

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie
(Ärztlicher Leiter Univ.-Prof. Dr. med. Thorsten Orlikowsky)

Verminderter phagozytose-induzierter Zelltod neonataler Monozyten
im In-vitro-Sepsismodell mit *Candida albicans*

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Jakob Peter Saupp

aus

Bergisch Gladbach

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Thorsten Orlikowsky

Herr Professor
Dr. med. Gerd Steinau

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

The microorganisms that seem to have it in for us in the worst way - the ones that really appear to wish us ill - turn out on close examination to be rather more like bystanders, strays, strangers in from the cold. They will invade and replicate if given the chance, and some of them will get into our deepest tissues and set forth in the blood, but it is our response to their presence that makes the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful, and involve so many different defense mechanisms, that we are in more danger from them than from the invaders. We live in the midst of explosive devices; we are mined.

*Lewis Thomas in *Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher*, The Viking Press, 1974*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sepsis bei Neugeborenen	1
1.2	Epidemiologie und Risikofaktoren der neonatalen Candida-Sepsis	2
1.3	Candida albicans	2
1.4	Immunabwehr	4
1.5	Apoptose und Regulation der Immunantwort	5
1.6	Das neonatale Immunsystem	7
1.7	Toll-like Rezeptoren	8
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Zellen und Organismen	11
3.1.1	Isolierung adulter und fetaler Monozyten	11
3.1.2	Candida albicans	12
3.2	Infektions- und Stimulationsversuche	12
3.3	Spezifische Antikörperfärbungen	13
3.3.1	CD14	13
3.3.2	B7-2 / CD86	13
3.3.3	TLR2 / CD282	13
3.3.4	TLR4 / CD284	13
3.4	Durchflusszytometrie	14
3.4.1	Monozyten Identifizierung	14
3.4.2	Lymphozyten Identifizierung	14
3.4.3	Bestimmung der Apoptoserate	15
3.4.4	Bestimmung von Phagozytoseindex und Phagozytosekapazität	18
3.5	Mikroskopie und Färbungen	18
3.6	Statistik	19
3.7	Material und Gerätschaften	19

4	Ergebnisse	23
4.1	Identische PICD bei Stimulation mit Wildtyp bzw. GFP-exprimierender <i>C. albicans</i>	23
4.2	<i>C. albicans</i> war nicht mit Propidiumiodid anfärbbar	24
4.3	Hitzebehandlung führte zu Verlust der Vitalität von <i>C. albicans</i>	24
4.4	Inkubation von Hefen bei Raumtemperatur führte zu verminderter Hyphenbildung und damit einhergehend höherer PICD	25
4.5	Fluconazol verminderte Hefenwachstum und hatte Einfluss auf den Zellzyklus der Monozyten	26
4.6	Identischer Phagozytoseindex und identische Phagozytosekapazität von PBMOs und CBMOs bei Stimulation mit <i>C. albicans</i>	28
4.7	Verminderter PICD von CBMOs im Vergleich zu PBMOs bei Stimulation mit <i>C. albicans</i>	28
4.8	Bei Stimulation mit <i>C. albicans</i> trat keine Lymphozytenapoptose auf	30
4.9	PICD und Phagozytose/Bindung zeigte sich bei Stimulation mit hitzeinaktivierter <i>C. albicans</i> vermindert	30
4.10	Stimulation mit <i>C. albicans</i> führte bei PBMOs zu stärkerer CD14-Modulation als bei CBMOs	31
4.11	Stimulation mit <i>C. albicans</i> führte zu einer Heraufregulation von CD86	32
4.12	Stimulation mit <i>C. albicans</i> führte bei PBMOs zu stärkerer TLR2-Modulation als bei CBMOs	33
4.13	Vergleichbare TLR4-Modulation bei PBMOs und CBMOs	34
4.14	Nur bei phagozytierenden Monozyten trat Apoptose auf	35
5	Diskussion	37
5.1	In-vitro-Modell einer <i>Candida albicans</i> Infektion.	37
5.2	Verminderte Immunreaktion der CBMOs bei gleicher Phagozytose.	40
5.3	Reaktion der Lymphozytenpopulation im Rahmen der <i>Candida albicans</i> Infektion	45
6	Methodische Limitationen	47
7	Ausblick	49
	Zusammenfassung	51
	Literaturverzeichnis	52
	Anhang	59

Posterpublikationen	65
Danksagung	67
Erklärung zur Datenaufbewahrung	69
Erklärung über den Eigenanteil	70

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Allophycocyanin
CBLC	Cord Blood Lymphocyte
CBMO	Cord Blood Monocyte
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EOS	Early-Onset-Sepsis
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HeNe-Laser	Helium-Neon-Laser
HI	Hitzeinaktiviert
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IgG1	Immunglobulin G, Subklasse 1
IgG2	Immunglobulin G, Subklasse 2
IL	Interleukin
LOS	Late-Onset-Sepsis
MOI	Multiplicity of Infection
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
NLR	Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Receptors
ns	not significant
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBLC	Peripheral Blood Lymphocyte
PBMO	Peripheral Blood Monocyte

PBS	Phosphate Bufferd Saline
PC	Phagozytose Kapazität
PE	Phycoerithrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phagozytose Index
PICD	Phagocytosis-induced Cell Death
rpm	Rounds per Minute
RPMI-1640	Rosewell Park Memorial Institute 1640 (Name eines Nährmediums)
SIRS	Systemic Inflammation Response Syndrome
SSC	Sideward Scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
T_H Zelle	T-Helferzelle
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
VLBW	Very Low Birthweight Infants
WT	Wildtyp

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Sepsis bei Neugeborenen

Die Diagnose einer Sepsis wird klinisch und anhand von Laborparametern gestellt. Nach den Kriterien der *International Pediatric Sepsis Consensus Conference* von 2005, ist Sepsis bei Kindern als *Septic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) mit gesicherter Infektion definiert. Die SIRS gilt als gesichert, wenn mindestens zwei der vier folgenden Kriterien erfüllt sind und in jedem Fall eine abnorme Temperatur oder Leukozytenzahl vorherrscht: Temperatur $> 38,5^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$, Tachykardie > 2 Standardabweichungen von normaler, altersgerechter Herzfrequenz oder Bradykardie $< 10.$ Perzentile der altersgerechten Herzfrequenz, Atemfrequenz > 2 Standardabweichungen über der normalen, altersgerechten Atemfrequenz und erhöhte oder erniedrigte Leukozytenzahl bzw. $> 10\%$ unreife Neutrophile Granulozyten (Goldstein et al., 2005).

Die Pathophysiologie der Sepsis wird sich modellhaft als unkontrollierte Entzündungsreaktion des Immunsystems auf eine disseminierte Infektion vorgestellt. Die Theorie, dass zirkulierende von Immunzellen sekretierte Cytokine und Immunmodulatoren, auch als *Cytokinsturm* bezeichnet, zu einer systemischen Überreaktion mit fatalen Folgen führt, ergab sich aus Studien mit Tiermodellen. Eine Übereinstimmung mit der klinischen Wirklichkeit kann aber nicht gefunden werden. Alleine schon aus dem Grund, dass alle bisherigen Therapieversuche mit speziell gegen Entzündungsmodulatoren gerichtete Maßnahmen, wie zum Beispiel TNF-Antagonisten, unzufriedenstellend verliefen und teilweise sogar die Prognose verschlechterten, muss von komplexeren Zusammenhängen ausgegangen werden (Hotchkiss & Karl, 2003).

Die Kombination aus unreifem Immunsystem und Keimexposition während des Geburtsvorgangs führt gerade bei Neugeborene zu einem hohen Sepsisrisiko. Trotz zahlreicher Hygienemaßnahmen und Verbesserungen der therapeutischen Optionen ist und bleibt die

Sepsis damit eine große Herausforderung der modernen Medizin.

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren der neonatalen Candida-Sepsis

Infektionen mit *Candida albicans* haben hohe klinische Relevanz auf neonatologischen Intensivstationen. Obwohl die moderne Intensivmedizin in den letzten Jahrzehnten die Überlebenschance von Frühgeborenen drastisch verbessern konnte, stößt sie bei bestimmten Keimen weiterhin an ihre Grenzen. In Deutschland kommen etwa 7% aller Geburten, mit steigender Tendenz, vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (< 259 vollendete Tage) und damit zu früh zur Welt (Mader et al., 2010). Frühgeborene mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht von ≤ 1000 g (very low birthweight, VLBW) erkranken besonders häufig an systemischen Candida-Infektionen. Mit einer Mortalität von 32% ist *Candida albicans* bei diesen Kindern, nach gram-positiven Organismen, der zweithäufigste Erreger für tödlich verlaufende Infektionen (Stoll et al., 2002). Kann der Organismus an mehreren Stellen des Körpers isoliert werden, steigt sie sogar auf 57%. Betroffene Kinder, die eine Infektion überstehen, haben im Verlauf mit einer eingeschränkten neurologischen Entwicklung zu kämpfen. In den USA entwickeln 9% der VLBW-Frühgeborenen eine invasive Candidose (Benjamin et al., 2010). In Deutschland werden etwa 2% aller VLBW-Neugeborenen mit einer früh beginnenden Early-Onset-Sepsis (EOS, Auftreten vor der 72. Lebensstunde) und 20% mit einer später beginnenden Late-Onset-Sepsis (LOS) behandelt (Faust et al., 2011). Bei der EOS ist Candida mit 9,8% der vierthäufigste und bei der LOS mit 2,4% der achthäufigste auslösende Erreger.

Risikofaktoren sind hierbei neben der Unreife des Kindes, die Art der Geburt (bei vaginalen Geburten waren 14% und bei Kaiserschnitten 7% der Blutkulturen positiv auf Candida) und die Anwendung von Breitspektrumantibiotika in den ersten Lebenstagen. Außerdem können Zentralvenöse Katheter (ZVKs), periphere intravenöse Zugänge oder Endotrachealtuben Leitschienen für den Weg des Keims von der Haut in die Blutbahn darstellen (Benjamin et al., 2010).

1.3 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein opportunistischer Erreger mit hoher Durchseuchungsrate, gehört zu den Schlauchpilzen (Ascomycota) und wird den Hefen (Sprosspilzen) zugeordnet. Er kolonisiert die Schleimhäute eines großen Anteils, etwa 30%, der gesunden Gesamtbe-

völkerung (Netea & Maródi, 2010). Obwohl die Besiedelung bei intaktem Immunsystem inapparent verläuft, hat der Organismus das Potential zur klinischen Manifestation. Wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Immunabwehr, Erreger und normaler bakterieller Flora gestört, kann es zu Ausbrüchen von superfiziellen mukokutanen Formen kommen. Dies kann unter anderem durch die Einnahme von Antibiotika, Steroiden, jeglicher Immunsuppression oder den Einflüssen von Hormonveränderungen während der Schwangerschaft verursacht werden. Ausbrüche äußern sich als weißliche Beläge auf Hautoberflächen und Nägeln, Schleimhäuten im Rachenraum (Mundsoor, Ösophagitis), Genitalbereich (Vulvovaginitis, Balanitis) oder gastrointestinalen Trakt. Als fortgeschrittenes Stadium können aber auch invasive Formen mit isoliertem Organbefall oder Dissemination auftreten. Zu besonders fulminanten Verläufen, die in den meisten Fällen von superfiziellen Besiedelungen ausgehen, kommt es bei Patienten mit Immundefekten (z. B. bei AIDS, Leukämie) oder bei Neugeborenen mit noch funktionell unreifem Immunsystem (Hof & Dörries, 2009).

Candida Hefen sind komplizierte Organismen, weshalb hier nur sehr eingeschränkt auf ihre speziellen Eigenschaften eingegangen werden kann. Das obwohl, bezogen auf ihre Komplexität, erst wenig über ihre Spezies bekannt ist. Sie haben ein diploides Genom, das sich mit seinen 16 Megabasen über acht Chromosomen erstreckt und üblicherweise jeglicher Introns entbehrt. Die äußere Form der Hefen ist polymorph und kann sich in drei Gestalten zeigen: Als ovale oder sphärische Hefezellen (Blastosporen) mit einem Durchmesser von etwa $5-10\ \mu\text{m}$ oder mit der Ausbildung von Pseudohyphen bzw. echten Hyphen, durch die sie ihre Größe um das 5-10fache vergrößern können. Der Unterschied zwischen den beiden Gestalten ist, dass Hyphen aus mehreren miteinander verknüpften Hefezellen und Pseudohyphen nur aus der Ausknospung einer einzelnen Zelle bestehen. Die hyphale bzw. pseudohyphale Form scheint hierbei ein wichtiger Virulenzfaktor für die Gewebsinvasion zu sein. Als Reiz für die Veränderung der Morphologie, wird der Kontakt mit Serum, ein pH-Milieu um 7.0 und eine Temperatur von 37°C beschrieben (Berman & Sudbery, 2002) (Tortora et al., 2010).

Wie bereits oben erwähnt, geschieht die Besiedelung von Neugeborenen in den meisten Fällen im Verlauf einer Spontangeburt. Das trägt der Tatsache Rechnung, dass Candiden ein Östrogen-bindendes Protein (Estrogen-Binding Protein, EBP) exprimieren, welches ihnen während der Schwangerschaft auf vaginalen Schleimhäuten besonders optimale Lebensbedingungen bietet. Durch erhöhte Östrogenkonzentrationen wird neben einer bis zu 8fach höheren Kolonisierung (Tarry et al., 2005), auch die vermehrte Ausbildung von Hyphen beschrieben (Cheng et al., 2006).

1.4 Immunabwehr

Bei der Abwehr von Mikroorganismen repräsentieren Phagozyten, durch ihre Fähigkeit zur schnellen Aufnahme und Elimination von Pathogenen, die vorderste Front der Immunreaktion. Auch bei der Bekämpfung von *Candida*-Infektionen kommt der angeborenen zellulären Abwehr, repräsentiert durch Monozyten / Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Dendritischen Zellen, eine übergeordnete Rolle zu (Abbas et al., 2000). Neben der Initiierung der humoralen Antwort, scheint die Aktivierung der Makrophagen vor allem durch Interferon- γ Sekretion der stimulierten T_H1 -Zellen auszugehen (Netea & Maródi, 2010).

