RNA in der gewünschten hohen Qualität zu ernten. Die Messung der RIN (RNA integrity number) ergab für alle Proben einen durchschnittlichen Wert von 6,9. Nach den Kriterien einer Publikation von Pfaffl et al. ist dieser Wert gut geeignet um Expressionsanalysen durchzuführen<sup>62</sup>.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das hier verwendete Modell gut geeignet ist die Genexpression Neutrophiler Granulozyten nach Koinkubation mit Bakterien in vitro zu analysieren.

## 6.2. Das Expressionsprofil von PMN nach Bakterienkontakt

### 6.2.1 Gesamtheitliche Veränderungen im Expressionsprofil

Hauptgegenstand dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob Neutrophile Granulozyten nach Koinkubation mit verschiedenen Bakterien mit einer Veränderung ihres Expressionsprofils in Abhängigkeit vom Pathogen reagieren. Dass es in PMN durch Bakterienkontakt zu einer verstärkten mRNA Synthese kommt, wurde bereits 2001 von Subrahmanyam et al. nachgewiesen. Obwohl nur mit einer Northernblot Analyse gearbeitet wurde, kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass *E.coli* und *Y.pestis* nach zwei Stunden Koinkubation unterschiedliche Expressionsprofile in den PMN hervorrufen. Dabei wurde auch festgestellt, dass *E.coli* und ein apathogener *Y.pestis* (KIM6) Stamm mehr Gene induzierten als ein pathogener *Y.pestis* Stamm (KIM5). Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass ein Teil der Pathogenität des *Y.pestis* Stammes auf eine verminderte Genaktivierung in den Granulozyten zurückzuführen sei<sup>54</sup>. Auch wenn in dieser Arbeit der Frage nach Pathogenität und verminderter PMN Expression nicht explizit nachgegangen wurde, so fällt auf, dass durch die verwendeten Klinikisolate auf den Microarrays etwa dreimal so viele Gene herabreguliert werden wie durch die apathogenen ATCC Stämme (Negativ regulierte Gene: *E.coli* = 227, ESBL = 839, *S.aureus* = 281, MRSA = 519). Hinsichtlich der positiv regulierten Gene ist die Gesamtanzahl für alle vier Bakterienstämme ähnlich (Positiv regulierte Gene: *E.coli* = 186, ESBL = 184, *S.aureus* = 149, MRSA = 130; vergleiche Tabelle 4). Malcom et al. publizierte 2003 eine der ersten Arbeiten, die mittels Microarray das Expressionsprofil von PMN nach Stimulation durch LPS und Bakterien verglichen. Auffällig hierbei ist, dass insgesamt nur 28 verifizierbare Genprodukte angegeben wurden. Damit liegt die Gesamtzahl der als reguliert angegebenen Gene unter 10% der in dieser Arbeit gefundenen (siehe Tabelle 4). Dieser Umstand mag vor allem der im Vergleich zu heute noch recht unausgereiften Microarray Technologie geschuldet gewesen sein. Die statistischen Qualitätskriterien der Arbeit sind nicht vermerkt. Auf Grund der in dieser Arbeit verwendeten sehr stringenten Bedingungen mit einer False Discovery Rate  $< 0,2$  ist eine statistische Ursache für den Unterschied allerdings unwahrscheinlich (siehe Kapitel 5.7.2). Die Analyse von Malcom et al. zeigte hauptsächlich eine gesteigerte Expression von Genen für Cytokine (IL-1 $\beta$ , MIP-1a/b, TSG-6, IL1 receptor antagonist, IL-8, MCP-1), Transkriptionsfaktoren (u.a. NF $\kappa$ B) und metabolischen Enzymen. Diese Ergebnisse waren zu erwarten und bestätigten vorausgegangene Untersuchungen<sup>56</sup>. 2004 publizierten Zhang et al., dass die Stimulation von PMN mit lebend opsonisierten *E.coli*, Lipopolysaccharide (LPS) oder Formyl-methionyl-leucylphenylalanin (fMLP) jeweils unterschiedliche Expressionsprofile in PMN hervorrufen<sup>58</sup>.

Insgesamt wurden für *E.coli* 665 Gene, für LPS 402 Gene und für fMLP 253 Gene als reguliert angegeben. Dabei fällt auf, dass zwei Drittel der regulierten Gene für lebende *E.coli* als herabreguliert angegeben wurden (344 herab gegen 222 herauf), während LPS und fMLP vor allem zu einer Heraufregulation von Genen führte. Das Überwiegen der Herabregulation von Genen nach Kontakt mit lebenden Bakterien findet sich auch in dieser Arbeit wieder, allerdings ist sowohl die Gesamtanzahl als auch das Verhältnis für *E.coli* etwas geringer (227 Herabregulationen gegen 186 Heraufregulationen). Ursächlich dafür mag hier wiederum die sehr strenge Festlegung der maximalen False Discovery Rate sein.

Theilgaard-Monch et al. beschrieben das Expressionsprofil von PMN nach Einwanderung in Wundgewebe. Dabei wurden 314 Gene als reguliert angegeben, wobei keine Angabe gemacht wurde, wie viele dabei hoch oder runter reguliert waren. Insgesamt ist zu bemerken, dass der Großteil der detektierten Gensequenzen im Zusammenhang mit Anti-apoptischen Signalwegen und Wundheilungsvorgängen standen. Proinflammatorische und antibakterielle Funktionsgene waren kaum reguliert. Die Autoren postulieren eine wichtige Funktion der Neutrophilen Granulozyten bei der Wundheilung. Zum einen durch chemotaktische Signale für Makrophagen, T-Zellen, Fibrozyten und weitere PMN, zum anderen durch Vorgänge der Gewebsumwandlung durch Fibrinauflösung, Abbau extrazellulärer Matrix und Keratinozytenstimulation<sup>57</sup>.

Sukumaran et al. untersuchten die Expressionsveränderungen in PMN durch *Anaplasma phagozytophilium*, ein Bakterium von dem bekannt ist, dass es in PMN überlebt und bei Menschen die Infektionskrankheit Anaplasmosis auslöst. Insgesamt waren nach vierstündiger Koinkubationszeit 177 Gene hochreguliert und 67 runterreguliert. Als Hauptfunktionen der regulierten Gene wurden Abwehrfunktionen über Rezeptorerkennung und Signaltransduktion, Zellzyklus, Apoptose und Wachstum sowie Metabolismus angegeben<sup>59</sup>. Der Vergleich mit dieser und vorherigen Arbeiten zeigt, dass im Gegensatz zu anderen pathogenen Bakterien, *A.phagozytophilium* Gene in PMN eher induziert als repressiert. In der vorliegenden Arbeit wurden durch die humanpathogenen Klinikisolate ESBL und MRSA mehr Gensequenzen herabreguliert als durch ihre apathogenen Speziesvarianten von *E.coli* und *S.aureus*. Ebenso fällt auf, dass wie oben bei Subrahmanyam erwähnt, die pathogene *Y.pestis* Spezies mehr Gene zu unterdrücken scheint. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass als Antwort auf verschiedene Bakterienspezies unterschiedliche Transkriptomprofile in PMN nachgewiesen werden können. Dies kann zum einen daran liegen, dass verschiedene Bakterienspezies unterschiedliche Abwehrmechanismen gegen PMN entwickelt haben und die Genexpression dieser zu ihrem Vorteil beeinflussen. Andererseits ist es auch möglich, dass von Seiten der PMN verschiedene Bakterien zu unterschiedlichen Transkriptionsmustern und somit zu spezifischen Abwehrmechanismen führen. Eine weitere

Aufklärung dieser Wirts-Pathogen-Interaktionen erscheint lohnenswert. Die vorliegende Arbeit versucht einen weiteren Beitrag zur Aufklärung zu leisten indem untersucht wurde, welche spezifischen Gensequenzen bei der pathogenabhängigen Transkription in PMN induziert werden. Dazu wurde als erster Schritt das gesamte Transkriptom von PMN nach Koinkubation durch Microarrayanalysen analysiert. Dabei traten für verschiedene Bakterienspezies differenziell exprimierte Gensequenzen hervor. Zur Verifizierung der differenziellen Expression wurden daraus 31 Gensequenzen ausgewählt, um durch RTqPCR-Analysen semi-quantifiziert zu werden. Dabei ergaben sich 14 differenziell exprimierte Gene, acht gleichmäßig nach oben regulierte Gene und neun Gene ohne relevante Transkriptionsveränderung. Für die Gensequenz von CALCA konnte keine erfolgreiche RTqPCR Replikation durchgeführt werden.

Im folgenden Kapitel werden die 14 differenziell exprimierten Gensequenzen im einzelnen beschrieben. Dabei sollen Erwähnungen in vorangegangene Publikationen, ihre zellbiologische Funktion und die Relevanz ihrer Transkriptionsveränderung diskutiert werden. Die Aufzählung erfolgt dabei wie im Ergebnisteil in alphabetischer Reihenfolge. Die Abbildungen der einzelnen RTqPCR Ergebnisse sind die selben wie im Ergebnisteil und werden zur Übersicht für die einzeln diskutieren Gene nochmals dargestellt.

## 6.2.2 Differenziell exprimierte Gensequenzen

### 6.2.2.1 Die Expression von CLEC7A

Vollständiger Name:

C-Type Lectin Domain Family 7, Member A.

Auch bekannt als: BGR, CANDF4, DECTIN1 und CLECSF12.

Funktionsgruppe: Immunrezeptor / Pattern-recognition Rezeptor

Dieses Gen encodiert ein Mitglied der C-typ lectin/ C-typ lectin-like domain (CTL/CTLD) Superfamilie. Es funktioniert als pattern-recognition Rezeptor für  $\beta$ -Glucane und Carbohydrate und dient der Immunität gegen Pilze, Bakterien, Viren und Nematoden. Seine Expression ist in Dendritischen Zellen, PMN, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen beschrieben. In PMN triggert es die Phagozytose und den Respiratorischen Burst<sup>72</sup>.

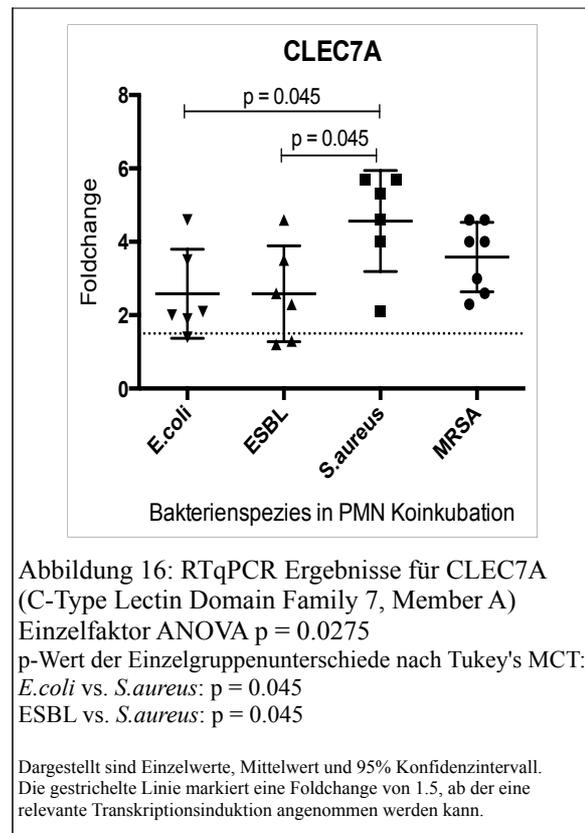


Abbildung 16:  
RTqPCR Ergebnisse für CLEC7A

Für CLEC7A zeigte sich in der RTqPCR ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expressionsregulation zwischen *E.coli* und *S.aureus* sowie zwischen ESBL und *S.aureus*. Bei Betrachtung der Foldchange Mittelwerte zeigen sich Differenzen von maximal 1.9 Foldchanges (*E.coli* = +2.6; ESBL = +2.6; *S.aureus* = +4.5; MRSA = +3.5) und eine Überschneidung aller Konfidenzintervalle. Somit ist ein biologisch tatsächlich relevanter Expressionsunterschied unwahrscheinlich. Die Versuche zeigen, dass PMN als Reaktion auf Bakterienkontakt die Transkription von CLEC7A nach oben regulieren. Li et al. zeigten, dass PMN nach Stimulation mit MBL (mannose binding lectin) ebenso mit einer Hochregulation von CLEC7A reagieren<sup>73</sup>. Eine tatsächliche Induktion der CLEC7A Transkription in PMN durch Pathogenkontakt erscheint somit plausibel.

## 6.2.2.2 Die Expression von EHD1

Vollständiger Name:

EH-domain containing 1.

Auch bekannt als: Testilin, PAST homolog 1.

Funktionsgruppe:

Protein-Protein-Interaktion / Phagozytose

Dieses Gen gehört zu einer hochkonservierten Genfamilie, die EPS14 homology (EH) domain-containing Proteine encodiert. Die EH-Domäne ist ein wichtiges Motiv für Proteine die bei Protein-Protein-Interaktionen und intrazellulären Sortierungsprozessen involviert sind <sup>74</sup>.