Die ersten Schritte in der immunologischen Abwehrreaktion kommen spezifischen Rezeptoren auf den Zelloberflächen von professionellen Phagozyten zu, den PRRs (Pattern Recognition Receptors). Die Wichtigsten, für die spezifische Erkennung von *Candida albicans*, stellen hierbei Toll-like Rezeptoren (siehe Kapitel 1.7), C-Typ Lektin Rezeptoren und sogenannte NLRs dar. Sie erkennen charakteristische Strukturen der Hefen (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), induzieren die Aufnahme ins Phagolysosom, aktivieren Abtötungsmechanismen und setzen bestimmte Signalkaskaden in Gang, die zur Sekretion von Chemokinen und Cytokinen wie zum Beispiel Interleukinen, Interferonen oder $TNF\alpha$ führen (Netea & Maródi, 2010) (Romani, 2011). Eine Gliederung der Rezeptoren nach Familie und Spezifität ist in Tabelle 1.1 zu finden.

Pathogene werden durch PRRs erkannt und durch Phagozytose ins Phagolysosom aufgenommen, prozessiert und über MHC-Klasse-II Moleküle präsentiert. Die Antigenpräsentation an naive CD4-T-Zellen ist dabei auf ein ko-stimulatorisches zweites Signal durch Moleküle der B7-Familie angewiesen. Bei ihnen handelt es sich um homodimere Immunglobuline bestehend aus B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf der Oberfläche von Phagozyten ko-exprimiert werden. Die Rezeption des B7-Signals wird auf Seiten der T-Zellen durch den CD28-Rezeptor realisiert und führt zur Stimulation der T-Zell-Proliferation (Murphy et al., 2009).

Durch die Sekretion von Cytokinen und Präsentation von Antigenen haben die professionell Antigen-präsentierenden Zellen nicht nur aktivierenden sondern auch steuernden Einfluss auf die humorale Immunantwort. Im Zusammenhang mit *Candida* Infektionen sind vor allem modulatorische Einflüsse durch Dendritische Zelle und Makrophagen auf T_H1 -, T_H17 -, T_H2 - und T_{Reg} -Zellen beschrieben. Durch ihre komplexen pro- und anti-inflammatorischen Effekte, führen sie zu einer Immunantwort hoher Plastizität (Romani, 2011).

Tabelle 1.1: Wichtige PRRs für die Erkennung von *Candida albicans* (Netea & Maródi, 2010).

Toll-like Rezeptoren	PAMP
TLR2	Phospholipomannan
TLR4	Mannan
TLR9	CpG-Oligonukleotide
C-Typ Lektin Rezeptoren	
Mannose Rezeptor	Phospholipomannan
Dectin-1	β -1,3-Glucan
Dectin-2	Mannosereiche Strukturen
DC-SIGN	Mannosereiche Strukturen
Mincle	unbekannt
Galectin-3	β -1,2-Mannosid
SCARF1/CD36	β -1,3-Glucan
NLRs	
NLRP3	unbekannt

1.5 Apoptose und Regulation der Immunantwort

Einen weiteren hohen Stellenwert im Sepsisgeschehen hat die Apoptose von Phagozyten. Bei der Induktion von Apoptose wird zwischen einem intrinsischen und einem extrinsischen Weg unterschieden, wobei beide wichtigen Einfluss auf das Sepsisgeschehen haben. Beim mitochondrialen über Caspase-8 induzierten Zelltod, dem *intrinsischen Weg*, stehen Sauerstoffradikale, radioaktive Strahlung oder DNA-Strangbrüche im Mittelpunkt. Der extrinsische Weg ist durch das Binden von spezifischen, von außen kommenden Proteinen an Rezeptorstrukturen (Todesrezeptoren) der Zelle definiert, die daraufhin den programmierten Zelltod auslösen. Verschiedene Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, TNF-Related-Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) oder FAS Ligand (CD95L) spielen hierbei eine Rolle (Stearns-Kurosawa et al., 2011).

Weiterhin kann zwischen autokriner und parakriner Apoptoseinduktion unterschieden werden. Erkennt die Zelle, etwa durch Pattern Recognition Receptors (PRRs) wie Toll-like Rezeptoren oder LPS-Rezeptoren, ein Pathogen, wird eine pro-inflammatorische Signalkaskade in Gang gesetzt (siehe auch nächstes Kapitel zu Toll-like Rezeptoren). Das hat, unter

anderem, die Sekretion von Entzündungsmodulatoren zur Folge. Diese können nun auf die gleiche Zelle wirken, von der sie ausgeschüttet wurden (autokrine Sekretion) und ihre Einflüsse auf benachbarte Zellen entfalten (parakrine Sekretion). Es muss davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Infektion beide Mechanismen gleichzeitig vorliegen, jedoch nicht den gleichen Stellenwert besitzen. Die parakrine Sekretion wird in diesem Zusammenhang auch als Bystander Apoptosis bezeichnet. Dreschers et al. zeigten im Infektionsmodell mit *E. coli*, dass bei verhältnismäßig mehr „benachbarten“ Zellen Apoptose induziert wurde, als bei den Zellen, die selbst phagozytiert hatten. Das heißt die Bystander Apoptose zeigte einen höheren Stellenwert bei der Apoptoseinduktion als der Untergang von Zellen, die selbst Pathogen aufgenommen hatten (Dreschers et al., 2013).

Ausgelöst durch eine initial inflammatorische Reaktion mit der Sekretion von pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 führt der Untergang von Immunzellen zu einer Immunsuppression und damit verbundenen anti-inflammatorischen Phase, die auch als *Immunparalyse* bezeichnet wird. Weitere Arbeiten zeigten darüber hinaus, dass die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen, zur Sekretion von anti-inflammatorischen Cytokinen wie IL-10 , $\text{TGF-}\beta$ führt und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren hemmt (Albert, 2004). Bei diesem Effekt scheinen sich die neonatalen Immunzellen aber ebenfalls gegenüber den PBMOs eingeschränkt zu verhalten. So konnte gezeigt werden, dass CBMOs in geringerem Maße apoptotische Neutrophile Granulozyten abräumen und es dadurch zu einer verminderten Reduktion der pro-inflammatorischen IL-8 Produktion kommt (Gille et al., 2009a)

Aber auch das Pathogen selbst kann modulatorisch auf die Apoptose einwirken. Der Kontakt von Phagozyten mit Fremdorganismus kann hierbei entweder eine erhöhte Apoptose auslösen (Phagocytosis Induced Cell Death, PICD) (Webster et al., 2010) oder, wie zum Beispiel beim *Mycobacterium tuberculosis* durch Induktion von Serin Protease Inhibitor 9 (PI-9), vor Apoptose schützen und damit ein verlängertes Überleben im Wirtsorganismus erreichen (Toossi et al., 2011).

Die Apoptose moduliert damit den wichtigen Waagschaleneffekt zwischen *Cytokinsturm* und Erhaltung der Handlungsfähigkeit des Immunsystems und seiner Effektorzellen. Auf der einen Seite als überschießende Immunreaktion und auf der anderen als wichtiger Immunmodulator interpretiert, hat der programmierte Zelltod damit wichtigen Einfluss auf Verlauf und Ausgang der Infektion (Hotchkiss & Karl, 2003).

1.6 Das neonatale Immunsystem

Das kindliche Immunsystem und speziell das vom Neugeborenen unterscheidet sich stark von dem des Erwachsenen. Seine funktionelle Unreife zeigt sich an einer Vielzahl von Defiziten, die hier nur anhand einer kleinen Auswahl gezeigt werden können. Bei einer isolierten Betrachtung der neonatalen Monozyten (Cord Blood Monocytes, CBMOs) konnte zwar eine unveränderte Phagozytoseleistung, aber ein verminderter phagozytose-induzierter Zelltod (Phagocytosis-induced Cell Death, PICD) und eine geringere Sekretion von Cytokinen im Vergleich zu adulten Monozyten (Peripheral Blood Monocytes, PBMOs) gezeigt werden. So konnte nachgewiesen werden, dass bei Infektion mit *Escherichia coli* zwar Phagozytoseindex (Anzahl der phagozytierenden Monozyten), Phagozytosekapazität (Menge des vom Monozyten phagozytierten Materials) und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS), die für den oxidativen Burst im Rahmen der Pathogenerlimination im Phagolysosom von Bedeutung sind, gleich ausfallen, der PICD der CBMOs jedoch geringer ausfällt als bei den PBMOs (Gille et al., 2008). Ähnliche Daten zeigten auch Stimulationsversuche mit Streptokokken der Gruppe B (Gille et al., 2009b). Auch Unterschiede hinsichtlich der Sekretion von Cytokinen wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , IL-12 sind hinlänglich beschrieben (Currie et al., 2011) (Lavoie et al., 2010) (Pérez et al., 2010).

Des Weiteren scheint sich auch die Grundausstattung mit, für die PAMP-Identifizierung wichtigen Oberflächenrezeptoren, zu unterscheiden. Verschiedene Blockierungsstudien zeigten, dass dies wiederum zu einer veränderten Aktivierung von Signalkaskaden führt. Beispielfür die abweichende Rezeptorexpression seien hier TLR2 und TLR4 genannt, die gerade bei Candida-Infektionen eine wichtige Rolle bei der Pathogenerkennung spielen (Netea et al., 2002) (Romani, 2011). Bei den Daten bezüglich dieser Expressionsdifferenzen herrschen allerdings unterschiedliche Meinungen zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen. Zum einen wurde eine verminderte Baseline-Expression von TLR2 bei CBMOs und eine vergleichbare Expression von TLR4 bei PBMOs und CBMOs beschrieben (Viemann et al., 2005), zum anderen wurden auch exakt gegenläufige Daten publiziert (Sadeghi et al., 2007).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die auffallende Infektionsanfälligkeit von Früh- und Neugeborenen, mit einem generalisiert supprimierten Immunstatus zusammenhängt, welcher im weiteren Verlauf der Entwicklung ausreift.

1.7 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind eine evolutionär sehr alte Spezies des immunologischen Erkennungssystems, die bei der Forschung mit *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden. Beim Menschen sind bisher zehn TLRs bekannt, wobei vor allem TLR2, 4 und 9 bei der Erkennung von *Candida albicans* eine fundamentale Rolle spielen. TLR2 erkennt Proteoglykane, Lipoproteine, Lipoarabinomannan, Glycosylphosphatidylinositol (GPI) und Zymosan (Murphy et al., 2009). In der Literatur ist seine experimentelle Stimulation mit Pam3Cys, einem artifiziellen Lipopeptid, gut beschrieben (Zähringer et al., 2008) (Nyugen et al., 2010) (Barrenschee et al., 2010). TLR4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteinchonsäuren. Experimentell kann LPS als Agonist verwendet werden. TLR9 erkennt spezifisch nicht-methylierte CpG-Oligonukleotide und kann damit auch die DNA von *Candida albicans* erkennen (Murphy et al., 2009). Eine Blockierung von TLR9 resultiert in einer verminderten IL-12, IL-4 und einer erhöhten anti-inflammatorischen IL-10 Sekretion, was aber auf den Verlauf der Infektion und das Überleben bei Versuchstieren kaum Auswirkungen zeigte (Netea & Maródi, 2010).

Weitere Blockierungsstudien zeigten, dass eine Inhibition von TLR2 zu einer verminderten Produktion von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ durch Monozyten mit *Candida*-Kontakt führte. Darüber hinaus konnte bei TLR4-Knockout-Mäusen mit *Candida*-Infektion eine deutlich höhere Kolonisation der Organe als bei Wildtyp-Tieren beobachtet werden. (Netea et al., 2002)

Sowohl TLR2 als auch TLR4 können über den MyD88 und MAL-Signalweg durch die Sekretion von TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 pro-inflammatorisch auf Monozyten und T_H1 -Zellen wirken. TLR2 aktiviert den Fas-Liganden und ist damit in der Lage Apoptose über das Fas-associated death domain protein (FADD) und Caspase-8 zu induzieren (Aliprantis et al., 2000). TLR4 kann darüber hinaus auch durch eine Aktivierung von TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon-beta (TRIF) und TIR-Containing Adapter Molecule (TRAM) zur Aktivierung der Threonine-Protein Kinase 1 (TBK1) und dem Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) führen, was wiederum in einer Sekretion von Interferon- α und - β resultiert (Netea & Maródi, 2010).