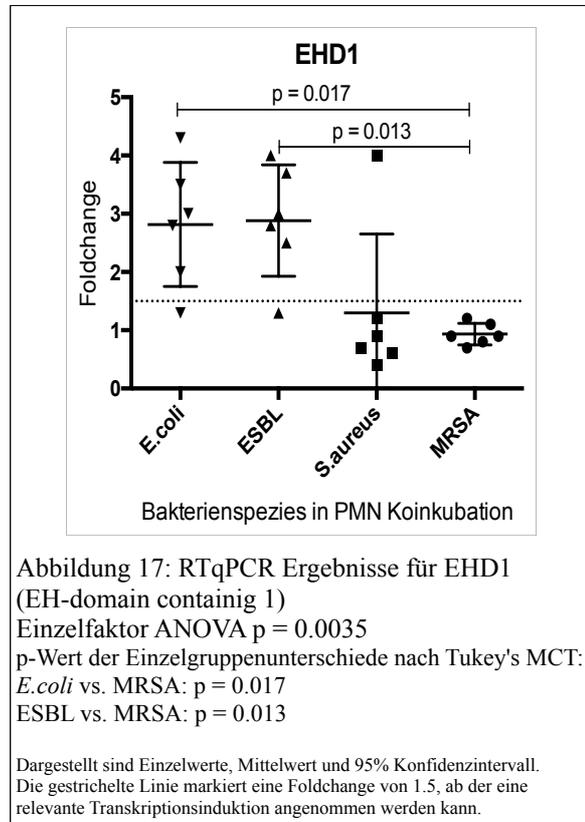


Abbildung 17:  
RTqPCR Ergebnisse für EHD1

Sukumaran et al. untersuchten die Expressionsveränderungen in PMN nach Infektion durch das Gram-negative Bakterium *Anaplasma Phagozytophilium*<sup>59</sup>. Für EHD1 (EH-domain containing 1) findet sich dabei eine Foldchange von +3.25. Dies korreliert mit den hiesigen Ergebnissen, bei denen ebenfalls für EHD1 eine Expressionsänderung für Gram-negative gefunden wurde (im Mittel +2.8 für *E.coli* und +2.8 für ESBL). Im Gegensatz dazu findet sich als Antwort auf Gram-positive eine marginale Expressionsveränderung (im Mittel +1.3 für *S.aureus* und +0.9 für MRSA), wobei nur ein einzelner Ausreißerwert bei *S.aureus* die Foldchange von 1,5 überschreitet. Erwähnungen zu der konkreten Funktion von EHD1 oder der EHD-Superfamilie bei PMN gibt es noch nicht. Jedoch ist bekannt, dass das Protein von EHD1 eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Phagozytose (auch bekannt als Rezeptor-vermittelte Phagozytose), nicht aber der Carveolae-vermittelten Phagozytose zu spielen scheint<sup>75</sup>. Inwieweit unterschiedliche Bakterien unterschiedliche Arten der Phagozytose in PMN auslösen ist nicht bekannt. Im Hinblick auf die fast ausschließlich durch Gram-negative Bakterien induzierte Transkription von EHD1 und dessen Aufgabe bei der

Phagosomenbildung könnte vermutet werden, dass dabei unterschiedliche Phagozytosearten eine Rolle spielen. Ebenso fiel in den Vorexperimenten auf, dass die Phagozytoserate für *E.coli* und ESBL geringer war und langsamer vonstatten ging als die von *S.aureus* und MRSA. Auch hierbei könnten Unterschiede in der Phagozytoseart eine Rolle spielen (vgl. Kapitel 5.4).

### 6.2.2.3 Die Expression von FOS

Vollständiger Name: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog.  
 Auch bekannt als: p55; AP-1; C-FOS.  
 Funktionsgruppe: Transkriptionsfaktor

FOS ist ein humanes Homolog zum viralen Onkogen v-FOS. Es ist Mitglied der großen FOS-Transkriptionsfaktoren Familie. Das von FOS encodierte Protein hat eine Leucinzipper Region und bildet mit c-JUN ein Heterodimer namens AP1 (Activator Protein 1). Es bindet DNA an AP1 spezifischen Promotor und Enhancer Sequenzen und reagiert so auf extrazelluläre Signale mit einer Veränderung der Genexpression. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung, Überleben und Hypoxieadaptation<sup>76</sup>.

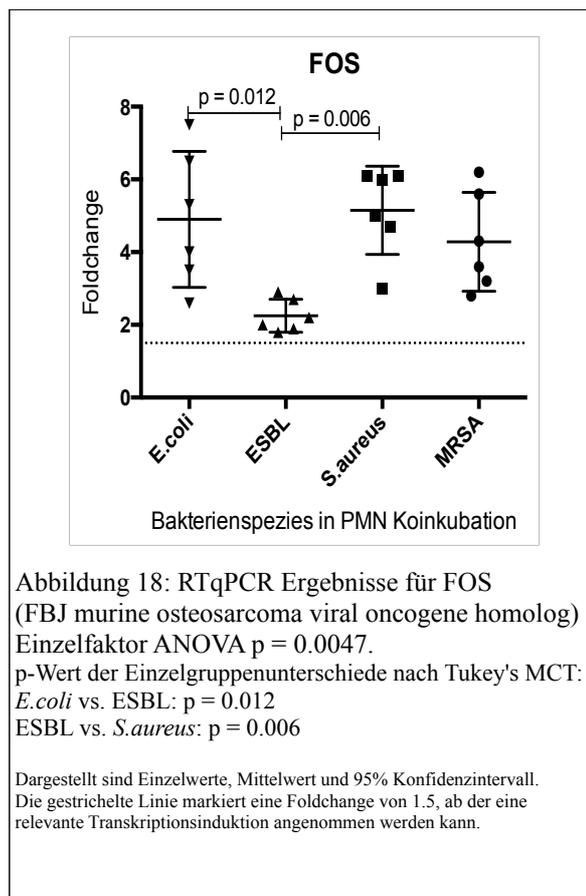


Abbildung 18: RTqPCR Ergebnisse für FOS

FOS spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionsvermittelten hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung zu Granulozyten<sup>77</sup>. Bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom konnte eine verminderte Transkription sowie eine verminderte mRNA Stabilität für FOS in PMN nachgewiesen werden<sup>77</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von PMN mit TNF (Tumor Nekrose Faktor) und GM-CSF die verstärkte Transkription von FOS induziert<sup>78</sup>. Alvarez et al. beschrieben, dass die FOS /AP-1 Transkription in PMN ebenfalls durch bakterielle DNA induziert wird. Zusammengenommen deuten diese

Ergebnisse darauf hin, dass FOS sowohl bei der Differenzierung von PMN wie auch bei der Funktion von ausdifferenzierten PMN eine Rolle spielt. Zhang et al. berichteten, dass FOS in PMN nach *E.coli* Kontakt transient hochreguliert wurde. Transient bedeutet in diesem Falle, dass die Expression nach 60 Minuten Koinkubation mit *E.coli* herauf und nach 120 Minuten wieder herabreguliert war<sup>58</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription nach 120 Minuten gemessen. Eine entsprechende Herabregulation wurde dabei für *E.coli* nicht entdeckt. Es zeigte sich vielmehr, dass nach 120 Minuten in den PMN sowohl für *E.coli* (FC: 4.9), *S.aureus* (FC: 5.1) und MRSA (FC: 4.3) eine starke Transkriptionsinduktion vermittelt wurde. Im Gegensatz dazu steht eine geringere Transkription als Antwort auf ESBL (FC: 2.2). Es wäre interessant zu untersuchen, ob es durch ESBL zu einer aktiven Repression von FOS kommt oder ob die von Zhang et al. postulierte Herabregulation schneller induziert wird.

### 6.2.2.4 Die Expression von ICAM3

Vollständiger Name:

Intercellular adhesion molecule 3.

Auch bekannt als: CD50; CDW50; ICAM-R.

Funktionsgruppe: Zell-Zell Bindung

Das encodierte Protein ist Mitglied der intracellular adhesion molecule (ICAM)-Familie, einer Gruppe von Typ1 transmembran-Glycoproteinen die das leukozytäre Adhäsionsprotein LFA1 (lymphocyte function associated antigene 1) binden. LFA1 findet sich auf T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Zellen zu Entzündungsorten. ICAM3 spielt allerdings nicht nur als Bindungsprotein sondern auch als Signalmolekül eine wichtige Rolle<sup>79</sup>.

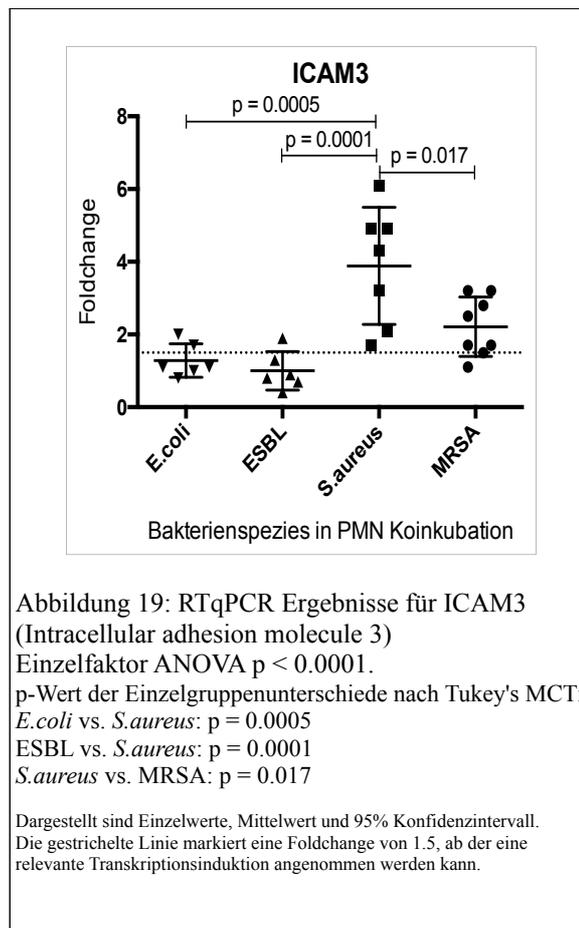


Abbildung 19:  
RTqPCR Ergebnisse für ICAM3

Theilgaard-Monch fand in PMN aus Wundgewebe eine Herabregulation von ICAM3 von -1.4 Foldchanges<sup>57</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, dass der Kontakt mit Gram-negativen Spezies (*E.coli*: FC = +1.3 und ESBL : FC = +1.0) zu keiner relevanten Heraufregulation von ICAM3 kommt. Im Gegensatz dazu stehen die Gram-positiven Bakterien, für die jeweils eine Expressionsinduktion von FC = +3.9 für *S.aureus* und FC = +2.2 für MRSA zu finden ist. Constantini et al. fanden Belege dafür, dass PMN über ICAM3 den Cross-talk mit Natural Killer (NK) Zellen über CD11d/CD18 regeln und darüber eine verstärkte IFN $\gamma$  Sekretion durch die NK-Zellen bewirken<sup>80</sup>. Weiterhin konnten Kinjo et al. zeigen, dass ein bestimmter Subtyp, die sogenannten invariant Natural Killer (iNK) Zellen, auch direkt die Glycolipide Gram-positiver Bakterien erkennen können und eine maßgebliche Rolle bei deren Abwehr spielen<sup>81</sup>. Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit in PMN und NK-Zellen sowohl einzeln als auch im Verbund bei der Abwehr von Gram-positiven Bakterien spezifische Mechanismen zum Einsatz kommen und wie sich diese von

den Abwehrmechanismen gegen Gram-negative Bakterien unterscheiden. Die differenzielle Induktion von ICAM3 in PMN nach Kontakt mit Gram-positiven könnte als Hinweis dazu dienen.

### 6.2.2.5 Die Expression von IRAK1

Vollständiger Name:

Interleukin-1 receptor-associated kinase 1.

Funktionsgruppe: Signaltransduktion

Das encodierte Protein ist eine von zwei putativen Serine/Threonine Kinasen die sich nach Stimulation mit IL1R (Interleukin-1 Rezeptor) assoziieren. Es wurde gezeigt, dass IRAK 1 mit MyD88, IKK1, IKK2, TRAF6, CHUK und Ubiquitin C interagiert. Es sind aktuell drei verschiedene Splicevarianten von IRAK1 bekannt<sup>82</sup>.