Kapitel 2

Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den funktionellen Unterschieden zwischen neonatalen (CBMOs) und adulten (PBMOs) mononukleären Zellen im Rahmen eines Infektionsmodells mit *Candida albicans*. Die in der Arbeit verfolgten Hypothesen gliedern sich in die folgende drei Gruppen:

Validierung des Modells

- Die Phagozytoseinduktion des GFP-exprimierenden *Candida*-Stammes unterscheidet sich nicht von der des Wildtypen
- Die gewählte Methode der Zellzyklusanalyse interagiert nicht mit dem genetischen Material der *Candida*-Hefen
- Hitzebehandlung führt zum Tod von *Candida albicans*
- Temperaturveränderungen führen zu Gestaltwechsel von *Candida albicans* und damit einhergehender veränderter Pathogenität
- Fluconazol hat Einfluss auf den Zellzyklus von *Candida albicans*

Unterschiede in der Apoptoseinduktion adulter und neonataler Zellen

- CBMO und PBMO unterscheiden sich nicht in ihrem Phagozytoseindex und ihrer Phagozytosekapazität
- Phagozytose von *Candida albicans* führt zu phagozytose-induziertem Zelltod bei Monozyten, welcher bei CBMO geringer ausfällt als bei PBMO
- Die Lymphozytenpopulationen aus adultem und neonatalem Blut unterscheiden sich in ihrer Apoptoserate nach Stimulation mit *Candida albicans*

- Die Vitalität von *Candida albicans* hat Einfluss auf die Apoptoseinduktion bei Monozyten
- Die Apoptose von Monozyten wird voranging direkt durch deren Phagozytose oder Binden der von *Candida*-Partikeln induziert und ist von Bystander-Apoptose abzugrenzen

Unterschiede in der Rezeptorexpression adulter und neonataler Zellen

- PBMO und CBMO unterscheiden sich hinsichtlich ihrer CD14-Modulation in Reaktion auf Kontakt mit *Candida albicans*
- PBMO und CBMO unterscheiden sich hinsichtlich ihrer CD86-Modulation in Reaktion auf den Kontakt mit *Candida albicans*
- PBMO und CBMO unterscheiden sich hinsichtlich ihrer TLR2- und TLR4-Modulation in Reaktion auf den Kontakt mit *Candida albicans*

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Zellen und Organismen

3.1.1 Isolierung adulter und fetaler Monozyten

Mononukleäre Zellen wurden nach der Methode von Bøyum (Bøyum, 1976) mit Hilfe eines Ficoll Dichtegradienten isoliert. Zur Gewinnung adulter Zellen wurden erwachsenen, gesunden Spendern 20 – 30 ml peripheres Vollblut abgenommen. Fetales Blut konnte aus Nabelschnüren entnommen werden. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der RWTH Aachen genehmigt (Ethikvotum EK150/09), alle Mütter wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Nabelschnurblutes (siehe Anhang A). Die Proben wurden anonymisiert und nach Durchführung der Versuche umgehend vernichtet. Sowohl adultes Vollblut als auch Nabelschnurblut wurden heparinisiert (1000 IE), in ein 50 ml-Polypropylen-Röhrchen gegeben und in einem Verhältnis von 1:3 mit 1fach-verdünnter posphatgepufferter NaCl-Lösung (1x Phosphate buffered Saline, 1x PBS) verdünnt. Zur Gewinnung der Leukozytenbanden wurden jeweils 13 ml Ficoll-Paque PLUS Lösung ($1,077 \pm 0,001 \text{ g/ml}$ bei 20°C) mit dem verdünnten Blut überschichtet und 30 Minuten bei 1640 rpm (*Heraeus Multifuge 3SR+*) zentrifugiert. Nach Zentrifugation konnte die Leukozytenbanden mittels einer Pasteurpipette abgenommen und 10 min bei 1250 rpm in 30 ml RPMI-1640 Medium gewaschen werden. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml RPMI-1640 Medium mit zusätzlich 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) und 1 % Penicillin / Streptomycin resuspendiert, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer quantifiziert, auf eine Zellzahl von $1 * 10^6 / \text{ml}$ gebracht und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

3.1.2 *Candida albicans*

Die beiden *Candida albicans* Stämme SC5314 (Wildtyp) und der GFP-exprimierende (Green Fluorescent Proteine) SCADH1G4A (Dabas & Morschhäuser, 2007) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Joachim Morschhäuser (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg) zur Verfügung gestellt. Sie wurden über Nacht bei 28 °C auf Sabouraud-Dextrose-Agar (4% Glucose) herangezogen und täglich neu angeimpft. Die Lagerung der Platten fand tagsüber bei 4 °C statt. Zur Vorbereitung der Infektionsversuche wurden die Hefen mit Hilfe einer Impföse von der Agarplatte genommen, in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und unter Zuhilfenahme eines McFarland-Trübungsstandards (McFarland, 1907) auf $1 * 10^7$ Hefen/ml gebracht. Die Korrektheit des Trübungsstandards wurde mehrfach durch Kontrollen in einer Neubauer Zählkammer überprüft.

Bei einigen der Versuchsansätze wurden durch Hitze getötete *Candida albicans* eingesetzt. Dazu wurden Hefen in der oben beschriebenen Konzentration über 90 Minuten in einem Wasserbad bei 56 °C hitzeinaktiviert. Die tatsächliche Abtötung wurde durch anschließenden Ausstrich und Inkubation auf Sabouraud-Dextrose-Agar kontrolliert.

3.2 Infektions- und Stimulationsversuche

Zu jeweils $2 * 10^6$ der adulten (PBMOs) und neonatalen Monozyten (CBMOs) wurden lebende oder hitzeinaktivierte Hefen in verschiedener Konzentration (1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10 bzw. MOI 1; 2,5; 5; 10;), sowie 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) als TLR4-Agonist, 5 µg/ml Pam3Cys als TLR2-Agonist oder das Antimykotikum Fluconazol gegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Zellen nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS bei einem Verhältnis von 1:1 für 30 Minuten fixiert (Endkonzentration 1% PFA). Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 1250 rpm, wurde das Pallet in 1 ml 1x PBS mit 3% hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und erneut bei 1250 rpm für 10 Minuten gewaschen und für die weiteren Schritte in 900 µl 1x PBS resuspendiert.

Wurde die Infektion über Nacht durchgeführt, musste die MOI auf 0,1 reduziert werden, da sonst die Hefen nach 20 Stunden das Reagiergefäß überwachsen hätten. Zudem mussten die Zellen auf Grund extensiven Hyphenwachstums nach Fixierung filtriert werden (35 µm Porengröße) um die FACS-Analyse möglich zu machen. Teilweise wurden noch vor und nach der Fixierung verschiedene Antikörperfärbungen mit den dafür nötigen Zentrifugationsschritten eingefügt (siehe Kapitel 3.3).

3.3 Spezifische Antikörperfärbungen

3.3.1 CD14

Die Zell-Hefen-Suspension wurde nach Fixation und Resuspension in 1x PBS / 3% FCS entweder mit einem Allophycocyanin (APC)- oder Phycoerythrin (PE)-gelabelten Anti-Human-CD14-Antikörper (MEM-15 Klon, Mouse IgG1) von Immunotools angefärbt. Die Proben ($300 \mu\text{l} \hat{=} 1 * 10^6 \text{Zellen/ml}$) wurden jeweils mit $0,25 \mu\text{l}$ (1:1200) des Antikörpers versehen, 15 Minuten in Dunkelheit angefärbt und anschließend in 1x PBS mit 3% FCS gewaschen. Der Antikörper bindet an ein 53-55 *kDa* GPI-verankertes Membranprotein, welches auf Monozyten, Makrophagen sowie Gewebemakrophagen und in geringem Maße auf Granulozyten exprimiert wird. APC ist im FACS mit einem HeNe-Laser bei 633 *nm* anregbar und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 660 *nm*. PE hat einen Absorptionsmaximum bei 495 *nm* und emittiert Licht mit 575 *nm*.

3.3.2 B7-2 / CD86

Vor Fixation der Zell-Hefen-Suspension wurde der Ansatz zentrifugiert, in $500 \mu\text{l}$ 1x PBS mit 3% FCS resuspendiert und über 10 Minuten in Dunkelheit mit $1 \mu\text{l}$ (1:500) eines Fluoresceinisothiocyanat-gelabelten Anti-Human-CD86-Antikörper (2331 / FUN-1 Klon; Maus IgG1 κ) von BD Biosciences angefärbt. Laut Hersteller erkennt der Antikörper ein 75 *kDa* schweres Oberflächenprotein der B7-Familie, welches vorrangig auf Monozyten und aktivierten B-Zellen exprimiert wird. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert bei Anregung mit Licht bei 496 *nm* grünes Licht mit einer Wellenlänge von 520 *nm*.

3.3.3 TLR2 / CD282

Der Alexa-Fluor-647-gelabelte Anti-Human-TLR2-Antikörper (11G7 Klon; Maus IgG1 κ) von BD Biosciences wurde ebenfalls vor Fixation eingesetzt. Die unfixierte Zell-Hefen-Suspension wurde zentrifugiert, in $500 \mu\text{l}$ 1x PBS mit 3% FCS resuspendiert, mit $1 \mu\text{l}$ (1:500) des Antikörpers versehen und 10 Minuten in Dunkelheit angefärbt. Laut Hersteller interagiert der 11G7-Klon mit humanem CD282, welches dem Toll-like Rezeptor 2 entspricht. Alexa-Fluor-647 absorbiert bei 650 *nm* und emittiert bei 665 *nm*.

3.3.4 TLR4 / CD284

Der ungelabelte Anti-human-TLR4-Antikörper (HTA125 Klon; Maus-IgG2a κ) von BD Pharmingen wurde ebenfalls vor Fixation eingesetzt. Die unfixierte Zell-Hefen-Suspension

wurde zentrifugiert, in 500 μl 1x PBS mit 3% FCS resuspendiert, über 10 Minuten mit 1 μl (1:500) des Antikörpers versehen. Nach anschließenden Fixations- und Waschschritten wurden die Zellen in 100 μl 1x PBS mit 3% FCS 20 Minuten mit einem biotinylierten Anti-Maus-Zweitantikörper (1:2000) versetzt und dann drei Mal in 1x PBS mit 3% FCS gewaschen. Abschließend wurden die Antikörper 20 Minuten lang in 100 μl mit Alexa-Fluor-647-gelabeltem Streptavidin von Invitrogen (1:500) versehen und wiederum dreimal gewaschen.

3.4 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zellen hinsichtlich Größe, Granularität und Färbung mit spezifischen (Fluoreszenz) Farbstoffen im Durchflusszytometer (Fluorescens Activated Cell Sorting, FACS) wurde das Gerät FACS Canto II von BD Biosciences verwendet. Die Auswertung der generierten Daten fand mit Hilfe von FCS Express Version 3 von DeNovo Software statt.

3.4.1 Monozyten Identifizierung

Durch die FACS-Analyse nach Größe (FSC, Forward Scatter) und Granularität (SSC, Sideward Scatter) konnte die Monozytenpopulation abgegrenzt werden (Abbildung 3.1). Da in der aus dem Ficoll-Gradienten gewonnen Population von Mononukleären Zellen neben Monozyten aber auch B-, T-Zellen und im fetalen Blut Normoblasten vorhanden sind, wurde zur Identifizierung der zur Phagozytose befähigten Monozyten, die Zell-Hefen-Suspension mit einem APC-gelabelten Anti-Human-CD14-Antikörper versehen. CD14 ist an der Bildung des für die Pathogenerkennung wichtigen, LPS-Rezeptors beteiligt und kann für die Oberflächenphänotypisierung von Monozyten und Makrophagen herangezogen werden (Ziegler-Heitbrock, 2000). Durch die CD14-Markierung konnte in der FACS-Auswertung nach Größe und Granularität die Monozytenpopulation eindeutig identifiziert und ein entsprechendes Monozyten-Gate gelegt werden.

3.4.2 Lymphozyten Identifizierung

Die Lymphozytenpopulation konnte in der FACS-Analyse (Abb. 3.2) anhand der Dichteverteilung (B) identifiziert werden (Pfeil). Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 200 μl mit Mononukleären Zellen aus adultem Peripherblut (2 Mio/ml) mit je 0,25 μl Pacific Blue-gelabelten Anti-Human-CD4-Antikörper (RPA-T4 Klon) und APC-H7-gelabelten Anti-Human-CD8-Antikörper (SK-1 Klon) 10 Minuten in Dunkelheit gefärbt und anschließend

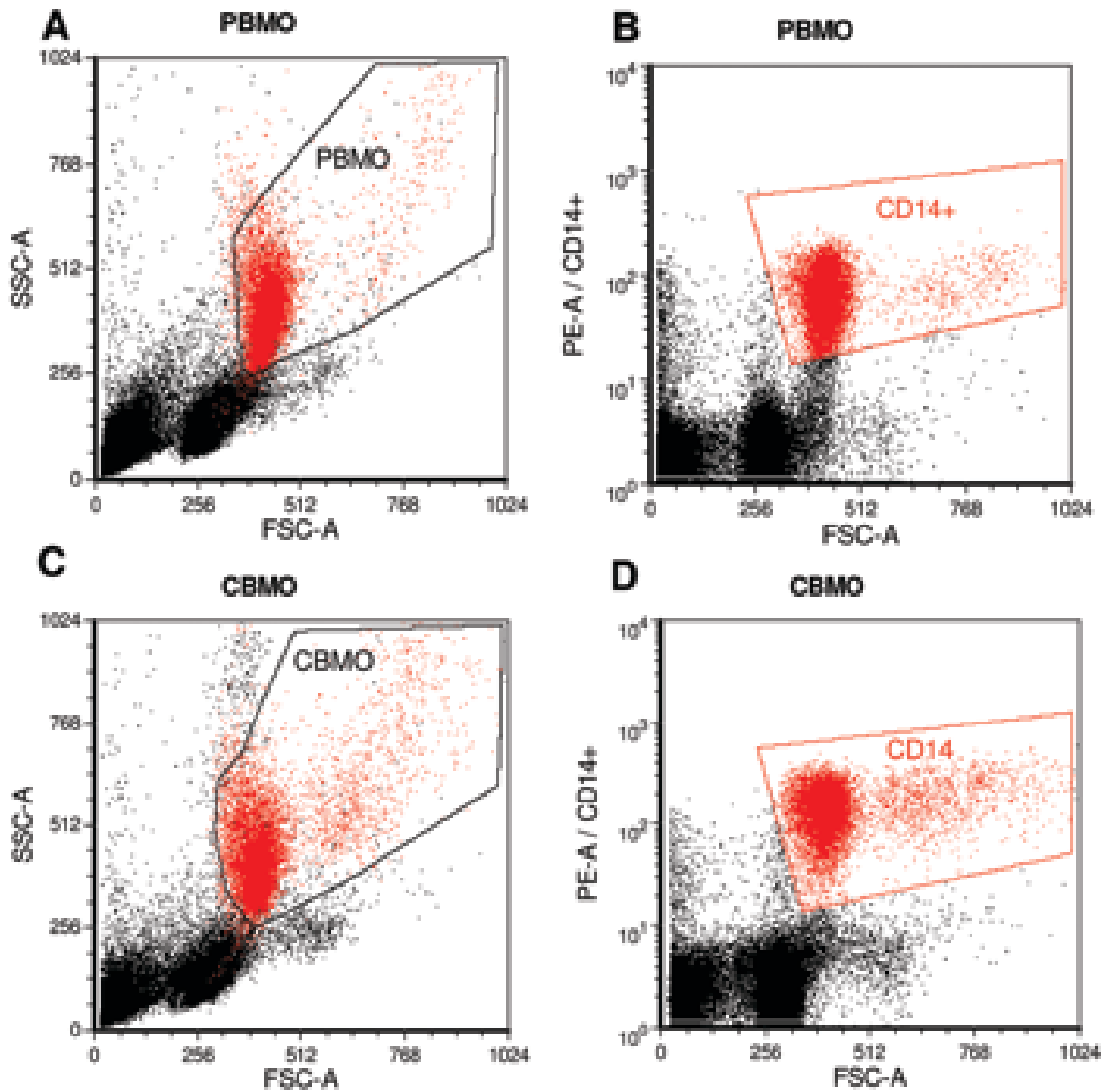


Abbildung 3.1: CD14-positive PBMOs (B) und CBMOs (D) aufgetragen nach Größe/FSC und Granularität/SSC (A, C)

durchflusszytometrisch analysiert. Die CD4- und CD8-positiven Zellen stellten sich in der Darstellung nach Größe und Granularität (A) genau dort dar, wo sie mit Hilfe der Dichteverteilung (B) ebenfalls ausgemacht werden konnte.

3.4.3 Bestimmung der Apoptoserate

Zur Zellzyklusanalyse wurde eine modifizierte Propidiumiodid-Färbung nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) durchgeführt. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, der nicht zur Passage von intakten Zellmembranen in der Lage ist. Er färbt somit DNA von permeabilisierten Zellen an. Die mit PFA fixierten und vorher mit CD14-Antikörper gefärbten Zellen wurden in 200 μ l 0,1%igem Triton X-100 gelöst. Triton X-100 (syn. Octoxynol-9) ist ein Tensid, das für die Permeabilisierung von eukaryotischen Zellmembranen verwendet

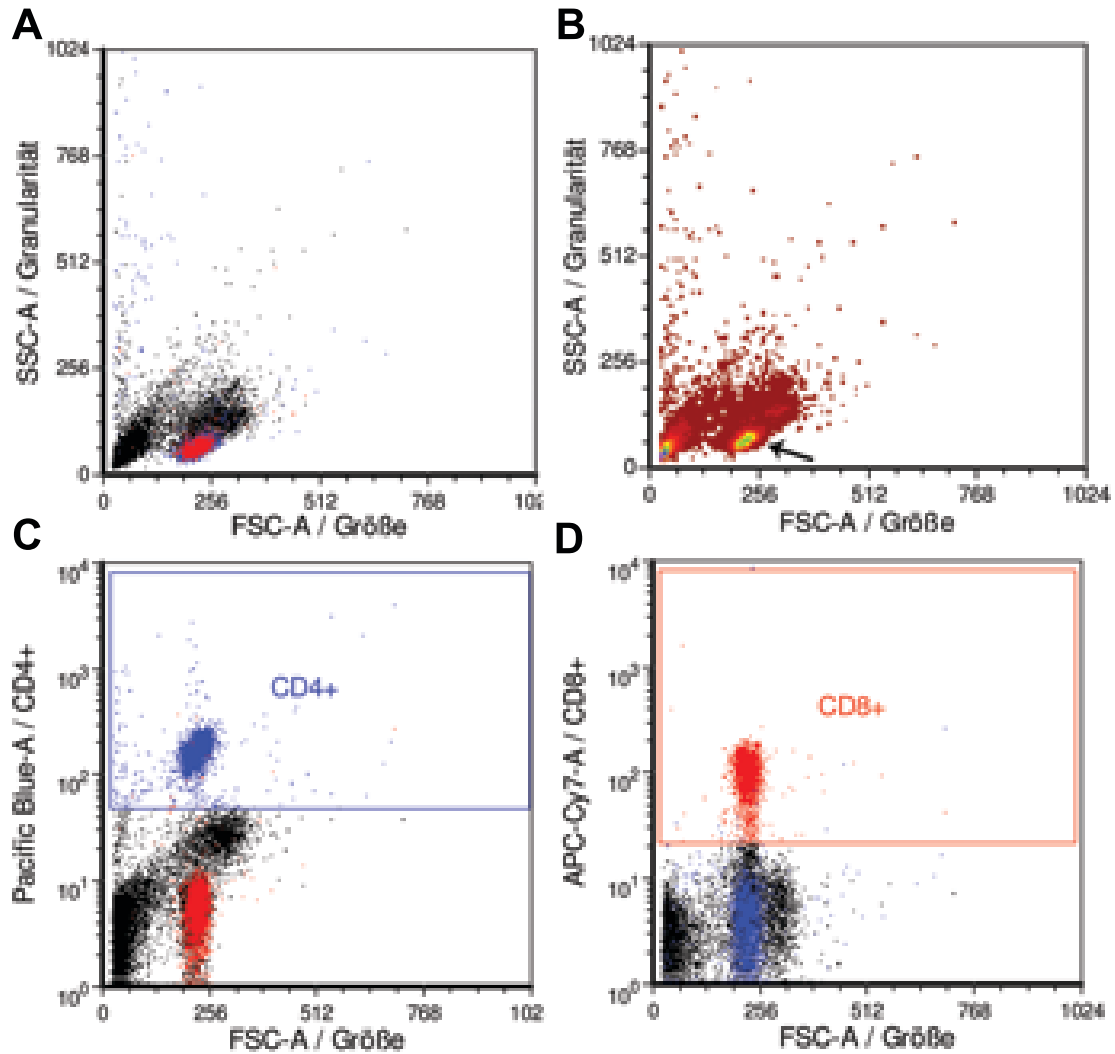


Abbildung 3.2: Anti-CD4 und -CD8 gefärbte Zellen aus adultem Peripherblut in der Darstellung nach Größe und Granularität (A), als Dichteplot (B), Größe gegen CD4+ (C) und Größe gegen CD8+ (D).

werden kann. Die permeabilisierten Zellen wurden in ihrer Suspension mit jeweils $0,1 \mu\text{l}$ Propidiumiodid gefärbt. Zur Kontrolle, ob auch die Hefen, welche ebenfalls einen eigenen Zellzyklus besitzen, durch die Methode anfärbbar seien, wurden in einem Ansatz, in der Abwesenheit von Zellen, nur *Candida albicans* Hefen fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

Die Modifikation gegenüber der Färbung nach Nicoletti besteht in der Fixierung mit PFA und der Permeabilisierung durch Triton X-100, was ursprünglich in einem einzigen Schritt durch Ethanol beschrieben wurde. Ethanol birgt jedoch den Nachteil, dass es zu einer stärkeren Veränderung der Zellgestalt hinsichtlich Größe und Granularität führt.

Im FACS ist Propidiumiodid im Phycoerythrin-Kanal (PE), also bei 575 nm , detektierbar. Dort können anhand der Intensität der gemessenen Wellenlänge Rückschlüsse auf die DNA-Menge und damit auf die derzeitige Zellzyklusphase gemacht werden (siehe Ab-

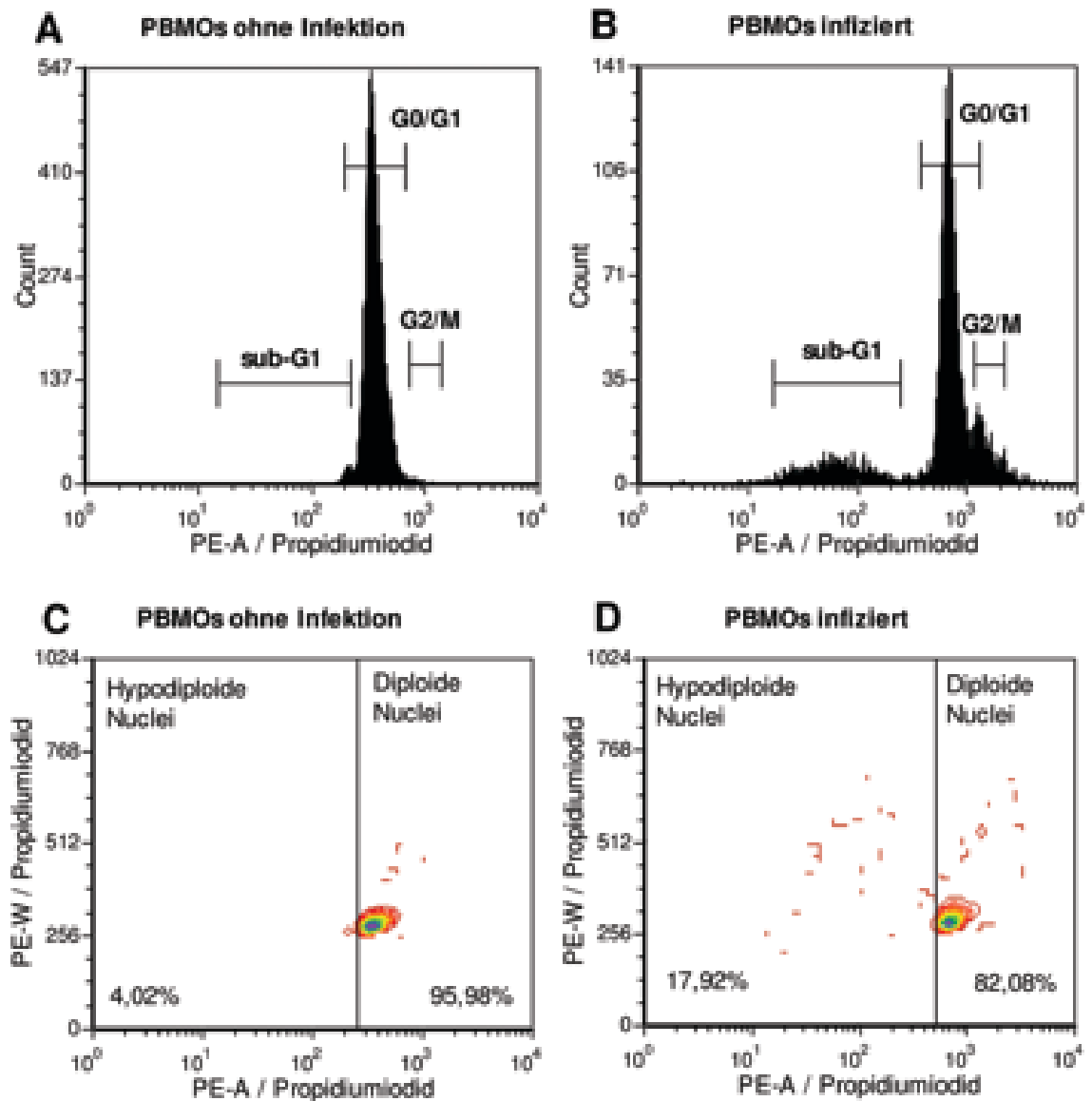


Abbildung 3.3: PBMOs ohne (A, C) und mit Stimulation durch *C. albicans* (B, D) nach 2h und einer MOI von 10.

bildung 3.2 A & B). Eine verminderte Anfärbung von Zellen (sub-G1-Peak), gegenüber Zellen mit diploiden Chromosomensatz (G0/G1-Peak), spricht für einen DNA-Verlust, welcher wiederum als Apoptose interpretiert werden kann. Zellen mit einem verminderten DNA-Gehalt im Vergleich zum G0/G1-Peak werden im folgenden auch als Zellen mit *hypodiploiden Nuclei* bezeichnet. Nach dem G0/G1-Peak tritt im Zellzyklus zwischen G2- und M-Phase ein weiteres Maximum auf, was im weiteren auch als Zellen mit *hyperdiploiden Nuclei* bezeichnet wird. Bei Zellen, die sich nicht vermehren, kann ein Peak in der G2/M-Region auch für eine Hyperkondensation des Chromatins sprechen. Hyperkondensiertes Chromatin gilt ebenfalls als Zeichen einer einsetzenden Apoptose.

Für die bessere Reproduzierbarkeit der Auswertung wurde für die Quantifizierung der Zellen im Sub-G1-Peak die Darstellung als Kontur-Plot gewählt (Abbildung 3.3 C & D).

Das Gate für Zellen mit *hypodiploidem Nucleus* wurde an den gelben Bereich der Dichteverteilung und damit an den Ansatz der Kurve des G0/G1-Peaks gelegt.

3.4.4 Bestimmung von Phagozytoseindex und Phagozytosekapazität

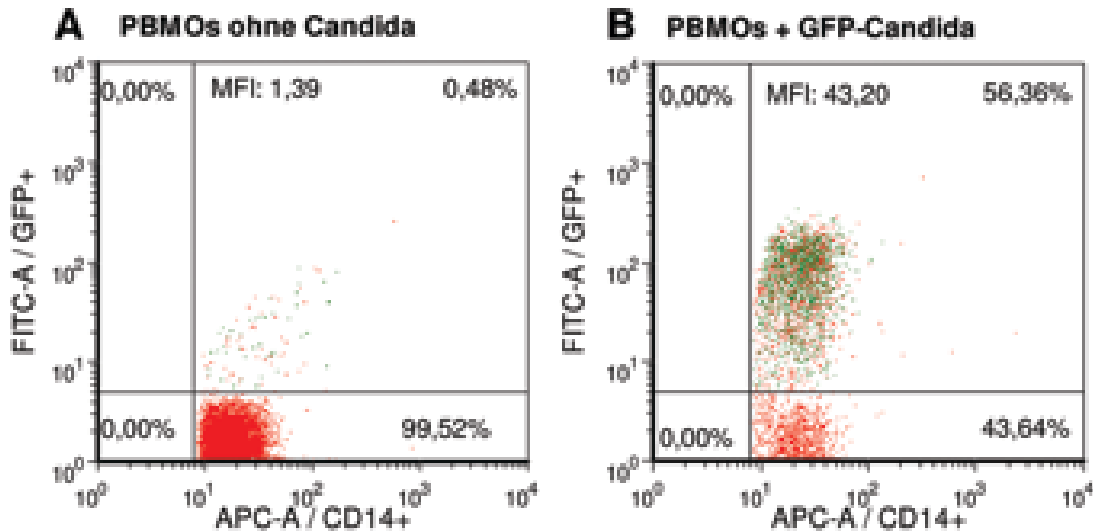


Abbildung 3.4: CD14-positive Zellen bei (B) und ohne Anwesenheit von GFP-exprimierender Candida (A) nach 2h und einer MOI von 5.