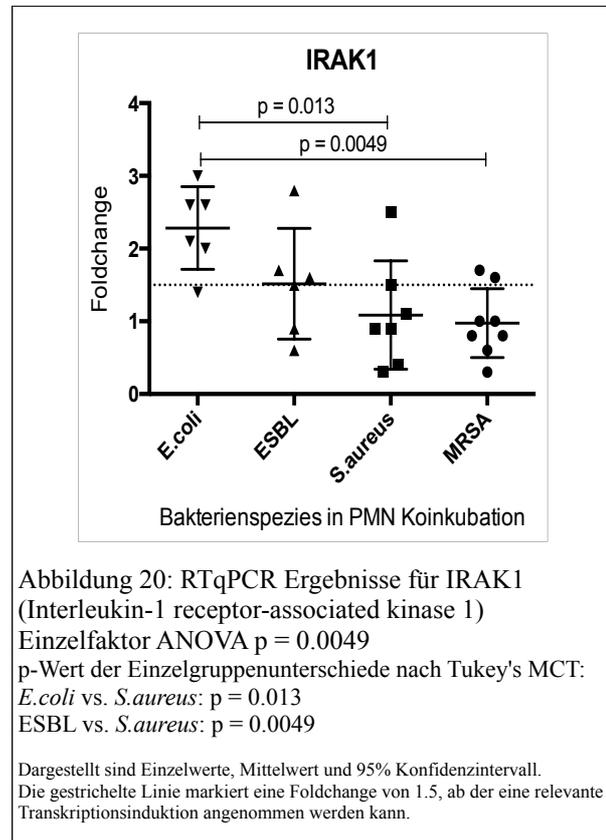


Abbildung 20:  
RTqPCR Ergebnisse für IRAK1

Surmiak et al. stellten fest, dass PMN durch Stimulation mit Antikörpern gegen PR3 (proteinase-3), dem Antikörper der beim Krankheitsbild der Wegenerschen Granulomatose auftritt, mit einer Transkriptionserhöhung verschiedener Gene reagieren, darunter auch IRAK1<sup>83</sup>. IRAK1 spielt in seiner Funktion als IL1-Rezeptor Signalvermittler eine Rolle bei der Toleranzinduktion. THP1-Zellen (eine monozytäre Zelllinie), bei denen gegen bakterielles LPS (Lipoprotein) eine Toleranz induziert wurde, zeigten eine verminderte IRAK1 Expression. Durch eine vektorvermittelte IRAK1 Überexpression wurden die Zellen wieder empfindlich gegenüber bakteriellem Lipoprotein<sup>84</sup>. Entgegen früherer Annahmen, dass IRAK1 insbesondere wichtig für den NF-kappaB Weg sei, ist inzwischen bekannt, dass es eher ein Rolle bei der Aktivierung von Stat3 und der anschließenden Transkriptionsinduktion von IL10 spielt<sup>85</sup>. IRAK1 und IRAK2 regulieren in PMN weiter downstream die

Signalkaskade von IRAK4. In Knock-out Mäusen zeigt sich, dass bei IRAK4<sup>-/-</sup> die Rekrutierung von PMN nicht mehr funktioniert. Für IRAK1 und IRAK2 sorgt nur der Knock-Out beider Gene für einen ähnlichen Funktionsverlust der PMN-Rekrutierung<sup>86</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die IRAK1 Transkription durch Gram-negative Bakterien hochreguliert, nicht aber durch Gram-positive. Es gilt zu beachten, dass dieser Unterschied aber geringer war als bei IRAK2 (Vergleiche Kapitel 6.2.2.6). Es wäre dennoch interessant zu untersuchen, in wie weit unterschiedliche TLR Stimulationen durch verschiedene Bakterien für unterschiedliche IRAK1 Transkriptionsvorgänge verantwortlich sind.

### 6.2.2.6 Die Expression von IRAK2

Vollständiger Name:

Interleukin-1 receptor-associated kinase 2.

Funktionsgruppe: Signaltransduktion

Das encodierte Protein ist eine von zwei putativen Serine/Threonine Kinasen die sich nach Stimulation mit IL1R (Interleukin-1 Rezeptor) assoziieren. IRAK2 ist dabei insbesondere für die IL-1 induzierte Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF-kappa B verantwortlich. Weiterhin wurde gezeigt, dass IRAK 2 mit MyD88 und TRAF6 interagiert<sup>87</sup>.

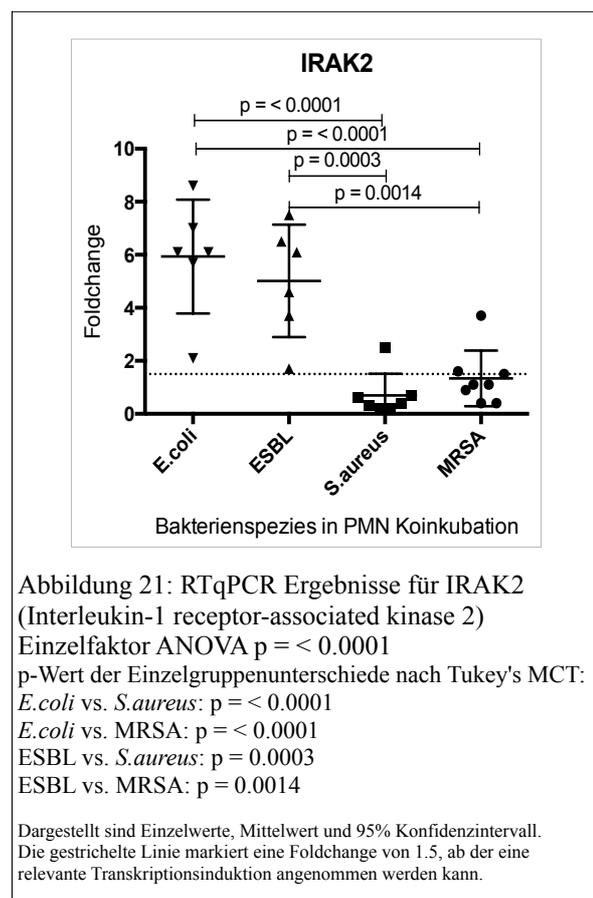


Abbildung 21:  
RTqPCR Ergebnisse für IRAK2

In seiner Funktion scheint IRAK2 eine Rolle als proximaler Mediator des TLR 3,4 und 8 Signalwegs über TRAF6 und NF-kappaB zu spielen<sup>88</sup>. IRAK2 (interleukin-1 receptor-associated kinase 2) ist bei den Ergebnissen von Sukumaran mit einer Foldchange von +5.25 stark heraufreguliert (nach PMN Infektion mit *A.phagozytophilium*)<sup>59</sup>. In der vorliegenden

Arbeit zeichnet es sich durch eine sehr starke Transkriptionsinduktion durch Gram-negative aus (*E.coli*: FC = +5.9; ESBL: FC = 5.0) Als Antwort auf die Koinkubation mit Gram-positiven kam es dagegen nur zu einer marginalen bis negativen Genregulation (*S.aureus*: FC = 0.7; MRSA: FC = 1.3). IRAK2 ist in dieser Arbeit die Gensequenz mit dem statistisch größten signifikanten Transkriptionsunterschied zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und der eindeutigste Beleg dafür, dass verschiedene Bakterienspezies unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten in PMN auslösen. LPS von Gram-negativen Bakterien wird von TLR4 erkannt. Dabei ist bekannt, dass TLR4 nach der Aktivierung einen Komplex mit MyD88, IRAK4 und IRAK2 eingeht<sup>89</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Knock-down von IRAK2 das NF-kappaB Signal von TLR3, TLR4 und TLR8 unterdrückte. Dabei wurde insbesondere die TLR4 abhängige Chemokinproduktion gehemmt<sup>88</sup>. Zusammengefasst deuten diese Hinweise darauf hin, dass TLR4 und IRAK2 eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Gram-negativen durch PMN spielen könnten und die IRAK2 Transkription nur bei Gram-negativen, nicht jedoch bei Gram-positiven hochreguliert wird.

### 6.2.2.7 Die Expression von KMO

Vollständiger Name:

Kynurenine-3-monooxygenase

Auch bekannt als: Kynurenine 3-hydroxylase,  
dJ317G22.1

Funktionsgruppe: Tryptophan Metabolismus

KMO enkodiert ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran. Es katalysiert die Hydroxylierung des L-Tryptophan Metaboliten, L-Kynureine, zu L-3-Hydroxykynureine<sup>90</sup>.

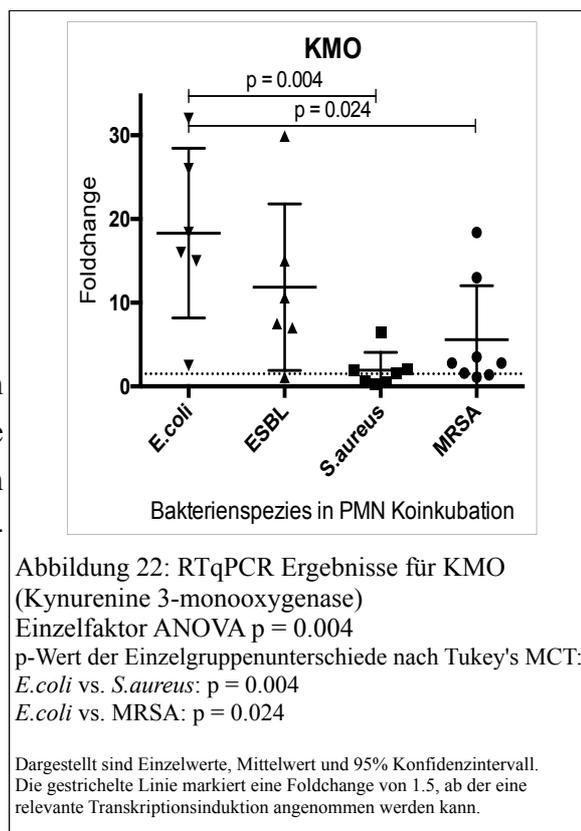


Abbildung 22:  
RTqPCR Ergebnisse für KMO

KMO (kynurenine 3-monooxygenase) wurde nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien wesentlich stärker exprimiert als mit Gram-positiven (Foldchange *E.coli* +18.3, ESBL + 11.9, *S.aureus* +1.9, MRSA +5.6). Über seine Funktion in PMN gibt es bisher keine Beschreibungen, es spielt jedoch zusammen mitIDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) eine Rolle im Metabolismus von Tryptophan<sup>91</sup>. Der Tryptophan Metabolismus scheint eine wichtige Rolle im Immunsystem einzunehmen. Es wird vermutet, dass er bei Toleranzinduktion, Apoptose und Bakterieninhibition eine Rolle spielt<sup>92</sup>. Über die konkrete Funktion des Tryptophanmetabolismus in PMN ist aktuell nichts bekannt. Der Nachweis der hohen Expression von KMO weist aber auf eine mögliche Funktion hin. Weiterhin fällt auf, dass die Transkription von KMO wesentlich stärker nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien induziert wurde. Dies könnte auf eine spezielle Funktion des Tryptophanmetabolismus bei der Abwehr von Gram-negativen Bakterien in PMN hinweisen. Andererseits wurde gezeigt, dass die Transkription von KMO in Dendritischen Zellen nach Infektion mit dem Gram-positiven Bakterium *Listeria monozytogenes* erhöht ist<sup>93</sup>. Daraus könnte man schließen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Gram-positiven Bakterien die KMO Transkription in PMN repressieren. In jedem Falle scheint die weitere Analyse des

Tryptophanmetabolismus in PMN ein bisher unbekanntes, aber vielversprechendes Forschungsfeld zu sein. Mit einer Expressionsdifferenz von mindestens fünf Foldchanges zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien ist KMO ein weiteres Gen, das in PMN nach Kontakt mit verschiedenen Bakterien unterschiedlich exprimiert wird.

### 6.2.2.8 Die Expression von NOP2

Vollständiger Name:

NOP2 nucleolar protein.

Auch bekannt als:

NOL1, p120, NSUN1 und NOP120.

Funktionsgruppe: Zellzyklus Regulation

NOP2 encodiert die putative ribosomale RNA Methyltransferase NOP2. Das Protein ist ein nucleoläres Antigen und wird von proliferativen Zellen exprimiert. In nichtproliferativem Gewebe konnte es bisher nicht nachgewiesen werden<sup>94</sup>.

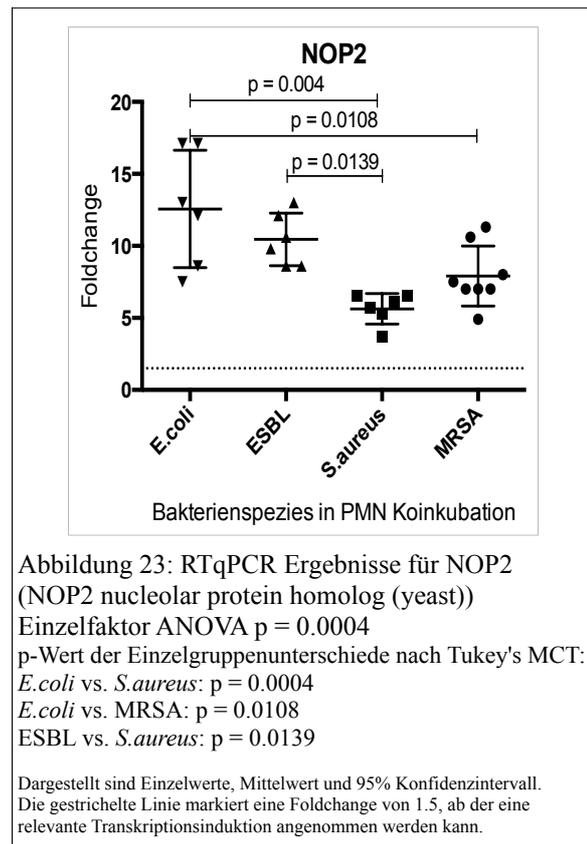


Abbildung 23:  
RTqPCR Ergebnisse für NOP2

NOP2 (NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)) ist ein RNA-bindendes Protein. Khanna-Gupta et al. beschrieben es als Signalantwort auf G-CSF von myeloischen Stammzellen, wo es im Reifungsprozess der Granulopoese eine Rolle zu spielen scheint. Über die konkrete Funktion von NOP2 ist allerdings nichts bekannt<sup>95</sup>. In den Ergebnissen dieser Arbeit erschien es stark exprimiert als Antwort auf Gram-negative Bakterien (im Mittel *E.coli* +12.6 und ESBL +10.5) und etwas schwächer als Antwort auf Gram-positiv (*S.aureus* +5.6 und MRSA +7.9). NOP2 stellt damit ein weiteres differentiell exprimiertes Gen in PMN nach Bakterienkontakt dar. Zusätzlich lässt dies vermuten, dass NOP2 neben seiner Rolle im Reifungsprozess von PMN auch eine Funktion bei ausdifferenzierten Granulozyten spielt.