Candida-Hefen des GFP-exprimierenden Stammes SCADH1G4A konnten im FACS gut anhand ihrer grünen Farbe im FITC-Kanal identifiziert werden. Mit Anti-CD14-Antikörper gefärbte Zellen bei denen im FACS sowohl ein gelbes Signal im APC-Kanal (CD14+) und ein grünes Signal im FITC-Kanal (GFP+) detektierbar waren, wurden als von einem Monozyten phagozytiert oder an einen Monozyten gebundenen Candidapartikel interpretiert (Zellen im oberen, rechten Quadranten in Abbildung 3.4). Der Anteil der GFP-positiven unter den CD14-positiven Zellen wurde hierbei als Phagozytose- bzw. Bindungsindex und die *Mittlere Fluoreszenzintensität* (MFI) im FITC-Kanal der CD14-positiven Zellen als Phagozytose- bzw. Bindungskapazität definiert.

3.5 Mikroskopie und Färbungen

Mikroskopische Bilder wurden von mit PFA fixierten Zellen bzw. von der fixierten Zell / Hefen Suspension mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss) erstellt. CD14-positive Monozyten wurden mit einem Phycoerythrin-gelabelten (PE) Anti-Human-Antikörper (MEM-15 Klon, Mouse IgG1) von Immunotools markiert. Zellkerne wurden mittels 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), einem Farbstoff der intakte und permeabilisierte Zellmembranen

passieren kann und Adenosin-Thymin-reiche Regionen der DNA bindet, angefärbt. DAPI war nicht in der Lage die DNA der Hefen anzufärben. Die Hefen des SCADH1G4A Stammes sind GFP-markiert und waren somit im FITC-Kanal des Mikroskops detektierbar.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der FACS-Analysesoftware *FCS Express Version 3* von *DeNovo Software*, *Excel 2003* von *Microsoft* und *Prism 4.0* von *Graphpad Software* durchgeführt. Die *Mittlere Fluoreszenzintensität* (MFI) wurden in Form des arithmetischen Mittelwerts der jeweiligen Achse bestimmt. Ergebnisse wurden als *Mittelwert* \pm *Standardabweichung* angegeben. Von einem signifikanten Ergebnis wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

3.7 Material und Gerätschaften

ZELLEN, ORGANISMEN & STIMULANZIEN

Peripheral Blood Monocytes (PBMOs)

Cord Blood Monocytes (CBMOs)

Candida albicans; SC5314; Wildtyp

Candida albicans; SCADH1G4A; GFP-exprimierend

Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* (LPS)

Sigma-Aldrich

Pam3Cys-SKXXX

Genaxxon bioscience

ZELLKULTUR UND -PRÄPARATION

RPMI Medium 1640 1x +L-Glutamin

Invitrogen

Dulbecco's 1x PBS (Phosphate Buffered Saline)

PAA

Pen Strep; 10.000 *Units/ml* Penicillin; 10 *mg/ml* Streptomycin

Invitrogen

FCS (Fetal Calf Serum); Süd-Amerika

Invitrogen

Ficoll-Paque PLUS; 1,077 \pm 0,001 *g/ml* bei 20 °C

GE Healthcare

4 % Sabouraud-Dextrose Agar

Merck

Natriumchlorid

Merck

PFA (Paraformaldehyd)

Merck

Triton X-100 (Oxtoxinol 9)

Merck

Heparin-Natrium; 5000 *IE* / 0,2 *ml*

Ratiopharm

ANTI-KÖRPER & FARBSTOFFE

Anti-Human CD4-Pacific Blue; RPA-T4 Klon; Maus-IgG1, κ	BD Pharmingen
Anti-Human CD8-APC-H7; SK-1 Klon, Maus-IgG1, κ	BD Pharmingen
Anti-Human CD14-APC; MEM-15 Klon; Maus-IgG1	Immunotools
Anti-Human CD14-PE; MEM-15 Klon; Maus-IgG1	Immunotools
Anti-Human CD86-FITC; 2331 (FUN-1) Klon; Maus-IgG1, κ	BD Biosciences
Anti-Human TLR2-Alexa Fluor 647; 11G7 Klon, Maus-IgG1, κ	BD Biosciences
Anti-Human TLR4; HTA125 Klon; Maus-IgG2a, κ	BD Biosciences
Anti-Maus IgG Biotin; Polyklonal; Ratte-IgG	eBioscience
Streptavidin; Alexa Fluor 647	Invitrogen
Propidiumiodid $\geq 95\%$	Carl Roth
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Merck

LABORMATERIALIEN

50 ml Rundbodenröhrchen; Polypropylen	BD Falcon
15 ml Rundbodenröhrchen; Polypropylen	BD Falcon
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt
5 ml FACS Röhrchen; Polystyren	BD Falcon
5 ml FACS Röhrchen mit 35 μm Zellsiebkappe; Polystyren	BD Falcon
Zellkulturschalen; 100 x 20 mm	Sarstedt
Glaspipetten; 5, 10, 25 ml	BD Falcon
Pasteurpipetten; 2 ml	Brand
Pipettenspitzen; 10, 200, 1000 μl	Starlab
20 ml Spritzen; 6% Luer	Terumo
1 ml Spritzen; 6% Luer	BD Plastipak
Kanülen; 23G; 0,6 x 30 mm	BD Microlance

GERÄTSCHAFTEN

Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Zentrifuge: Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Magnetrührer: RCT Classic IKAMAG	VWR
Vortexer: VV 3	VWR
Transferpipetten; 2-20; 0,5-10; 20-200 μl	Brandt
Pipettierhilfe: accu-jet pro	Brandt
Durchflusszytometer: FACS Canto II	BD Biosciences

MIKROSKOPIE

Mikroskop: Axioplan 2	Zeiss
-----------------------	-------

DAPI Filter Set 49; 488049-9901-000	Zeiss
FITC Filter Set 60 HE (Colibri); 489060-9901-000	Zeiss
TMR-Dextran Filter Set 15; 488015-0000-000	Zeiss
Kamera: Cool Snap	Visitron Systems
Imaging Software: VisiVIEW	Visitron Systems

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Identische PICD bei Stimulation mit Wildtyp bzw. GFP-exprimierender *C. albicans*

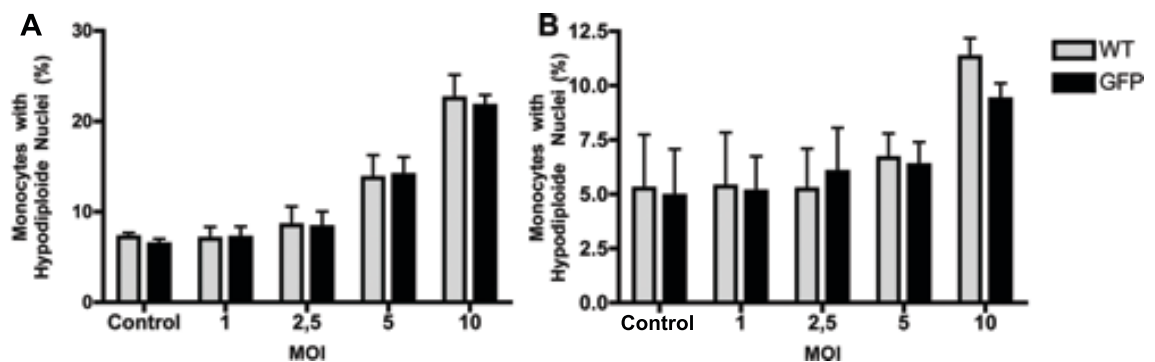


Abbildung 4.1: Prozentualer Anteil der sich im Monozytengate befindlichen Zellen mit hypodiploidem Zellkern für PBMOs (A) und CBMOs (B) bei variierender MOI nach 2h (jeweils n=3).

PBMOs (A) und CBMOs (B) wurden jeweils im Vergleich in aufsteigender Konzentration (MOI 1-10) mit dem Wildtypstamm SC5314 (grau) und dem GFP-exprimierendem Stamm SCADH1G4A (schwarz) für 2 Stunden stimuliert und anschließend ein Apoptosereadout nach der Methode von Nicoletti (siehe Kapitel 3.4.3) durchgeführt. So wird beispielsweise bei den PBMOs bei einer MOI von 5 eine PICD von $13,74 \pm 4,37\%$ (Wildtyp) / $14,07 \pm 3,45\%$ (GFP) und bei den CBMOs eine PICD von $6,66 \pm 1,96\%$ (Wildtyp) / $6,34 \pm 1,84\%$ (GFP) induziert. Beide Stämme scheinen sich also hinsichtlich ihres Einflusses auf die PICD vergleichbar zu verhalten.

4.2 *C. albicans* war nicht mit Propidiumiodid anfärbbar

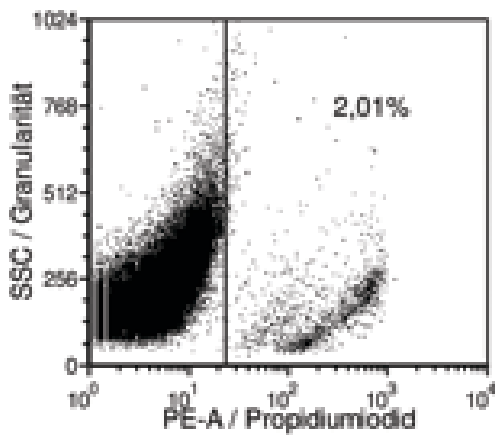


Abbildung 4.2: Mit Propidiumiodid gefärbte *C. albicans* Hefen in der FACS-Analyse im SSC- und PE-A-Kanal.

Mit isolierter *Candida albicans* wurde, in der Abwesenheit von weiteren Zellen, ein Apoptosereadout nach der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Es stellte sich dar, dass sich lediglich 2,01 % der in dem Ansatz befindlichen Hefen durch Propidiumiodid anfärben ließen. Durch der Methode kann also eine Anfärbung der Hefen-DNA mit Propidiumiodid ausgeschlossen werden.

4.3 Hitzebehandlung führte zu Verlust der Vitalität von *C. albicans*

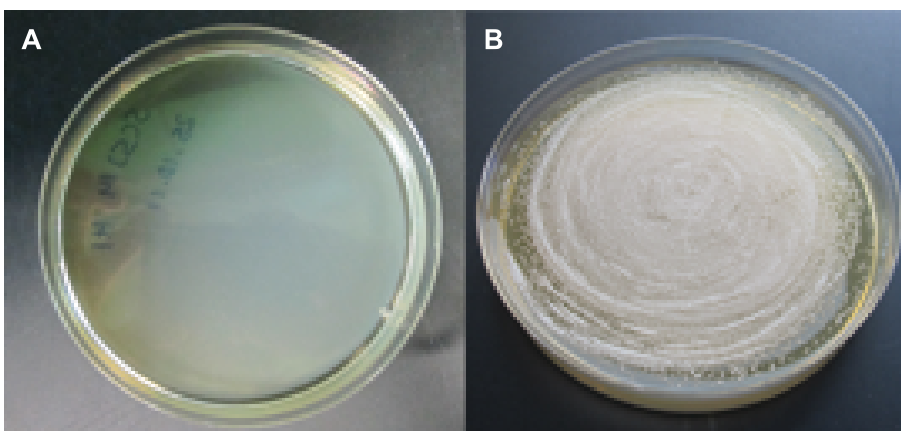


Abbildung 4.3: Ausstrich von hitzeinaktivierten (A) und unbehandelten (B) Hefen.

Candida albicans wurde im Wasserbad bei 56°C über 90 min hitzeinaktiviert und an-

schließlich auf 4%igem Sabouraud-Dextrose-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 28 °C waren auf den Platten keine Kolonien zu erkennen (A). Bei der Kontrollplatte, auf der unbehandelte Hefen ausgestrichen wurden, war die dichte weißliche Besiedlung deutlich erkennbar (B).

4.4 Inkubation von Hefen bei Raumtemperatur führte zu verminderter Hyphenbildung und damit einhergehend höherer PICD

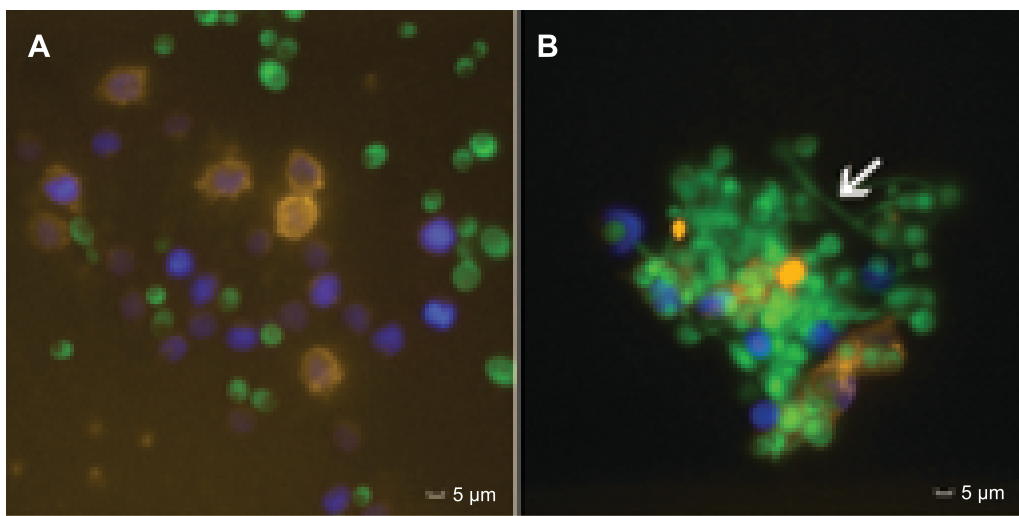


Abbildung 4.4: Zell-Hefen Suspension bei Raumtemperatur (A) und 37 °C (B). Grün: GFP-positive Hefen; Gelb: CD14-positive Zellen; Blau: Zellkerne.