### 6.2.2.9 Die Expression von RALGDS

Vollständiger Name:

Ral guanine nucleotide dissociation stimulator.

Auch bekannt als: RGF, RGDS und RalGEF.

Funktionsgruppe: Signaltransduktion

Guanine-nucleotid Dissoziations-Stimulatoren (GDS oder exchange factors genannt) sind Effektorproteine für Ras GTPasen und spielen bei einer Vielzahl Zellulärer Prozesse einer Rolle. RALGDS interagiert mit RRAS, RAP2A, RAP1A, KRAS, RAPGEF2, MRAS, HRAS, Arrestin beta 2 und Arrestin beta 1<sup>96</sup>.

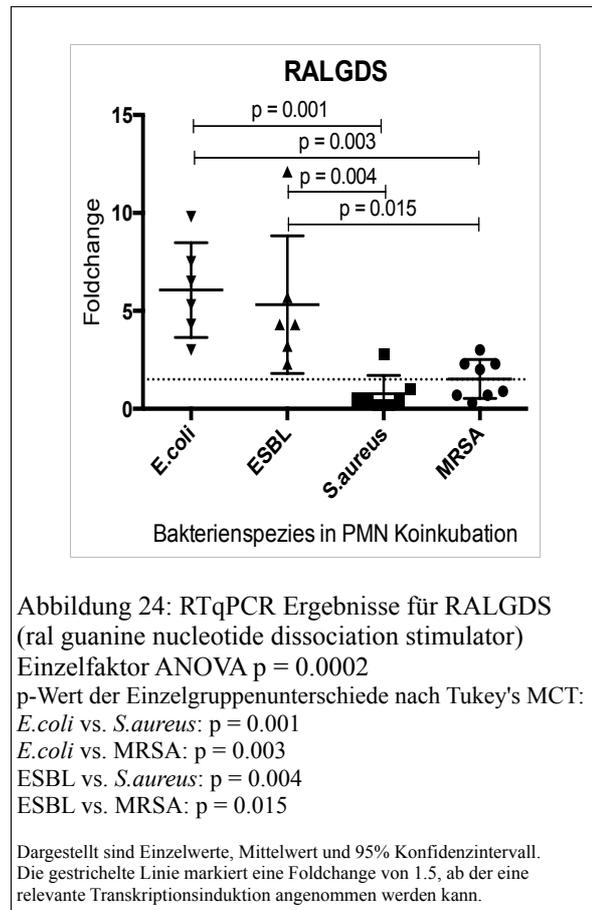


Abbildung 24:  
RTqPCR Ergebnisse für RALGDS

RALGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) ist ein Stimulator kleiner GTPasen die mit verschiedenen Prozessen, wie etwa der Regulation des oxidativen Burst und der myeloischen Differenzierung als Antwort auf C-GFS in Zusammenhang gebracht werden<sup>97,98</sup>. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der RALGDS effektorpathway zusammen mit  $\beta$ -Arrestin Umstellungsprozesse im Zytoskelett von PMN nach Stimulation mit dem Chemoattraktanten fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) regelt<sup>99</sup>. In dieser Arbeit fiel für RALGDS auf, als es durch Gram-negative Bakterien stark reguliert wurde (*E.coli* +6.1, ESBL +5.3) und nicht bzw. kaum durch Gram-positive Bakterien (*S.aureus* +0.8 und MRSA +1.5). Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob PMN fMLP und Bestandteile Gram-negativer Bakterien über den gleichen Rezeptor erkennen und welcher der RALGDS gesteuerten Prozesse dabei eine besondere Rolle bei ihrer Abwehr spielt. Andererseits ist auch möglich, dass die getesteten Gram-positiven Bakterien RALGDS und die mit ihm verbundenen Abwehrprozesse unterdrücken.

### 6.2.2.10 Die Expression von SLC11A2

Vollständiger Name:

Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 2.

Auch bekannt als: DCT1, DMT1, NRAMP2.

Funktionsgruppe: Metallionen Transporter

SLC11A2 encodiert DMT1 (divalent metal transporter 1), auch bekannt als NRAMP2 (natural resistance-associated macrophage protein 2). DMT1 repräsentiert eine große Familie hochkonservierter orthologer Metallionen-Transportmoleküle<sup>100</sup>.

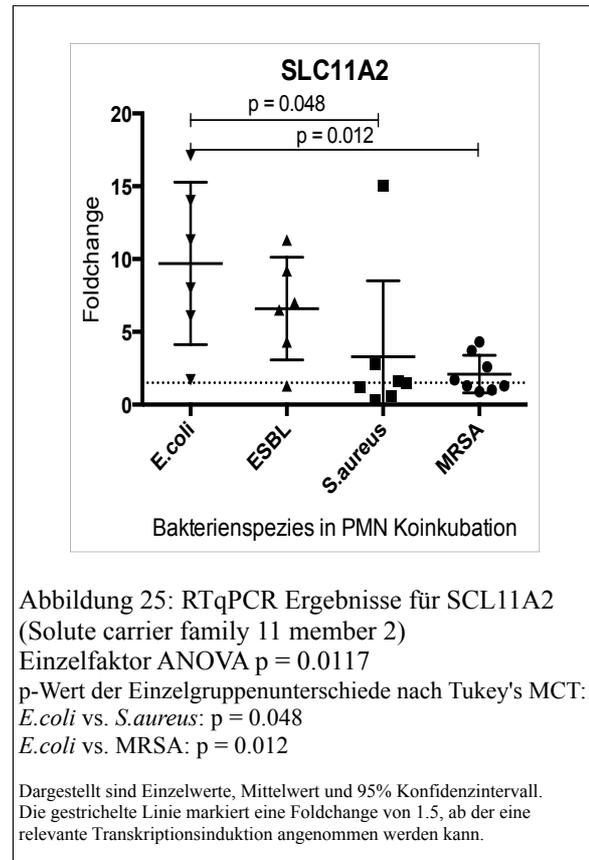


Abbildung 25:  
RTqPCR Ergebnisse für SLC11A2

Für SLC11A (soulte carrier family 11 member 2) geben Sukumaran et al. in PMN nach *A.phagozytophilium* Kontakt eine Foldchange von +2.49 an<sup>59</sup>. Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit findet sich eine starke Transkriptionserhöhung nach Kontakt mit Gram-negativen (*E.coli* +9.7 und ESBL +6.6) und eine schwächere nach Kontakt mit Gram-positiven Bakterien (*S.aureus* +3.3 und MRSA +2.1). Funktionell gehört das Protein von SLC11A zu der NRAMP Familie divalenter Metall Efluxpumpen und ist als solche wichtig für die Phagosomenfunktion von PMN und Makrophagen. Mutationen des Gens sind mit einer erhöhten Infektanfälligkeit verbunden<sup>101</sup>. Inwieweit SLC11A durch Gram-negative stärker aktiviert wird oder durch Gram-positive Bakterien repressiert wird, wäre gerade im Hinblick auf den beschriebenen Immundefekt lohnenswert nachzuweisen.

### 6.2.2.11 Die Expression von SRP54

Vollständiger Name:

Signal recognition particle 54kDa.

Funktionsgruppe: Proteintransport

SRP54 ist eine essenzielle Komponente des SRP (Signal recognition particle) ribonucleoprotein Komplexes. SRP ist ein universell konserviertes Ribonucleoprotein das den Verkehr von Proteinen in Zellen regelt und bei der Proteinsekretion eine wichtige Rolle spielt<sup>102</sup>.

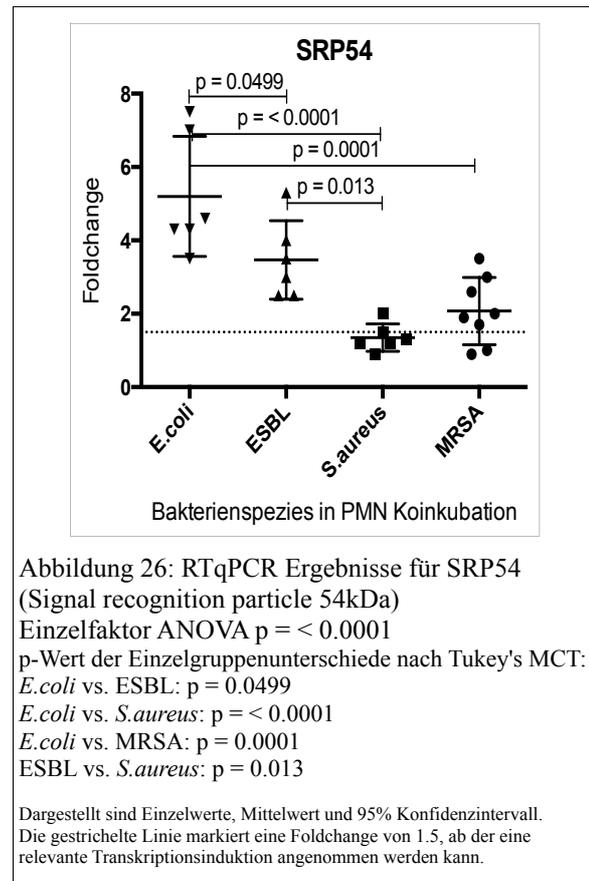


Abbildung 26:  
RTqPCR Ergebnisse für SRP54

SRP54 (signal recognition particle 54kDa) beschreiben Theilgaard-Mönch et al. bei PMN aus Wundgewebe als heraufreguliert<sup>57</sup>. Bei Zahng et al. wird SRP54 als late response (120 min) nach Kontakt mit *E. coli* aufgeführt und wird in seiner Funktion der Protein Synthese und Stabilisierung zugeschrieben<sup>58</sup>. In dieser Arbeit wurde für SRP54 ebenfalls eine positive Regulation gefunden, wobei allerdings die Gram-negativen Bakterien eine stärkere Induktion bewirkten als Gram-positive. Der SR-Protein Familie werden vielseitige Funktionen der RNA Prozessierung zugeschrieben<sup>103</sup>. Eine Funktionsanalyse in Granulozyten wurde bisher noch nicht vorgenommen.

### 6.2.2.12 Die Expression von TLR6

Vollständiger Name: Toll-like Rezeptor 6

Auch bekannt als: CD286

Funktionsklasse: Immunrezeptor / Pattern-recognition Rezeptor

TLR6 ist Mitglied der hochkonservierten Toll-like Rezeptorfamilie. Es interagiert mit TLR2 und vermittelt die Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen<sup>104</sup>.

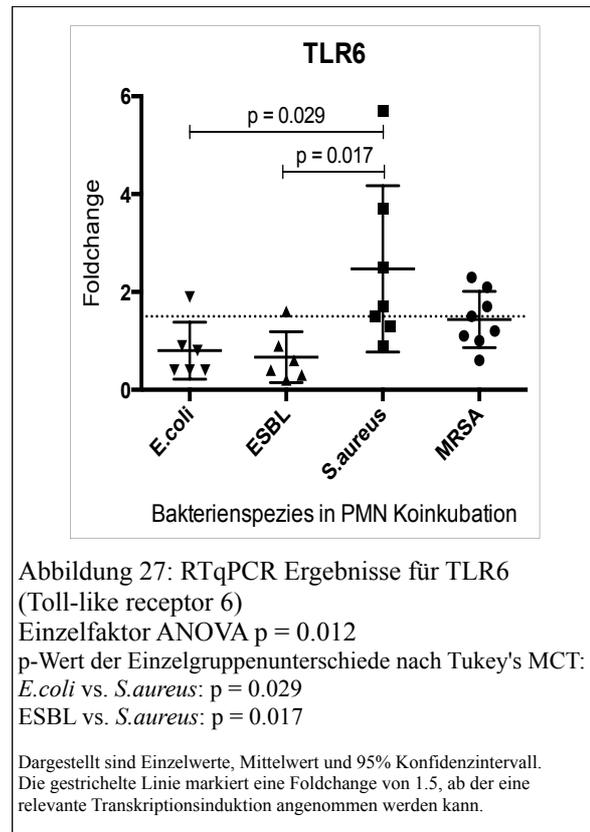


Abbildung 27:  
RTqPCR Ergebnisse für TLR6

TLR6 scheint ein wichtiger Co-Rezeptor für TLR2 zu sein, da er sowohl die TLR2 vermittelte Zellantwort verstärkt als auch die Inhibition von TLR2 vermindert. TLR2 ist hauptsächlich für die Erkennung von Lipoteichoic acid, Lipopeptiden und Peptidoglycanen von Gram-positiven Bakterien und Mycobakterien zuständig<sup>105</sup>. Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass PMN als Antwort auf Gram-positive Bakterien mit einer gesteigerten TLR6 Transkription reagieren wobei für MRSA die Transkriptionserhöhung geringer ausfällt (*S.aureus*: FC = 2.5, MRSA: FC = 1.4). Nach Kontakt mit Gram-negativen fand eine Herabregulation statt (*E.coli*: FC = 0.8, ESBL: FC = 0.7). Dies ist in Einklang mit der Erkenntnis, dass TLR6 als Verstärker für den auf Gram-positive Bakterien ausgerichteten TLR2 Rezeptor wirkt. Damit ist TLR6 die erste der untersuchten Gensequenzen, für die eine spezifische Hochregulation der Transkription als Antwort auf Gram-positive Bakterien in PMN geschieht.

### 6.2.2.13 Die Expression von TPM3

Vollständiger Name: Tropomyosin 3

Funktionsklasse: Aktin-bindendes Protein

Dieses Gen encodiert für ein Mitglied der Tropomyosin Familie von Aktin-bindenden Proteinen in kontraktilen Systemen von Muskelzellen und dem Zytoskelett von Nichtmuskelzellen<sup>106</sup>.

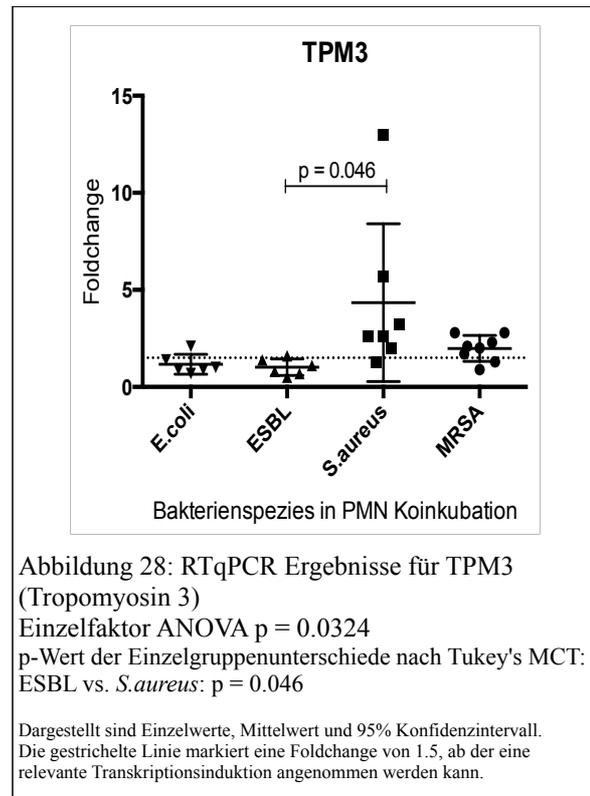


Abbildung 28:  
RTqPCR Ergebnisse für TPM3

TPM3 (Tropomyosin 3) fiel durch eine starke Expressionsinduktion durch *S.aureus* auf (Mittelwert +4.3), während durch MRSA die Expression nur um eine Foldchange von +2 stieg. Bei den Gram-negativen wurde die TPM3 Expression nur marginal erhöht (*E.coli* +1.2, ESBL +1.0). Subrahmanyam et al. beschrieben eine Hochregulierung von TPM3 in PMN als Antwort auf *Y.pestis*<sup>54</sup>. Untersuchungen zu Tropomyosin in PMN liegen relativ lange zurück, die erste Erwähnung findet sich 1973 bei Stossel und Pollard<sup>107</sup>. 1997 beschrieben Kasper et al. die Überexpression von Tropomyosin in Patienten mit chronischer Neutropenie<sup>108</sup>. Danach wurde das Thema anscheinend nicht weiter bearbeitet und über die Funktion von TPM3 in PMN ist weiterhin nichts bekannt. TPM3 ist die zweite Gensequenz dieser Arbeit die bei PMN nur als Reaktion auf Gram-positive Bakterien hochreguliert wurde.

## 6.2.2.14 Die Expression von UBTD2

Vollständiger Name: Ubiquitin domain containing 2

Auch bekannt als: DCUBP

Funktionsklasse: unbekannt<sup>109</sup>

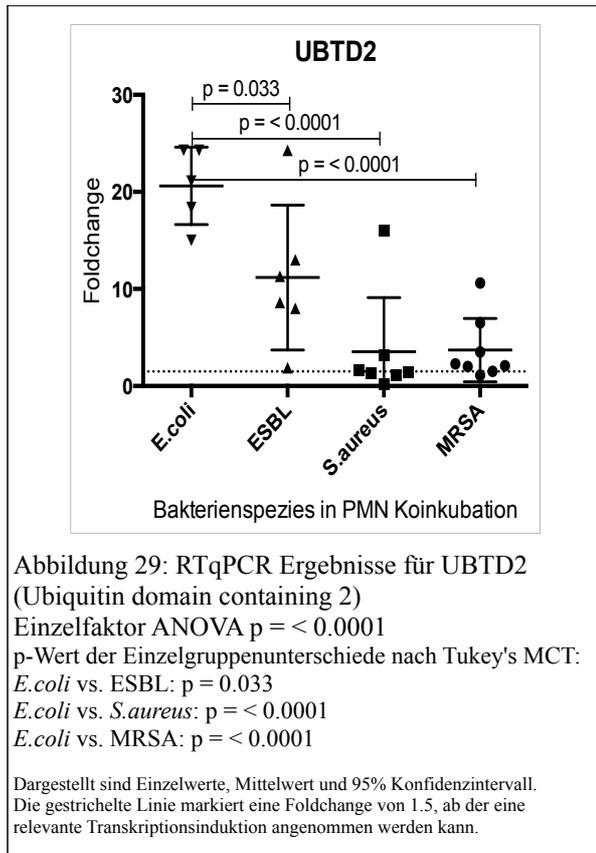


Abbildung 29:  
RTqPCR Ergebnisse für UBTD2

UBTD2 (ubiquitin domain containing 2) ist eine funktionell nicht näher untersuchte Domäne deren Struktur auf eine Funktion im Ubiquitin Pathway hindeutet<sup>110</sup>. In dieser Arbeit kam es durch Gram-negative (Foldchange *E.coli* +20.6, ESBL +11.2) zu einer sehr viel stärkeren Geninduktion von UBTD2 als durch Gram-positive Bakterien (Foldchange *S.aureus* +3.5 und MRSA +3.7).

### **6.3. Mögliche Einsatzgebiete der gefundenen Expressionsunterschiede in PMN nach Bakterienkontakt**

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neutrophile Granulozyten nach Kontakt mit Bakterien unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen. Die gesammelten Daten verweisen dabei auf mögliche, bisher kaum oder nicht beschriebene Regulationsmechanismen verschiedener Zellfunktionen bei PMN. Diese sind EHD1 in der Phagozytose, ICAM3 als Bindeglied zwischen PMN und NK bei der Bekämpfung von Gram-positiver Bakterien, unterschiedliche Toll-like Rezeptor Aktivierungen und Signalwege in der IRAK-Familie und die Rolle des Tryptophanmetabolismus bei PMN. Neben der Geninduktion durch bestimmte Bakterien wäre es auch interessant der Frage nachzugehen, inwieweit Virulenzfaktoren von Bakterien für eine spezifische Repression der Genantwort von PMN verantwortlich sind und so zu ihrer Pathogenität beitragen. Insbesondere die, in den Microarrayanalysen dieser Arbeit aufgefallene, hohe Anzahl an negativ regulierten Genen nach Kontakt mit humanpathogenen Klinikisolaten kann als Hinweis darauf gewertet werden. Weitergehende Untersuchungen der in Kapitel 6.2.2 aufgeführten Gensequenzen erscheinen daher vielversprechend.

Eine weitere Überlegung wäre, dass die in dieser Arbeit gefundenen Expressionsunterschiede als theoretische Grundlage für eine Wirts-basierte Infektionsdiagnostik dienen könnten. Diese könnte einen wichtigen Beitrag zur Lösung der aktuellen Herausforderungen in der Infektionsdiagnostik leisten. Granulozyten werden in der Diagnostik schon seit langer Zeit als Infektionsmarker genutzt. Dabei erscheint die absolute Granulozytenanzahl und das Vorkommen toxischer Granula als sensitivster Parameter bei Bakteriämie. Andere morphologische Veränderungen, wie Bandierung und Vakuolisierung, gelten ebenso wie der absolute WBC (white cell blood count) als nur wenig sensitiv<sup>111</sup>. Lilius und Nuutila publizierten 2012 ein Review über die Möglichkeiten der Infektionsdiagnostik anhand der Expression von Oberflächenrezeptoren auf PMN. Dabei verwiesen sie auf unterschiedliche Score-Berechnungsmodelle, welche die Expressionshöhe von FcγRI, CR1, CR3 sowie Messergebnisse von CRP und ESR (erythrocyte sedimentation rate) miteinbeziehen<sup>29</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte differenzierte Genexpression von PMN könnte als weiterer Ansatzpunkt dazu dienen Infektions- und Entzündungszustände zu differenzieren und objektivieren. Wenn sich die Expressionsunterschiede mit weiteren Bakteriengruppen und -spezies in-vitro reproduzieren ließen, wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit sich diese Unterschiede auch bei PMN aus dem Blut von Patienten mit Bakteriämien wiederfinden. Falls sich beispielsweise bei Infektionen mit Gram-positiven Bakterien eine Hochregulation für ICAM3 und TLR6 zusammen mit keiner Regulation von IRAK2 und RALGDS fände,

könnte dies in Zukunft diagnostisch genutzt werden. Ein auf Gram-negative Bakterien hinweisendes Expressionsmuster wäre entsprechend eine Hochregulation von EHD1, IRAK1, RALGDS und keine Regulation von ICAM3 und TLR6. Diese Unterschiede könnten kostengünstig über eine real-time PCR gemessen werden, wobei die Frage besteht, ob dies direkt im Vollblut geschehen könnte oder mit isolierten PMN. Grundsätzlich stellt sich ebenso die Frage, ob die Genregulation nach direktem Bakterienkontakt in hoher MOI dieselbe ist wie nach dem sehr viel geringeren direkten Bakterienkontakt bei Bakteriämien.

Eine weitere diagnostische Herausforderung ist die Differenzierung zwischen Infektionen und non-infektiösen Entzündungsgeschehen. Die Behandlung viraler oder anderer nicht-bakterieller, inflammatorischer Krankheitsbilder mit Antibiotika ist nicht nur ineffektiv, sondern trägt auch zur Entwicklung von Resistenzen, toxischen und allergischen Reaktionen und höheren Behandlungskosten bei. Eine Verbesserung der Diagnose von bakteriellen Infektionen könnte somit die Qualität der medizinischen Behandlung von Entzündungsgeschehen erhöhen, helfen Antibiotika-resistenzen einzudämmen und Kosten zu senken. Es ist zu erwägen, ob auch hier das Expressionsprofil von Neutrophilen Granulozyten eine Hilfestellung leisten könnte. Dabei sind vor allem die in dieser Arbeit als gleichmäßig nach Bakterienkontakt hochregulierten Gene von Interesse (vergleiche Kapitel 5.5.2). Dabei könnte beispielsweise eine Expressionssteigerung von DNAJB9 und ICAM1 auf eine bakterielle Genese von Entzündungsgeschehen hinweisen.

Im Allgemeinen muss darauf hingewiesen werden, dass die hier mittels RTqPCR gemessenen Expressionsunterschiede Foldchanges darstellen, das heißt relative Veränderungen im Bezug zu Negativ-Kontrollen. Es gilt daher die ermittelten Gene in folgenden Arbeiten absolut zu quantifizieren.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Kaufmann, S. H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 9, 705-712 (2008).
2. Cavaillon, J. M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol* 90, 413-424 (2011).
3. Babior, B. M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64, 959-966 (1984).
4. Kumar, V. & Sharma, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 10, 1325-1334 (2010).
5. Barreda, D. R., Hanington, P. C. & Belosevic, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28, 509-554 (2004).
6. Lindsay, M. A. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29, 343-351 (2008).
7. Lieschke, G. J. et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84, 1737-1746 (1994).
8. Demetri, G. D. & Griffin, J. D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791-2808 (1991).
9. Ley, K., Smith, E. & Stark, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 34, 229-242 (2006).
10. Stark, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285-294 (2005).
11. von Vietinghoff, S. & Ley, K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 181, 5183-5188 (2008).
12. Eash, K. J., Means, J. M., White, D. W. & Link, D. C. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 113, 4711-4719 (2009).
13. Iyer, C. V. et al. Rapid and recurrent neutrophil mobilization regulated by T134, a CXCR4 peptide antagonist. *Exp Hematol* 36, 1098-1109 (2008).
14. Haddy, T. B., Rana, S. R. & Castro, O. Benign ethnic neutropenia: what is a normal absolute neutrophil count? *J Lab Clin Med* 133, 15-22 (1999).
15. Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J. & Ley, K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol* 136, 717-727 (1997).
16. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657-670 (2010).