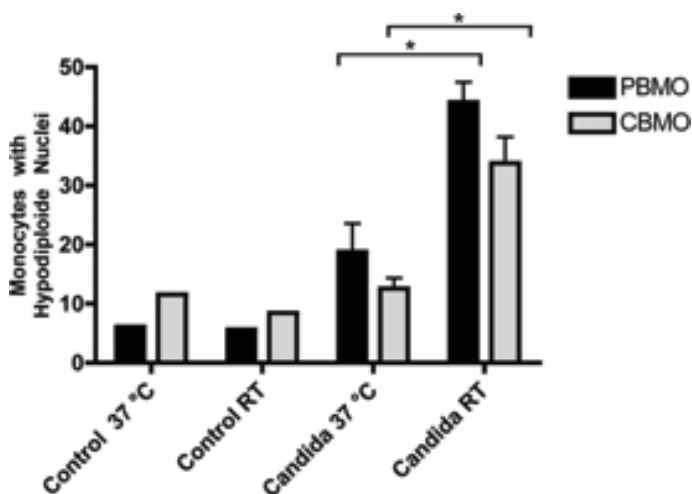


Abbildung 4.5: Uninfizierte und infizierte Monozyten (MOI 5) bei Raumtemperatur bzw. 37 °C (Kontrolle: n=1; WT: n=2) (* p < 0,05).

Jeweils ein Ansatz mit Candida stimulierten PBMOs (MOI 5) wurde bei Raumtempe-

ratur bzw. bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Stunden war fluoreszenzmikroskopisch im 37 °C-Ansatz (Abb. 4.4 B) eine deutliche Hyphenbildung (Pfeil) zu beobachten, wohingegen im RT-Ansatz (Abb. 4.4 A) die Hefen weiterhin in ihrer ovalen / sphärischen Blastosporen-Form vorlagen. Darüber hinaus waren die Monozyten durch ihre gelbe Anfärbung mit PE-gelabelten Anti-Human-CD14-Antikörper und der blauen Zellkernfärbung (DAPI) klar von anderen Lymphozyten (nur blauer Zellkern) und durch GFP-Expression grünen Candida Hefen zu differenzieren.

Der Apoptosereadout (siehe Kapitel 3.4.3) ergab einen vergleichbaren Anteil hypodiploider Zellen von unstimulierten Monozyten bei Raumtemperatur (Kontrolle RT: PBMOs 5,6 %; CBMOs 8,4 %) und bei 37 °C (Kontrolle 37 °C: PBMOs 6,1 %; CBMOs 11,5 %). Allerdings trat sowohl bei den infizierten PBMOs als auch bei den infizierten CBMOs bei den RT-Ansätzen ein signifikant höherer PICD als bei 37 °C auf. Der PICD bei Raumtemperatur betrug bei den PBMOs $44,11 \pm 4,75 \%$ und bei den CBMOs $33,75 \pm 6,29 \%$ und bei 37 °C bei den PBMOs $18,76 \pm 6,78 \%$ und bei den CBMOs $12,55 \pm 2,57 \%$ (Abb. 4.5). Somit ist von einer Abhängigkeit zwischen PICD und Temperatur auszugehen.

4.5 Fluconazol verminderte Hefenwachstum und hatte Einfluss auf den Zellzyklus der Monozyten

Verschiedene Ansätze aus PBMOs und *Candida albicans* (MOI 5) wurden mit aufsteigenden Fluconazolkonzentrationen versetzt (0,2; 2; 20; 100; 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$), 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und auf Sabouraud-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht war visuell eine signifikante Reduktion der Kolonisation bei Konzentrationen von 500-1000 $\mu\text{g/ml}$ erkennbar (Abb. 4.6).

Gleichzeitig wurden auch die Auswirkungen einer Fluconazolkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ auf den Zellzyklus der PBMOs untersucht (Abb. 4.7). Vier Ansätze (PBMOs, PBMOs + Fluconazol, PBMOs + Candida und PBMOs + Candida + Fluconazol) wurden nach einer Infektion von 2 Stunden (MOI 5) einer Zellzyklusanalyse nach Nicoletti (Kapitel 3.4.3) unterzogen. Auffallend hierbei war der hohe Ausschlag im hyperdiploiden Bereich der mit Fluconazol behandelten Zellen (Abb. 4.7 B) von 42,8 %, im Gegensatz zu den unbehandelten PBMOs (Abb. 4.7 A) von 21,5 %. Ein Einfluss von Fluconazol auf die Chromatinstruktur der Monozyten kann damit nicht ausgeschlossen werden.

Eine signifikante Reduktion im Bereich der hypodiploiden Zellkerne zwischen den mit Candida infizierten PBMOs (Abb. 4.7 C) von 9,15 % und den infizierten und mit Fluconazol behandelten PBMOs (Abb. 4.7 D) von 7,51 % war, zumindest bei der gewählten

Fluconazolkonzentration, nicht zu beobachten.

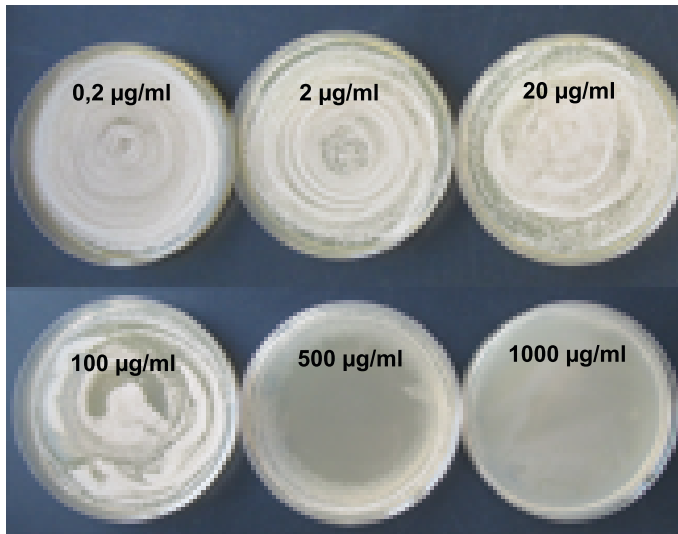


Abbildung 4.6: Ausstriche von mit aufsteigender Fluconazolkonzentration behandelten Zell-Hefen Suspensionen (MOI 5).

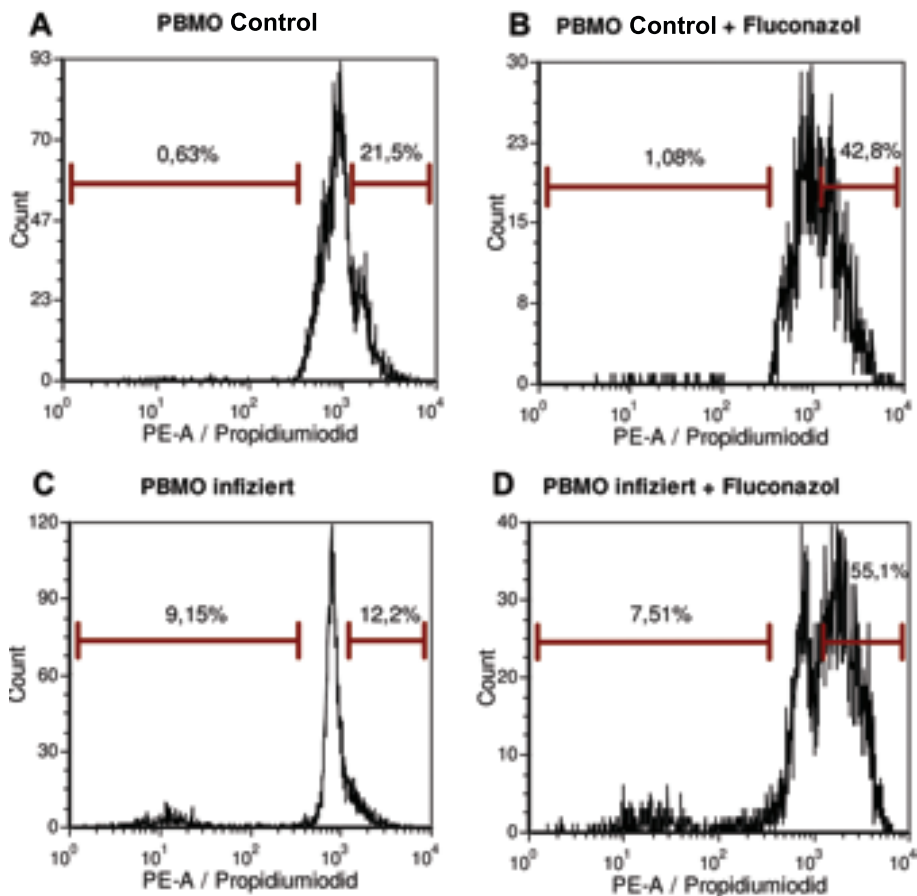


Abbildung 4.7: Zellzyklusanalyse von PBMOs (A), PBMOs + 20 µg/ml Fluconazol (B), PBMOs + *C. albicans* (C) und PBMOs + *C. albicans* + 20 µg/ml Fluconazol (D)

4.6 Identischer Phagozytoseindex und identische Phagozytosekapazität von PBMOs und CBMOs bei Stimulation mit *C. albicans*

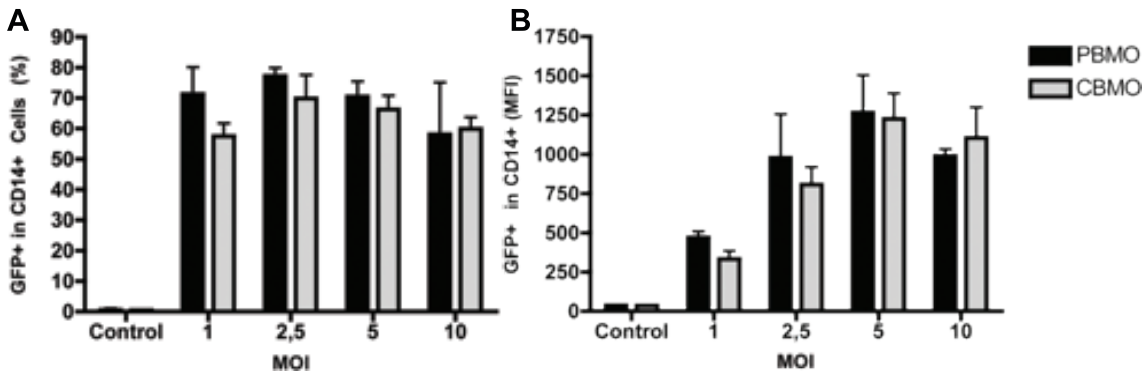


Abbildung 4.8: Phagozytoseindex (A) und Phagozytosekapazität (B) von Infektionsversuchen über 2h mit aufsteigenden MOIs (n=3).

Sowohl PBMOs (schwarze Balken) als auch CBMOs (graue Balken) wurden bei aufsteigenden Konzentrationen mit GFP-exprimierender *Candida albicans* stimuliert. Als Phagozytoseindex wurde der Anteil der GFP-positiven aller CD14-positiven Signale in der FACS-Analyse definiert und entspricht damit allen CD14-positiven Monozyten, die Candidapartikel phagozytiert oder gebunden haben (A). Als Phagozytosekapazität wurde die *Mittlere Fluoreszenzintensität* (MFI) im FITC-Kanal bei allen CD14-positiven Zellen bestimmt und entspricht damit der durchschnittlichen Menge der phagozytierten bzw. gebundenen Partikel pro Monozyten (B). Sowohl Phagozytoseindex, als auch Phagozytosekapazität fallen bei PBMOs und CBMOs im Vergleich ähnlich aus. So liegt der MOI 5-Phagozytoseindex der PBMOs bei $70,46 \pm 5,03\%$ und der CBMOs bei $66,28 \pm 7,88\%$. Die MOI 5-Phagozytosekapazität beträgt bei den PBMOs 1267 ± 411 und den CBMOs 1226 ± 282 .

4.7 Verminderter PICD von CBMOs im Vergleich zu PBMOs bei Stimulation mit *C. albicans*

PBMOs und CBMOs wurden über 2 Stunden bei 37°C aufsteigenden Konzentrationen von *Candida albicans* ausgesetzt und anschließend einer Zellzyklusanalyse nach Nicoletti (Kapitel 3.4.3) unterzogen (Abb. 4.9). Zunächst bestanden beim Anteil der Zellen mit hypodiploiden Nuclei, die keine Stimulation erfahren hatten (Kontrolle), keine Unterschiede

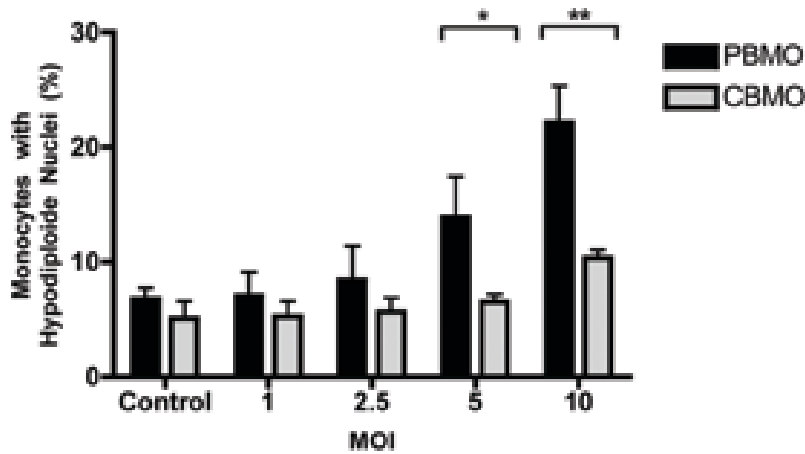


Abbildung 4.9: Phagozytose-induzierter Zelltod (PICD) nach 2h bei 37°C (n=6)

(* p < 0,05, ** p < 0,005)

zwischen PBMOs ($6,8 \pm 0,95\%$) und CBMOs ($5,09 \pm 3,61\%$). Bei einer MOI von 5 fällt ein signifikant niedriger phagozytose-induzierter Zelltod bei den CBMOs von $6,5 \pm 1,71\%$ im Vergleich zu den PBMOs von $13,91 \pm 3,53\%$ auf. Bei einer MOI von 10 wird der Unterschied zwischen PBMOs ($22,13 \pm 3,17\%$) und CBMOs ($10,34 \pm 1,65\%$) noch signifikanter. Es wird ersichtlich, dass in einem Zeitrahmen von 2 Stunden CBMOs bei gleichem Stimulus durch *Candida albicans* eine signifikant niedrigere Apoptoseinduktion erfahren.

Verlängert man die Inkubationszeit und führt die Zellzyklusanalyse erst nach einer Inkubation über Nacht durch, zeigt sich ein deutlich anderes Ergebnis (Abb. 4.10): Die CBMOs scheinen die PBMOs beim PICD eingeholt zu haben und ein so signifikanter Unterschied wie bei der Auswertung nach 2 Stunden ist nicht mehr zu beobachten, denn obwohl beim Übernacht-Versuch die MOI deutlich reduziert werden musste (siehe Kapitel 3.2), pendelt sich der PICD bei einer MOI von 0,1 bei den PBMOs auf $24,1 \pm 7,68\%$ bzw. CBMOs auf $18,24 \pm 4,1\%$ ein (Vgl. dazu PBMOs, 2h, MOI 10: $22,13 \pm 3,17\%$).

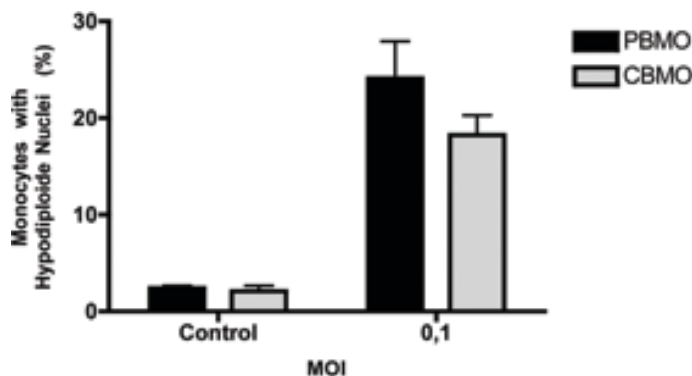


Abbildung 4.10: Phagozytose-induzierter Zelltod (PICD) nach 22h bei 37°C (n=4)

4.8 Bei Stimulation mit *C. albicans* trat keine Lymphozytenapoptose auf

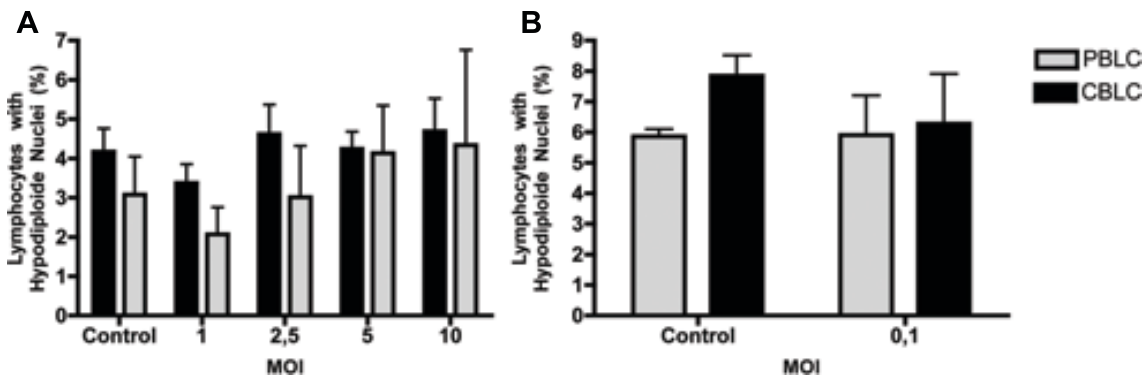


Abbildung 4.11: Lymphozytenapoptose nach 2h (A) (n=6) und 22h (B) (n=4)

Sowohl nach 2 Stunden (Abb. 4.11 A) als auch nach 22 Stunden (Abb. 4.11 B) tritt kein signifikanter Unterschied beim Anteil der Lymphozyten mit *hypodiploiden Nuclei* zwischen den uninfizierten (Kontrolle) und infizierten Lymphozyten bzw. PBLCs und CBLCs auf. Sowohl bei PBLCs als auch bei CBLCs pendelt sich die Apoptoserate nach 2 Stunden bei 2-4% bzw. nach 22 Stunden bei 6-8% ein. Lymphozyten scheinen durch Stimulation mit *Candida albicans* keine Apoptoseinduktion zu erfahren.

4.9 PICD und Phagozytose/Bindung zeigte sich bei Stimulation mit hitzeinaktivierter *C. albicans* vermindert

Lebende *Candida albicans* wurden einer, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, Hitzeinaktivierung unterzogen, die wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, zum Verlust der Vitalität von *Candida albicans* führte. Werden nun Monozyten vergleichend mit vitalen und hitzeinaktivierten Hefen stimuliert, sind Auffälligkeiten bezüglich der Phagozytose/Bindung und des phagozytose-induzierten Zelltodes auszumachen.

Insbesondere bei den PBMOs ist ein signifikanter Unterschied beim PICD durch lebende bzw. tote *Candida* zu erkennen (A). Vitale Hefen induzieren einen PICD von $19,64 \pm 3,74\%$, wohingegen er bei hitzeinaktivierten Hefen nur bei $7,61 \pm 1,68\%$ liegt. Ein so deutlicher Unterschied ist bei den CBMOs nicht zu erkennen. Auch beim Phagozytoseindex (B) zeigte sich bei den PBMOs ein signifikant reduzierter Wert bei den inaktivierten ($72,07 \pm 14\%$) gegenüber den vitalen Hefen ($34 \pm 8,9\%$). Bei der Phagozytosekapazität (C) wird

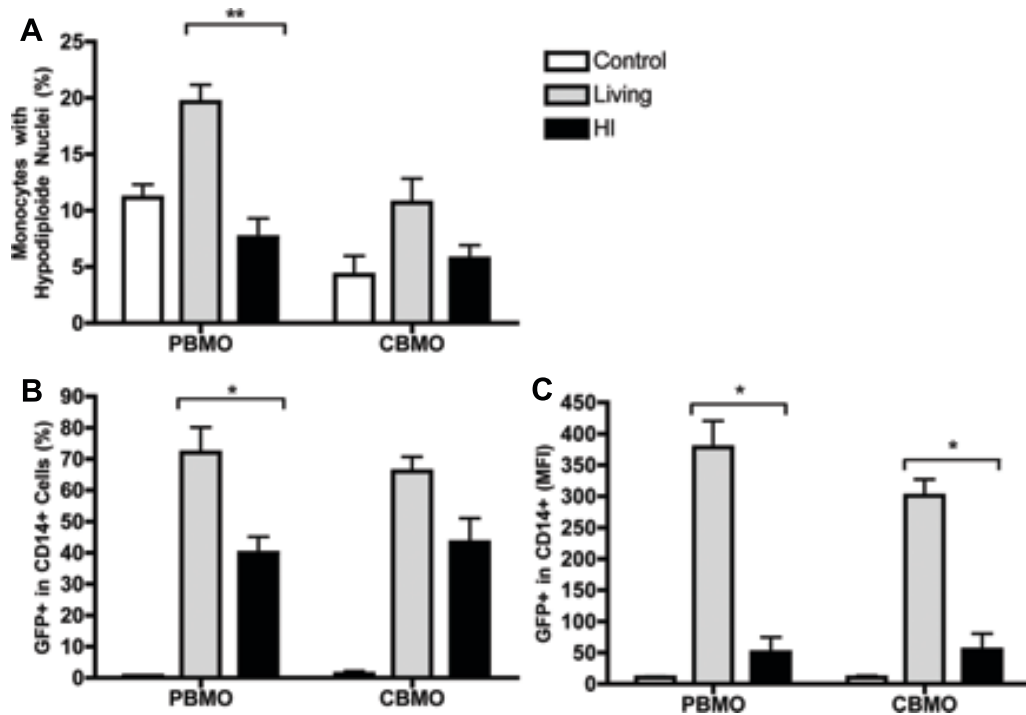


Abbildung 4.12: PICD (A) (n=6), Phagozytoseindex (B) (n=3) und Phagozytosekapazität (C) (n=3) im Vergleich zwischen lebenden (graue Balken) und hitzeinaktivierten (schwarze Balken) *Candida* Hefen. Infektionen jeweils mit einer MOI von 5 über 2h bei 37°C (* p < 0,05; ** p < 0,005).

der Unterschied sowohl bei den PBMOs als auch bei den CBMOs noch eindeutiger. Dort liegt die MFI bei der Stimulation mit lebender *Candida* bei $378,21 \pm 73,35$ (PBMOs) bzw. $300,77 \pm 45,71$ (CBMOs) und mit hitzeinaktivierter *Candida* bei $50,32 \pm 42,51$ (PBMOs) bzw. $54,60 \pm 44,58$ (CBMOs).

4.10 Stimulation mit *C. albicans* führte bei PBMOs zu stärkerer CD14-Modulation als bei CBMOs

Bei einer aufsteigenden Monozyten-Stimulationsreihe mit *Candida albicans*, zeigten in der prozentualen Auswertung (B) die unbehandelten Zellen die höchste (PBMOs: $67,11 \pm 5,33$ %; CBMOs: $30,46 \pm 13,79$ %) und die mit einer MOI von 10 stimulierten Zellen die niedrigste CD14-Expression (PBMOs: $13,22 \pm 3,34$ %; CBMOs: $8,16 \pm 3,26$ %). Bei beiden Zellpopulationen ist eine MOI-abhängige Kinetik erkennbar. Anders formuliert, handelt es sich dabei um eine signifikante Heruntermodulation von CD14 durch Stimulation mit *Candida albicans*, die sowohl bei PBMOs als auch bei CBMOs auftritt.

Zwischen PBMOs und CBMOs wird darüber hinaus schon bei den unbehandelten Proben ein signifikanter Unterschied deutlich. Unter den PBMOs exprimieren mit $67,11 \pm$

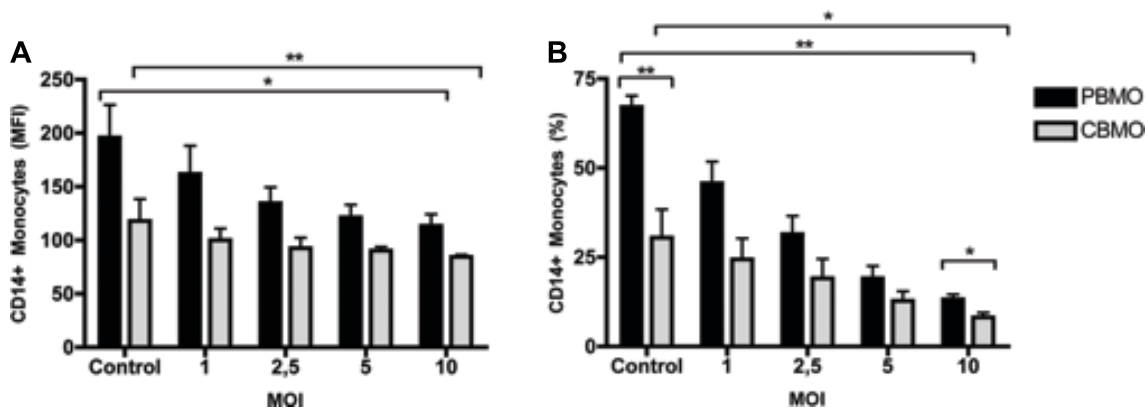


Abbildung 4.13: Auswertung der CD14-Expression nach MFI (A) und prozentual (B) bei Stimulation mit *C. albicans*. Infektionen jeweils mit einer MOI von 5 über 2h bei 37°C (n=6) (* p < 0,05; ** p < 0,005)

5,33 % etwa doppelt so viele Zellen CD14 als bei den CBMOs (30,46 ± 13,79 %). Dieser signifikante Unterschied bleibt auch im weiteren Verlauf der Stimulationsreihe bestehen und äußert sich bei einer MOI von 10 durch einen CD14-exprimierenden Anteil der PBMOs von 13,22 ± 3,34, % bzw. der CBMOs von 8,16 ± 3,26 %.

Bei der Auswertung nach *Mittlerer Fluoreszenz Intensität* (A), mit der eine Aussage über die CD14-Dichte auf der Oberfläche der einzelnen Zellen gemacht werden kann, ist kein signifikanter Unterschied zwischen PBMOs und CBMOs messbar. Eine Heruntermodulation durch die Stimulation mit *Candida albicans* und die damit einhergehende Kinetik, ist aber auch hier erkennbar.

Die Stimulation durch *Candida albicans* führt demnach zu einer Heruntermodulation von CD14 sowohl bei PBMOs als auch CBMOs. Außerdem fallen Grundexpression und Modulation von CD14 bei CBMOs im Vergleich zu PBMOs signifikant geringer aus.

4.11 Stimulation mit *C. albicans* führte zu einer Heraufregulation von CD86

Unstimulierte PBMOs und CBMOs exprimieren CD86 in vergleichbarer Intensität (PBMOs: 39,51 ± 9,93; CBMOs: 45,53 ± 12,99). Die Stimulation mit *Candida albicans* führt bei beiden zu einer signifikanten Heraufregulation von CD86, die ebenfalls in ähnlicher Intensität ausfällt (PBMOs: 69,7 ± 15,58; CBMOs: 69,62 ± 1,84).