17. Theilgaard-Monch, K., Porse, B. T. & Borregaard, N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* 18, 54-60 (2006).
18. Wong, C. H., Heit, B. & Kubes, P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res* 86, 183-191 (2010).
19. Sabroe, I., Dower, S. K. & Whyte, M. K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7, S421-6 (2005).
20. Kobayashi, S. D. et al. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 73, 315-322 (2003).
21. Kobayashi, S. D. et al. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10948-10953 (2003).
22. Croker, B. A. et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13135-13140 (2011).
23. Luo, H. R. & Loison, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 83, 288-295 (2008).
24. Boldrick, J. C. et al. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 972-977 (2002).
25. Kovach, M. A. & Standiford, T. J. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 25, 321-327 (2012).
26. Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20, 825-852 (2002).
27. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30, 459-489 (2012).
28. Janeway, C. A. J. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216 (2002).
29. Lilius, E. M. & Nuutila, J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *ScientificWorldJournal* 2012, 527347 (2012).
30. Borregaard, N., Sorensen, O. E. & Theilgaard-Monch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 28, 340-345 (2007).
31. Atosuo, J. T. & Lilius, E. M. The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *ScientificWorldJournal* 11, 2382-2390 (2011).
32. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5, 1317-1327 (2003).
33. Splettstoesser, W. D. & Schuff-Werner, P. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". *Microsc Res Tech* 57, 441-455 (2002).

34. Soehnlein, O., Zerneck, A. & Weber, C. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb Haemost* 102, 198-205 (2009).
35. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182 (2006).
36. Kasama, T. et al. Neutrophil-Derived Cytokines: Potential Therapeutic Targets in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 4, 273-279 (2005).
37. Akahoshi, T. et al. Production of Macrophage Inflammatory Protein 3 alpha (MIP-3 alpha) (CCL20) and MIP-3 beta (CCL19) by Human Peripheral Blood Neutrophils in Response to Microbial Pathogens. *Infection and immunity* 71, 524-526 (2003).
38. Soehnlein, O. et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112, 1461-1471 (2008).
39. Moret, I. et al. Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. *European Respiratory Journal* 38, 1158-1164 (2011).
40. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, E. Y. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 171, 6052-6058 (2003).
41. van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201, 1281-1292 (2005).
42. Megiovanni, A. M. et al. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 79, 977-988 (2006).
43. Blomgran, R. & Ernst, J. D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 186, 7110-7119 (2011).
44. Costantini, C. & Cassatella, M. A. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J Leukoc Biol* 89, 221-233 (2011).
45. Scapini, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177, 195-203 (2000).
46. Scapini, P., Bazzoni, F. & Cassatella, M. A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunology Letters* 116, 1-6 (2008).
47. Cline, M. J. Phagocytosis and synthesis of ribonucleic acid in human granulocytes. *Nature* 212, 1431-1433 (1966).
48. Clark, F. A. & Klebanoff, S. J. Chronic granulomatous disease: studies of a family with impaired neutrophil chemotactic, metabolic and bactericidal function. *Am J Med* 65, 941-948 (1978).
49. Berton, G., Zeni, L., Cassatella, M. A. & Rossi, F. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 138, 1276-1282 (1986).

50. Hughes, V., Humphreys, J. M. & Edwards, S. W. Protein synthesis is activated in primed neutrophils: a possible role in inflammation. *Biosci Rep* 7, 881-890 (1987).
51. Jack, R. M. & Fearon, D. T. Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 140, 4286-4293 (1988).
52. Girard, D., Paquin, R. & Beaulieu, A. D. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325, 147-153 (1997).
53. Itoh, K. et al. Expression profile of active genes in granulocytes. *Blood* 92, 1432-1441 (1998).
54. Subrahmanyam, Y. V. et al. RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria. *Blood* 97, 2457-2468 (2001).
55. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Buhl, C. L., Stahl, R. M. & DeLeo, F. R. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6901-6906 (2002).
56. Malcolm, K. C., Arndt, P. G., Manos, E. J., Jones, D. A. & Worthen, G. S. Microarray analysis of lipopolysaccharide-treated human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L663-70 (2003).
57. Theilgaard-Monch, K., Knudsen, S., Follin, P. & Borregaard, N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* 172, 7684-7693 (2004).
58. Zhang, X. et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 75, 358-372 (2004).
59. Sukumaran, B., Carlyon, J. A., Cai, J. L., Berliner, N. & Fikrig, E. Early transcriptional response of human neutrophils to *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect Immun* 73, 8089-8099 (2005).
60. Borjesson, D. L. et al. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J Immunol* 174, 6364-6372 (2005).
61. Davidson, D. et al. Gene Expression Profile of Endotoxin-stimulated Leukocytes of the Term New Born: Control of Cytokine Gene Expression by Interleukin-10. *PLoS One* 8, e53641 (2013).
62. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27, 126-139 (2006).
63. Koczan, D. & Thiesen, H. J. Survey of microarray technologies suitable to elucidate transcriptional networks as exemplified by studying KRAB zinc finger gene families. *Proteomics* 6, 4704-4715 (2006).
64. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121 (2001).

65. Hoehgeger, K. et al. In vitro--transcriptional response of polymorphonuclear leukocytes following contact with different antigens. *Eur J Clin Invest* 37, 860-869 (2007).
66. Feezor, R. J. et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 71, 5803-5813 (2003).
67. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408 (2001).
68. GraphPad. GraphPad QuickCalcs: outlier calculator, von: [www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm) (Zugang im Oktober 2011)
69. Barnett, V. & Lewis, T. *Outliers in statistical data* (Wiley New York, 1994).
70. McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* 25, 765-771 (2009).
71. Dalman, M. R., Deeter, A., Nimishakavi, G. & Duan, Z. H. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 2, S11 (2012).
72. CLEC7A. NM\_197954.2. von: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_197954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_197954) (Zugang im Dezember 2013)
73. Li, D. et al. MBL-mediated opsonophagocytosis of *Candida albicans* by human neutrophils is coupled with intracellular Dectin-1-triggered ROS production. *PLoS One* 7, e50589 (2012).
74. EHD1. NM\_006795.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_006795.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_006795.3) (Zugang im Dezember 2013)
75. Fichtman, B., Ravid, L., Rapaport, D. & Horowitz, M. EHDS are serine phosphoproteins: EHD1 phosphorylation is enhanced by serum stimulation. *Cell Mol Biol Lett* 13, 632-648 (2008).
76. FOS. NM\_005252.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_005252](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_005252) (Zugang im Dezember 2013)
77. Friedman, A. D. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26, 6816-6828 (2007).
78. Colotta, F., Wang, J. M., Polentarutti, N. & Mantovani, A. Expression of c-fos protooncogene in normal human peripheral blood granulocytes. *J Exp Med* 165, 1224-1229 (1987).
79. ICAM3. NM\_002162.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_002162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_002162) (Zugang im Dezember 2013)
80. Costantini, C. et al. On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon-gamma by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica* 96, 1543-1547 (2011).
81. Kinjo, Y. et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* 12, 966-974 (2011).

82. IRAK1. NM\_001569.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001569.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001569.3) (Zugang im Dezember 2013)
83. Surmiak, M., Kaczor, M. & Sanak, M. Expression profile of proinflammatory genes in neutrophil-enriched granulocytes stimulated with native anti-PR3 autoantibodies. *J Physiol Pharmacol* 63, 249-256 (2012).
84. Li, C. H., Liu, J., An, M., Redmond, H. P. & Wang, J. H. Bacterial lipoprotein-induced tolerance is reversed by overexpression of IRAK-1. *Immunol Cell Biol* 90, 314-320 (2012).
85. Huang, Y., Li, T., Sane, D. C. & Li, L. IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *J Biol Chem* 279, 51697-51703 (2004).
86. Lee, P. Y. et al. IL-1alpha modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil. *J Immunol* 186, 1747-1754 (2011).
87. IRAK2. XR\_245126.1. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XR\\_245126](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XR_245126) (Zugang im Dezember 2013)
88. Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M. & Bowie, A. G. IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem* 282, 33435-33443 (2007).
89. Lin, S. C., Lo, Y. C. & Wu, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885-890 (2010).
90. KMO. NM\_003679.4. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_003679.4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_003679.4) (Zugang im Dezember 2013)
91. Ligam, P., Manuelpillai, U., Wallace, E. M. & Walker, D. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. *Placenta* 26, 498-504 (2005).
92. Moffett, J. R. & Namboodiri, M. A. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 81, 247-265 (2003).
93. Popov, A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Invest* 116, 3160-3170 (2006).
94. NOP2. NM\_006170.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_006170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_006170) (Zugang im Dezember 2013)
95. Khanna-Gupta, A. et al. p120 nucleolar-proliferating antigen is a direct target of G-CSF signaling during myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 79, 1011-1021 (2006).
96. RALGDS. NM\_006266.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_006266](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_006266) (Zugang im Dezember 2013)
97. M'Rabet, L. et al. Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* 92, 2133-2140 (1998).

98. Omidvar, N., Pearn, L., Burnett, A. K. & Darley, R. L. Ral is both necessary and sufficient for the inhibition of myeloid differentiation mediated by Ras. *Mol Cell Biol* 26, 3966-3975 (2006).
99. Bhattacharya, M. et al. Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4, 547-555 (2002).
100. SLC11A2. NM\_001174125.1. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001174125.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001174125.1) (Zugang im Dezember 2013)
101. Forbes, J. R. & Gros, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 9, 397-403 (2001).
102. SRP54. NM\_003136.3. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_003136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_003136) (Zugang im Dezember 2013)
103. Shepard, P. J. & Hertel, K. J. The SR protein family. *Genome Biol* 10, 242 (2009).
104. TLR6. AB020807.1. von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB020807.1> (Zugang im Dezember 2013)
105. Hajjar, A. M. et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166, 15-19 (2001).
106. TPM3. NG\_008621.1. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_008621.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008621.1) (Zugang im Dezember 2013)
107. Stossel, T. P. & Pollard, T. D. Myosin in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 248, 8288-8294 (1973).
108. Kasper, B., Thole, H. H., Patterson, S. D. & Welte, K. Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors. *Electrophoresis* 18, 142-149 (1997).
109. UBTD2. NM\_152277.2. von [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_152277.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_152277.2) (Zugang im Dezember 2013)
110. Song, A. X., Zhou, C. J., Guan, X., Sze, K. H. & Hu, H. Y. Solution structure of the N-terminal domain of DC-UbP/UBTD2 and its interaction with ubiquitin. *Protein Sci* 19, 1104-1109 (2010).
111. Al-Gwaiz, L. A. & Babay, H. H. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract* 16, 344-347 (2007).

## **8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

Tabelle 1 (Seite 10): Herkunft der zur Koinkubation eingesetzten Bakterienstämme

Tabelle 2 (Seite 10): Software zur Datenanalyse

Tabelle 3 (Seite 21): Ergebnisse der Granulozytenisolierung

Tabelle 4 (Seite 28): Gesamtanzahl der regulierten Gene nach 120 min mittels Microarray Analyse

Tabelle 5 (Seite 75): Reagenzien 1

Tabelle 6 (Seite 76): Reagenzien 2

Tabelle 7 (Seite 76): Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 (Seite 77): Kits

Tabelle 9 (Seite 77): Nährmedien

Tabelle 10 (Seite 78): Nährmedien zur Kultivierung der Bakterienspezies

Tabelle 11 (Seite 78): Geräte

Tabelle 12 (Seite 79): Tatsächliche MOI der Koinkubationskulturen, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte (Teil 1)

Tabelle 13 (Seite 80): Tatsächliche MOI der Koinkubationskulturen, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte (Teil 2)

Tabelle 14 (Seite 80): Resistenzmuster der Bakterienstämme

Abbildung 1 (Seite 22): Wachstumskurven der verwendeten Bakterienspezies in Flüssigkultur

Abbildung 2 (Seite 23): Nachweis der Apoptoserate in den Koinkubationskulturen von PMN und Bakterien

Abbildung 3 (Seite 24): Phagozytoserraten verschiedener Bakterienspezies durch PMN

Abbildung 4 (Seite 26): RNA Degradationsblot und Histogramm der globalen Signalintensitäten

Abbildung 5 (Seite 27): Balkendiagramm der Anteile von als present (P), marginal (M) und absent (A) detektierten Probesets auf den Microarrays

Abbildung 6 (Seite 29): PCA Analysen der Microarrays mit erkennbarer Clusterbildung der Gruppen nach jeweiliger Bakterienspezies

Abbildung 7 (Seite 31): RT-qPCR Ergebnisse von CLEC7A und EHD1

Abbildung 8 (Seite 32): RT-qPCR Ergebnisse von FOS, ICAM3, IRAK1 und IRAK2

Abbildung 9 (Seite 33): RT-qPCR Ergebnisse für KMO, NOP2, RALGDS und SLC11A

Abbildung 10 (Seite 34): RT-qPCR Ergebnisse für SRP54, TLR6, TPM3, UBTD2

Abbildung 11 (Seite 35): RT-qPCR Ergebnisse von ADAM22, DNAJB9, FNDC3B u. ICAM1

Abbildung 12 (Seite 36): RT-qPCR Ergebnisse von PIM3, TLR2, U2AF1 und ZEB2

Abbildung 13 (Seite 37): RT-qPCR Ergebnisse von AP1S2, ICAM2, IL10 und IL10RA

Abbildung 14 (Seite 38): RT-qPCR Ergebnisse von IRAK3, JDP2, PARVB und TLR4

Abbildung 15 (Seite 39): Korrelation von Microarray und RT-PCR Ergebnissen für alle Bakterienspezies

Abbildung 16 (Seite 44): RT-qPCR Ergebnisse für CLEC7A

Abbildung 17 (Seite 45): RT-qPCR Ergebnisse für EHD1

Abbildung 18 (Seite 46): RT-qPCR Ergebnisse für FOS

Abbildung 19 (Seite 48): RT-qPCR Ergebnisse für ICAM3

Abbildung 20 (Seite 49): RT-qPCR Ergebnisse für IRAK1

Abbildung 21 (Seite 50): RT-qPCR Ergebnisse für IRAK2

Abbildung 22 (Seite 52): RT-qPCR Ergebnisse für KMO

Abbildung 23 (Seite 53): RT-qPCR Ergebnisse für NOP2

Abbildung 24 (Seite 54): RT-qPCR Ergebnisse für RALGDS

Abbildung 25 (Seite 55): RT-qPCR Ergebnisse für SLC11A2

Abbildung 26 (Seite 56): RT-qPCR Ergebnisse für SRP54

Abbildung 27 (Seite 57): RT-qPCR Ergebnisse für TLR6

Abbildung 28 (Seite 58): RT-qPCR Ergebnisse für TPM3

Abbildung 29 (Seite 59): RT-qPCR Ergebnisse für UBTD2

## 9. Danksagung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation entstanden am Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universität Rostock. Ich bedanke mich herzlichst bei allen Personen, die mich dabei unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Peter Schuff-Werner, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Labormedizin des Universitätsklinikums Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, seine fundierte fachliche Betreuung und Beratung und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Auch bedanke ich mich sehr für die von ihm gegebenen Möglichkeiten, an Kongressen die Ergebnisse dieser Arbeit vorstellen zu dürfen. Größter Dank gilt ebenso Frau Dr. Manuela Bastian, für ihre höchst wertvolle fachliche und menschliche Betreuung, für ihre sehr geduldige Anleitung durch den anspruchsvollen Versuchsverlauf, ihr gütiges Verständnis für die Höhen und Tiefen im Gemütszustand eines jungen Wissenschaftlers und ihre allzeitige und umfassende Unterstützung. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Katrin Dreißiger für ihre stetige, gutgelaunte Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz in allen Belangen des Laboralltags. Ebenso möchte ich mich auch bei Herrn Professor Bernd Kreikemeyer vom Institut für Mikrobiologie für die Bereitstellung von Material, Arbeitsplatz und Ratschlägen bedanken, bei Herrn Dr. Dirk Koczan vom Institut für Immunologie für seine Unterstützung beim Anfertigen der Microarrays und Real-Time-PCR Arrays und seine zahlreichen konstruktiven Vorschläge bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und bei Herrn Professor Georg Füllen und Herrn Dr. Matthias Ernst vom Institut für Biostatistik und Informatik für die intensiven Gespräche zur Auswertung der Micorarray Daten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Labormedizin, des Instituts für Mikrobiologie und des Instituts für Immunologie, auch wenn hier nicht im einzelnen namentlich genannt, bin ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima sehr dankbar. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, für ihre Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben und mich auch insbesondere bei der Erstellung dieser Dissertation moralisch unterstützten und somit zum Gelingen einen ganz wesentlichen Beitrag leisteten.

Gewidmet ist diese Arbeit Herrn Dr. Gerold Ernst, mein Lehrer im Leistungskurs Biologie am Kolleg St. Blasien im Jahrgang 2003/04. Sein einzigartiger Unterricht entfachte meine Begeisterung für die Immunologie und die naturwissenschaftliche Forschung so nachhaltig, dass sie bis heute anhält.

## 10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Neutrophile Granulozyten exprimieren unterschiedliche RNA-Sequenzen nach Koinkubation mit *E.coli*, ESBL-*E.coli*, *S.aureus* und MRSA" selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteil geworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

München, August 2014

Sebastian Matthias Gottfried Hesse

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Name Sebastian Matthias Gottfried Hesse  
Alter 30 Jahre, geb. am 13.06.1984 in Ulm  
Adresse: Zuccalistr. 41, 80639 München, Deutschland  
e-Mail: Sebastian.Hesse@med.uni-muenchen.de  
Nationalität: Deutsch

### Ausbildung

Jun. 13 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Abschluss des  
Medizinstudiums  
Okt. 08 – Jun. 13 Medizinstudium an der Universität Rostock  
Jun. 07 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Sep. 05 – Jun. 08 Medizinstudium an der Universität Pécs, Ungarn  
(Zwei Jahre reguläres Studium, im dritten Jahr Forschung und  
Pathologie)  
Okt. 04 9 Monate Grundwehrdienst als Gebirgsanitäter der  
Bundeswehr;  
Artilleriekaserne Kempten, Sanitätsakademie München  
Jun. 04 Abitur in den Fächern: Mathematik, Deutsch, Biologie,  
Spanisch, Religion; Kolleg St.Blasien

### Medizinische Berufserfahrung

Apr. 11 – Jul. 12 PJ Tertian Wahlfach: Pathologie, Universität Rostock, Rostock  
Dez. 11 – Mär. 11 PJ Tertian Innere Medizin: Brown University, Providence, USA  
Aug. 11 – Nov. 11 PJ Tertian Chirurgie: Sheba Medical Center, Tel Aviv, Israel  
Feb. 11 – Mär. 11 Lehrgang: Tropenmedizin, Universität Leipzig, Leipzig  
Aug. 10 Famulatur: Infektiologie & Pulmonologie, Charité, Berlin  
Jun. 10 – Jun. 13 Medizinisches Notfallteam, Fusion Festival, Lärz  
Aug. 08 Famulatur: Pädiatrie & Geburtshilfe, Mugenero Hospital, Kivu,  
Ruanda  
Jul. 08 Famulatur: Pädiatrische HIV Klinik, Mulago Hospital,  
Kampala, Uganda  
Jul. 07 Famulatur: Notaufnahme, Policlinica Gipuzkoa, St. Sebastian,  
Spanien

### Wissenschaftliche Berufserfahrung

- seit Feb. 14            Wissenschaftler Mitarbeiter am Universitätsklinikum München,  
Dr. von Haunersches Kinderspital, Arbeitsgruppe Prof. Klein,  
Thema: Severe congenital neutropenia
- Okt. 12                Doktorandenworkshop „Scientific Writing“,  
Zoonosenplattform, Berlin
- Apr. 09 – Aug. 14    Promotionsvorhaben am Institut für Klinische Chemie und  
Labormedizin, Prof. Schuff-Werner, Universität Rostock  
Thema: Neutrophile Granulozyten exprimieren  
unterschiedliche RNA-Sequenzen nach Koinkubation mit  
*E.coli*, ESBL-*E.coli*, *S.aureus* und MRSA
- Okt. 06 – Jun. 08    Forschungsarbeit im Institut für Immunologie &  
Biotechnologie, Prof. Pongracz, Universität Pécs, Ungarn  
Thema: Wnt Signaltransduction in thymic epithelial cells

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Apr. 14                Vortrag: "Neutrophil granulocytes express different RNA  
patterns after coincubation with different bacteria", API  
Jahrestreffen, Ittingen, Schweiz
- Sep. 10                Poster: „Pathogen specific gene expression profile of  
polymorphonuclear neutrophils after coincubation with  
bacterial agents“, DGKL Tagung 2010, Mannheim
- Mai 10                Artikel: Kvell, K., Varecza, Z., Bartis, D., Hesse, S., Parnell, S.,  
Anderson, G., Jenkinson E. & Pongracz, J. Wnt 4 and  
LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence.  
PLoS One, May 18 2010
- Mär. 08                Vortrag: „Molecular mechanisms of aging in the thymus“,  
Internationale Studentenkonferenz, Pécs, Ungarn
- Jun. 07                Poster: „Expression of medullary epithelial cell marker AIRE is  
protein-kinase-C dependent in the thymus“, ISCOMS,  
Groningen, Niederlande

### Auszeichnungen

- Mär. 11                DAAD Promos Stipendium für USA Aufenthalt
- Mai 08                Herausragende Leistung im Fach Pathologie
- Jun. 07                Bester Student des Jahrgangs
- Mai 06                Herausragende Leistung im Fach molekulare Zellbiologie
- Mai 06                Herausragende Leistung im Fach Physik

## 12. Anhang

### 12.1. Materialien und Geräte

Tabelle 5: Reagenzien (1)

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Luria Bertani (LB) Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D	12780-052
Natriumchlorid -M 58, 44 g/ mol, - D ~ 2,17	Roth, Karlsruhe, D	3957.1
Agar technical No. 13	Oxoid, Wesel, D	LP0013
Todd-Hewitt Broth Medium	Oxoid, Wesel, D	CM0189
Yeast Extract	Oxoid, Wesel, D	LP0021
Brain Heart Infusion Medium	Oxoid, Wesel, D	CM0225
RPMI 1640 Medium w/o 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w/o Phenol red, w/o L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin, D	F 1275
RPMI 1640 Medium w 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w stable Glutamine	Biochrom AG, Berlin, D	FG 1215
Evans Blue solution	Sigma, Taufkirchen, D	E 6133
Herz-Cystein-Agarplatten mit 10% Schafsblut	Quelab, Montreal, Kanada	QB-46-1183
Columbia Agarplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, D	254005
TRIZOL	Invitrogen, Karlsruhe, D	15596-018
Polymorphprep	Progen, Wieblingen, D	1114683
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen, Düsseldorf, D	79254
Trypan-Blau	Biochrom, Berlin, D	L6323
Chloroform	Sigma, Taufkirchen, D	C2432
2-Propanol	Sigma, Taufkirchen, D	I9516
Mayers Hämatoxylinlösung	Sigma, Taufkirchen, D	MHS 16
NaCl 0,9% (pH 7,4) < 0,3 mmol/ l, ph-Wert 4,5-7,0, theoret. Osmolarität 308 mOsm/ l	Braun, Melsungen, D	6493A191

Tabelle 6: Reagenzien (2)

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
PBS-Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin, D	L 1825
10% Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt, D	1040022500
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D	4370074
TaqMan Low density Array Formats 32	Applied Biosystems, Darmstadt, D	nach Bestellung gefertigte Sonderanfertigung
Albumin, bovine serum, Minimum 98%,	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	A7030-100G
NaCl 59% (pH 7,4) < 0,3 mmol/l, ph-Wert 4,5-7,0, theoret. Osmolarität 2000 mOsm/l	Delta Select, Dreieich, D	12607

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Bestellnummer
Petrischalen 94 x 16 mm (d x h)	Greiner, Solingen, D	633102
Falcon Culture Slide	Becton Dickinson, Heidelberg, D	354104
Sterilpipetten 25 ml	Hassa Laborbedarf, Lübeck, D	760180
Sterile Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D	861172
Polystyrol Röhrchen	Greiner, Solingen, D	164161
PP-Röhrchen, steril 50 ml	Greiner, Solingen, D	227261
Zellschaber 24 cm	TPP, Schweiz	99002
96-Well Mikrotiterplatten	Greiner, Solingen, D	655180
sterile Zellkulturschalen Ø 58 mm	Hassa Laborbedarf, Lübeck, D	633102

Tabelle 8: Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D	V 12883
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf, D	74106
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems, Darmstadt, D	4368813

Tabelle 9: Nährmedien

THY Medium	
Todd-Herwitt-Broth Fertignährmedium	36,4 g
Hefeextrakt	5 g
A. bidest. ad	1000 ml
LB Medium	
Luria Bertani Fertignährmedium	20 g
NaCl	4,5 g
A. bidest. ad	1000 ml
BHI Medium	
Brain Heart Infusion Fertignährmedium	37 g
A. bidest. ad	1000 ml
PBS, 10x, pH 7,4	
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
NaCl	80 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
A. bidest. ad	1000 ml
Alle Medien und Puffer wurden durch Autoklavieren bei 121 °C und 1,2 bar für 20 min sterilisiert. Bei festen Medien erfolgte die Zugabe von 1,5% (w/v) technischem Agar vor dem Autoklavieren.	

Tabelle 10: Nährmedien zur Kultivierung nach Bakterienspezies

Bakterienspezies	Nährmedium
<i>Escherichia coli</i>	LB Medium, LB Agar
ESBL	LB Medium, LB Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI Medium, BHI Agar
MRSA	BHI Medium, BHI Agar

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
AU Analyzer	Beckman Coulter, Pasadena, USA
Pico Chip Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, USA
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Photometer: Smart Spec 3000	Biorad, Hercules, USA
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, D
XE5000	Sysmex, Norderstedt, D

## 12.2. Analysewerte der Koinkubationskulturen: tatsächliche MOI, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte

Tabelle 12: Tatsächliche MOI der Koinkubationskulturen, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte (Teil 1)

Versuchsdatum	Bakterien-spezies	MOI	RNA Menge (in ng/ $\mu$ l)	RIN (RNA Integrity Number)	Mittelwert Ct für GAPDH
30.09.09	<i>E.coli</i>	1:6	60	7.5	29.7
	ESBL	1:6	128	6.7	29.4
	<i>S.aureus</i>	1:17	43	7.9	32.2
	MRSA	1:14	43	7.6	23.0
	neg. Kontrolle	n.d.	135	7.9	30.2
19.11.09	<i>E.coli</i>	1:8	71	4.6	24.5
	ESBL	1:5	60	7.0	23.8
	<i>S.aureus</i>	1:6	24	6.3	23.9
	MRSA	1:5	25	6.6	23.4
	neg. Kontrolle	n.d.	23	>5*	23.1
07.01.10	<i>E.coli</i>	1:20	458	7.5	24.3
	ESBL	1:10	88	5.8	23.2
	<i>S.aureus</i>	1:6	33	>5*	23.0
	MRSA	1:9	45	>5*	22.9
	neg. Kontrolle	n.d.	94	>5*	21.8
14.01.10	<i>E.coli</i>	1:8	37	6.6	25.3
	ESBL	1:6	44	5.0	25.3
	<i>S.aureus</i>	1:9	25	5.1	33.2
	MRSA	1:7	28	7.0	28.9
	neg. Kontrolle	n.d.	57	7.5	22.7

\* Werte nach Gedächtnisprotokoll

Tabelle 13: Tatsächliche MOI der Koinkubationskulturen, isolierte RNA Menge, RIN und GAPDH Mittelwerte (Teil 2)

Versuchsdatum	Bakterien-spezies	MOI	RNA Menge (in ng/μl)	RIN (RNA Integrity Number)	Mittelwert Ct für GAPDH
11.06.10	<i>E.coli</i>	1:3	25	6.9	23.8
	ESBL	1:5	56	6.3	23.2
	<i>S.aureus</i>	1:6	15	4.7	25.2
	MRSA	1:10	13	7.0	24.2
	neg. Kontrolle	n.d.	22	>5*	22.5
12.07.10	<i>E.coli</i>	1:2	14	6.7	22.9
	ESBL	1:12	63	7.2	23.9
	<i>S.aureus</i>	1:7	14	6.5	24.4
	MRSA	1:2	13	7.8	23.3
	neg. Kontrolle	n.d.	30	7.8	21.4
15.07.10	<i>E.coli</i>	1:19	56	5.4	23.9
	ESBL	1:15	82	6.3	23.8
	<i>S.aureus</i>	1:8	16	7.7	23.6
	MRSA	1:10	17	8.1	23.2
	neg. Kontrolle	n.d.	65	8.1	22.7
20.07.10	<i>E.coli</i>	1:6	31	8.3	24.9
	ESBL	1:10	50	7.2	24.7
	<i>S.aureus</i>	1:12	17	6.7	23.8
	MRSA	1:14	17	7.5	23.8
	neg. Kontrolle	n.d.	22	6.9	22.6

\* Werte nach Gedächtnisprotokoll

### 12.3. Resistenzmuster der Bakterienstämme

Die Resistenzen der verwendeten Bakterienstämme wurden durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Krankenhaushygiene (IMIKRO) der Universität Rostock mittels Vitek 2 der Firma Biomérieux getestet.

Tabelle 14: Resistenzmuster der Bakterienstämme

Antibiotikum	<i>E.coli</i>	ESBL
Ampicillin	sensitiv	resistent
Ampicillin/Sulbactam	sensitiv	resistent
Cefotaxime	sensitiv	resistent
Cefpodoxime	sensitiv	resistent
Ceftazidime	sensitiv	resistent
Cefuroxime	sensitiv	resistent
Cefuroxime Axetil	sensitiv	resistent
Ciprofloxacin	sensitiv	resistent
Gentamicin	sensitiv	sensitiv
Imipenem	sensitiv	sensitiv
Levofloxacin	sensitiv	resistent
Meropenem	sensitiv	sensitiv
Nitrofurantoin	sensitiv	sensitiv
Piperacillin	sensitiv	resistent
Piperacillin/ Tazobactam	sensitiv	sensitiv
Tetracycline	sensitiv	resistent
Tobramycin	sensitiv	sensitiv
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	sensitiv	resistent

Antibiotikum	<i>S.aureus</i>	MRSA
Benzylpenicillin	resistent	resistent
Cefoxitin Screen	negativ	positiv
Clindamycin	sensitiv	resistent
Erythromycin	sensitiv	resistent
Fosfomycin	sensitiv	sensitiv
Fusidic Acid	sensitiv	sensitiv
Gentamicin	sensitiv	sensitiv
Levofloxacin	sensitiv	resistent
Linezolid	sensitiv	sensitiv
Moxifloxacin	sensitiv	resistent
Mupirocin	sensitiv	sensitiv
Nitrofurantoin	sensitiv	sensitiv
Oxacillin	sensitiv	resistent
Rifampicin	sensitiv	sensitiv
Teicoplanin	sensitiv	sensitiv
Tetracycline	sensitiv	sensitiv
Tigecycline	sensitiv	sensitiv
Tobramycine	sensitiv	resistent
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	sensitiv	sensitiv
Vancomycin	sensitiv	sensitiv

## 12.4. Einwilligungserklärung der Blutspender

### **Einwilligungserklärung zur freiwilligen Teilnahme an einer Untersuchung zur Analyse und Monitoring der Granulozytenfunktion bei Bakteriämie verursacht durch unterschiedliche B-Agenzien und differentialdiagnostisch relevante Erreger**

Einwilligungserklärung

Ich , ....., bin von Herrn Prof. Schuff-Werner über die Art und den Zweck der geplanten Untersuchungen ausführlich in einem Gespräch aufgeklärt worden und ich bin damit einverstanden, dass aus einer von mir entnommenen Blutprobe Granulozyten gewonnen werden, aus denen RNA isoliert wird. Die RNA-Proben werden nach Beendigung der Untersuchung sofort vernichtet.

**Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter (anonymisierter) Form gespeichert werden. Mir wurde versichert, dass dabei die Grundsätze des Datenschutzes beachtet werden, d.h. meine personenbezogenen Daten vertraulich behandelt und nicht an andere als die innerhalb der Klinik genannten Personen weitergegeben werden.**

Schließlich erkläre ich auch mein Einverständnis für die wissenschaftliche Veröffentlichung der Forschungsergebnisse in anonymisierter Form unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen.

Mein Einverständnis kann ich jederzeit ohne persönliche Nachteile zurückziehen.

.....

Ort, Datum und Unterschrift

## 12.5. Bescheid der Ethikkommission

Ärztelkammer  
Mecklenburg-Vorpommern

Körperschaft des öffentlichen Rechts



– Ethikkommission –  
bei der Universität Rostock (Spruchkörper II)

Herrn  
Prof. Dr. med. P. Schuff-Werner  
Institut für Klinische Chemie und  
Laboratoriumsmedizin  
Ernst-Heydemann-Straße 6  
18057 Rostock

August-Bebel-Str. 9a  
18055 Rostock  
Tel.: (03 81) 4 92 80 28  
Fax: (03 81) 4 92 80 80  
E-mail: ethik@aek-mv.de

Rostock, 22. März 2005  
We-Pr

### Anzeige

„Analyse und Monitoring der Granulozytenfunktion bei Bakteriämie verursacht durch unterschiedliche B-Agenzien und differentiaidiagnostisch relevante Erreger“

Reg.-Nr.: A 06/2005

Sehr geehrter Herr Kollege Schuff-Werner,

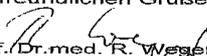
wir bestätigen den Eingang Ihre o.g. Anzeige vom 16.03.2005.  
Die Unterlagen waren vollständig, insbesondere hat eine ausführliche  
Patienteninformation und Patienteneinwilligung vorgelegen. Nachdem die erteilten  
Hinweise nunmehr berücksichtigt worden sind, bestehen

**keine berufsethischen oder berufsrechtlichen Bedenken,**

so daß Sie mit den Untersuchungen beginnen können.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg bei der Durchführung.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. R. Wegener  
Vorsitzender der Ethikkommission  
der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern  
bei der Universität Rostock

## 13. Abstract

### **Polymorphonuclear neutrophils express distinctive RNA-profiles after coinubation with different bacteria**

#### **Background:**

The aim of our investigations was to analyze the differences in gene expression profiles of polymorphonuclear neutrophils (PMN) after in vitro coinubation with bacteria.

#### **Materials and methods:**

Human PMN were isolated from heparinized venous blood of healthy individuals using density gradient centrifugation. *Staphylococcus aureus*, *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* and *extended spectrum  $\beta$ -lactamase expressing Escherichia coli* (ESBL), all harvested in the exponential growth phase, were coinubated with PMN at a multiplicity of infection of 10:1. RNA was subsequently purified after 120 minutes. The RNA profiles were first analyzed with Human Genome U133plus 2.0 arrays (Affimetrix) and BiblioSphere (Genomatix). Focusing on differentially expressed genes we next used TaqMan Reverse-Transcription quantitative PCR (Applied Biosystems) to validate and quantify the microarray findings.

#### **Results:**

The most pronounced difference in gene regulation was found between gram-positive and gram-negative species. After contact with gram-positive bacteria PMN upregulated ICAM3, TLR6 and TPM3 with only marginal or negative regulation after gram-negative contact. Contrariwise only gram-negatives elicited an upregulation of EHD1, IRAK2 and RALGDS in the PMN. A common response of the PMN after contact with any of the bacterial species was an upregulation of DNAJB9 and ICAM1.

#### **Conclusions:**

PMN show differential gene expression after contact with different bacterial species. The study of those differences could deepen our understanding of the unique pathogen sensing mechanisms of PMN and the host-pathogen interactions at play. A remote application possibility of our findings would be the diagnosis of bacterial infections via the analysis of PMN expression profiles.

## 14. Thesen

Im Gegensatz zu der inzwischen obsoleten Annahme, dass Neutrophile Granulozyten (PMN) nur eine Rolle bei unspezifischen Entzündungsreaktion spielen, wurde inzwischen nachgewiesen, dass sie maßgeblich bei einer Vielzahl von differenzierten Immunantworten beteiligt sind. Ebenso wurde nachgewiesen, dass PMN als Reaktion auf verschiedene Reize mit einer Steigerung ihrer Transkriptionsaktivität reagieren. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte untersucht werden, ob PMN nach Kontakt mit verschiedenen Bakterien unterschiedliche Genexpressionsmuster aufweisen und ob diese spezifisch für unterschiedliche Bakterienspezies sind. Zur Lösung der Fragestellung wurde ein Protokoll für den Koinkubationsversuchsansatz erstellt und in Vorexperimenten die Parameter der Granulozytenisolierung, Wachstumskurven der Bakterien, Phagozytoserate und Multiplicity of infection bestimmt, sowie die Koinkubationsdauer festgelegt. Um die Reaktion auf verschiedene Bakterienspezies zu überprüfen, wurde ein ATTC-Stamm von *Escherichia coli*, ein Klinikisolat von ESBL-*E.coli* (Extendet Spectrum  $\beta$ -lactamase Exprimierender *E.coli*), ein ATCC-Stamm von *Staphylococcus aureus* und ein Klinikisolat von MRSA (Methicillin Resistent *S.aureus*) verwendet. Zur Bestimmung der globalen Genexpression der PMN nach Bakterienkontakt wurde die cDNA aus den Koinkubationsexperimenten per Microarray analysiert und auf differenziell exprimierte Gene hin untersucht. Davon wurden 31 Gene ausgewählt, um per RTqPCR (Real-Time quantitative PCR) validiert und semi-quantifiziert zu werden.

- (1) Nach Kontakt mit verschiedenen Bakterienspezies lassen sich in Neutrophilen Granulozyten unterschiedliche Transkriptionsmuster nachweisen.
- (2) Spezifisch für den Kontakt mit *E.coli* und ESBL-*E.coli* ist eine Hochregulierung von EHD1, IRAK2 und RALGDS.
- (3) Spezifisch für den Kontakt mit *S.aureus* und MRSA ist eine Hochregulierung von ICAM3, TLR6 und TPM3.
- (4) Unabhängig von der Bakterienspezies wird DNAJB9 und ICAM1 hochreguliert.
- (5) Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich neue Hypothesen zur Wirts-Pathogen-Interaktion ableiten.
- (6) Eine theoretische Anwendungsmöglichkeit der Ergebnisse dieser Arbeit ist, pathogenabhängige Wirtsreaktionen in die Infektionsdiagnostik miteinzubeziehen.