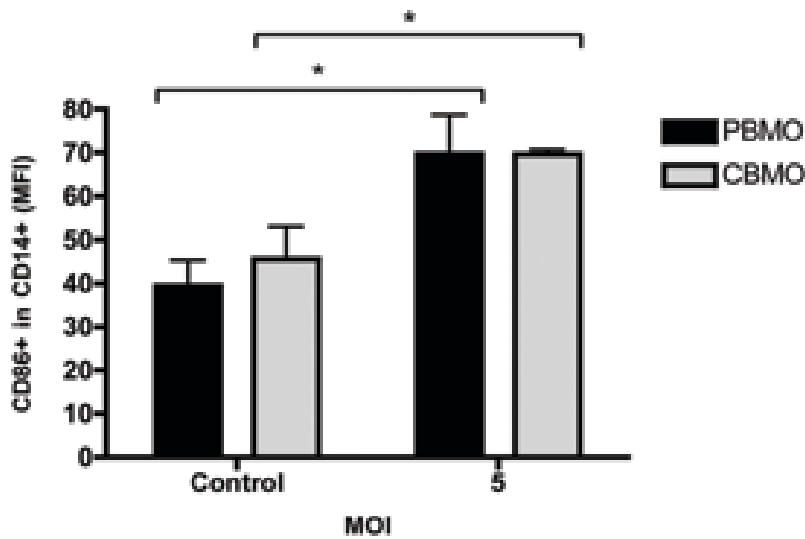


Abbildung 4.14: CD86-Expression (MFI) bei Stimulation mit *C. albicans*. Infektionen jeweils mit einer MOI von 5 über 2h bei 37°C (n=3) (* p < 0,05)

4.12 Stimulation mit *C. albicans* führte bei PBMOs zu stärkerer TLR2-Modulation als bei CBMOs

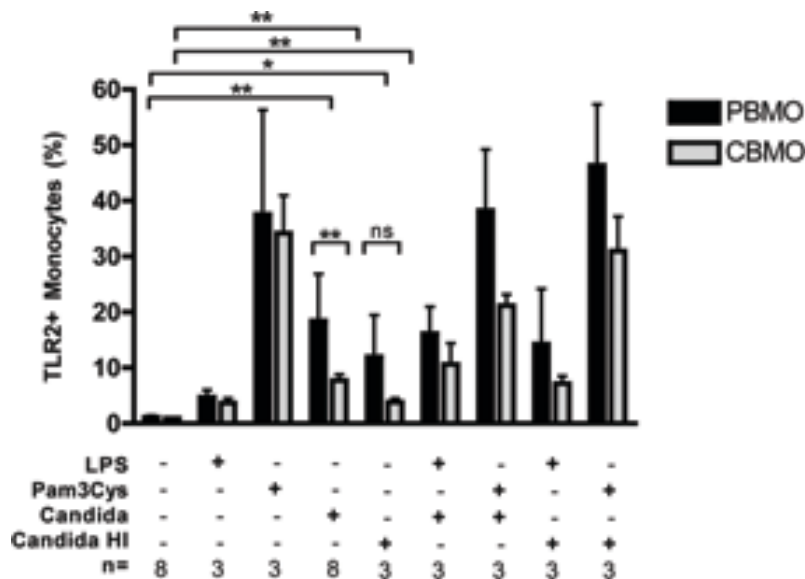


Abbildung 4.15: Prozentuale TLR2-Expression bei Stimulation mit *C. albicans*, hitzeinaktivierte *C. albicans*, Pam3Cys und LPS. Infektion jeweils mit einer MOI von 5 über 2h bei 37°C (** p < 0,005)

PBMOs und CBMOs wurden entweder mit LPS (10 ng/ml), Pam3Cys (5 µg/ml), *Candida albicans*, hitzeinaktivierter *Candida albicans* oder in verschiedenen Kombinationen über 2 Stunden bei 37°C stimuliert (Abb. 4.15). Neben einer vergleichbaren Grundexpression (ohne Stimulation) bei den PBMOs von 1,1275 ± 0,28 % bzw. CBMOs von 0,93 ± 0,36 % zeigten beide Zellpopulation einen leichten Ausschlag bei Stimulation mit LPS

(PBMOs: $4,72 \pm 1,29\%$; CBMOs: $3,67 \pm 1,47\%$) und einen starken Ausschlag bei Stimulation mit Pam3Cys (PBMOs: $37,59 \pm 18,72\%$; CBMOs: $34,15 \pm 11,85\%$). Auf eine Stimulation mit *Candida albicans* reagierten die PBMOs mit einer signifikant höheren Expression von TLR2 ($18,42 \pm 8,45\%$) als die CBMOs ($7,71 \pm 3,16\%$). Die Stimulation mit hitzeinaktivierter *Candida albicans* führte ebenfalls bei PBMOs ($11,98 \pm 7,51\%$) und CBMOs ($3,83 \pm 1,24\%$) zu einer signifikant höheren Expression im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Stimulation mit vitaler *Candida albicans* war die TLR2-Expression bei PBMOs signifikant höher als bei CBMOs. Diese Beobachtung ist mit hitzeinaktivierten Hefen nicht zu machen. Die Kombinationsstimulationen mit Pam3Cys + *Candida* bzw. mit Pam3Cys + *Candida* HI unterscheiden sich in ihrem Ausschlag nicht signifikant von den singulären Stimulationen mit Pam3Cys. Das gleiche gilt ebenfalls für die Kombinationsstimulationen mit LPS + *Candida* bzw. mit LPS + *Candida* HI, die sich nicht signifikant von den singulären Stimulationen mit *Candida* bzw. *Candida* HI unterscheiden.

4.13 Vergleichbare TLR4-Modulation bei PBMOs und CBMOs

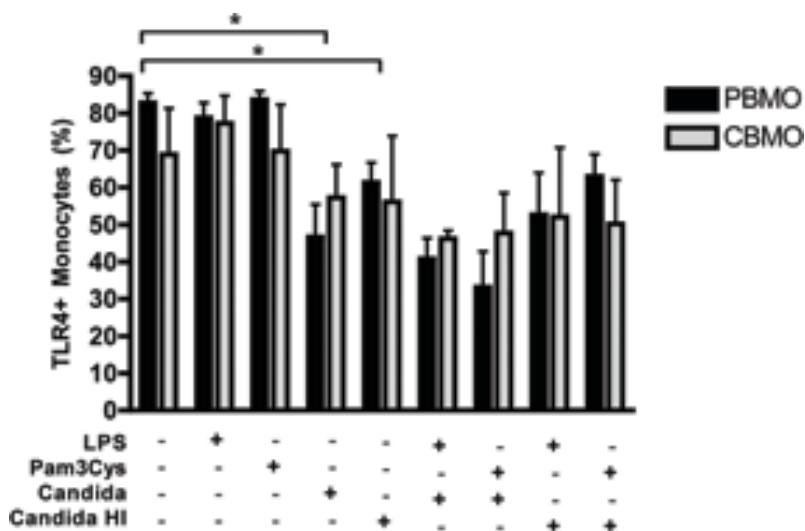


Abbildung 4.16: Prozentuale TLR4-Expression bei Stimulation mit *C. albicans*, hitzeinaktivierte *C. albicans*, Pam3Cys und LPS. Infektion jeweils mit einer MOI von 5 über 2h bei 37°C (PBMOs: $n=4$; CBMOs: $n=3$) (* $p < 0,05$)

PBMOs und CBMOs wurden entweder mit LPS (10 ng/ml), Pam3Cys ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$), *Candida albicans*, hitzeinaktivierter *Candida albicans* oder in verschiedenen Kombinationen über 2 Stunden bei 37°C stimuliert (Abb. 4.16). PBMOs und CBMOs zeigten zunächst eine ähnliche Grundexpression (ohne Stimulation) von $82,84 \pm 5,1\%$ bzw. $68,9 \pm 21,55\%$.

Darüber hinaus konnte bei der Stimulation mit LPS oder Pam3Cys kein Effekt gezeigt werden, der deutlich von der Grundexpression abwich. Erst bei der Stimulation mit *Candida albicans* kam es bei den PBMOs zu einer signifikanten Heruntermodulation von TLR4 auf $46,68 \pm 17,63\%$ bzw. bei der Stimulation mit hitzeinaktivierter *Candida albicans* auf $61,39 \pm 10,71\%$. Bei den CBMOs war eine Beobachtung ähnlicher Tendenz, jedoch nicht mit dieser Signifikanz zu machen. Die Kombinationsstimulationen aus LPS + Candida bzw. Candida HI und Pam3Cys + Candida bzw. Candida HI zeigten weder bei den PBMOs noch bei den CBMOs eine signifikante Verstärkung des beobachteten Effektes.

4.14 Nur bei phagozytierenden Monozyten trat Apoptose auf

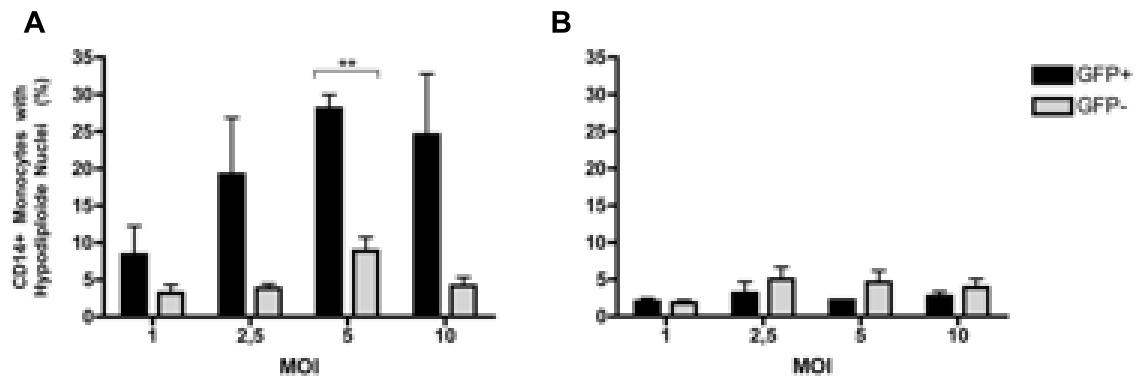


Abbildung 4.17: Apoptose CD14-positiver PBMOs (A) und CBMOs (B) unterschieden in phagozytierende (GFP-positive, schwarze Balken) und nicht-phagozytierende (GFP-negative, graue Balken) Zellen. Infektion mit *Candida albicans* vom Wildtypstamm (GFP-) und dem GFP-exprimierendem SCADH1G4A in aufsteigenden Konzentrationen. Jeweils über 2h bei 37°C ($n=3$) (** $p < 0,005$).

Nach Unterscheidung des phagozytose-induzierten Zelltodes zwischen PBMO und CBMO (siehe Kapitel 4.7) konnte ebenfalls die Apoptoseinduktion von phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zellen unterschieden werden. Hierfür wurden die Ansätze mit dem GFP-exprimierenden *Candida*-Stamm SCADH1G4A herangezogen. Zellen, die in der Durchflusszytometrie sowohl ein für CD14 als auch für GFP positives Signal zeigten, wurden als Monozyten, die *Candida*-Partikel phagozytiert oder gebunden hatten, interpretiert. Hierbei zeigten die PBMOs (Abb. 4.17 A), insbesondere bei einem Zell-Hefen-Verhältnis von 1:5, einen signifikanten Unterschied zwischen phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zellen (GFP+ PBMOs: $28,08 \pm 3,23\%$; GFP- PBMOs: $8,86 \pm 3,22\%$). Bei den CBMOs

konnten keine Beobachtungen dieser Signifikanz gemacht werden. Wie bereits in den vorherigen Auswertungen fielen die Apoptoseraten deutlich niedriger aus.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 In-vitro-Modell einer *Candida albicans* Infektion.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein In-vitro-Sepsismodell verwendet, das den Vergleich zwischen Interaktion von Pathogen (*Candida albicans*) und adulten bzw. neonatalen Monozyten erlaubte. Monozyten, die aus dem Peripherblut erwachsener, gesunder Spender und aus Nabelschnurblut gewonnen werden konnten, wurden mit dem *Candida albicans* Wildtypstamm SC5314 und dem GFP-exprimierenden Stamm SCADH1G4A für die Stimulationsversuche infiziert. Der GFP-exprimierende Candida-Stamm konnte genutzt werden um die phagozytosebezogenen Parameter der Monozytenpopulationen zu untersuchen. Die GFP-Fluoreszenz erlaubte eine Unterscheidung zwischen freien und von Monozyten phagozytierten bzw. gebundenen Candidapartikeln im Versuchsansatz. Auf Sabouraud-Dextrose-Agar verhielten sich die beiden Stämme bezogen auf ihre äußere visuelle Erscheinung und Wachstumseigenschaften gleich. Mikroskopisch fielen keine Unterschiede bei Wachstum und Hyphenbildung auf. Auch bei der Stimulation von Monozyten konnten bezogen auf ihrer Fähigkeit Apoptose zu induzieren, ähnliche Eigenschaften, sowohl bei PBMOs als auch bei CBMOs, gezeigt werden (Abbildung 4.1). Das heißt, es konnte davon ausgegangen werden, dass sich die beiden Stämme einzig hinsichtlich ihrer GFP-Expression unterscheiden und damit auch SCADH1G4A ein valides Modell für die Wildtyp-Infektion ist.

Die Fokussierung dieser Arbeit lag im Nachweis der Apoptoseinduktion, die methodisch auf der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti (Kapitel 3.4.3) beruhte und grundsätzlich von zentraler Bedeutung ist. Daher musste ausgeschlossen werden, dass die Methode mit dem Zellzyklus der Candida-Hefen interagiert. Es musste sichergestellt werden, dass nur die Apoptose der Monozyten und nicht etwa auch die der Hefen gemessen wurde. Für diesen

Zweck wurde eine isolierte Fixierung, Permeabilisierung und Propidiumiodid-Färbung mit *Candida albicans* durchgeführt (Kapitel 4.2). Es konnte gezeigt werden, dass sich lediglich 2,01 % der Hefen durch die Kombination aus Fixierung mit PFA (Endkonzentration 1 %), Permeabilisierung mit 0,1 %igem Triton X-100 und dem Nukleinsäureinterkalator anfärben ließen. Propidiumiodid ist nicht in der Lage intakte Zellmembranen mononuklearer Zellen zu passieren. Aus diesem Grund ist vor der Färbung eine Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100 nötig, welches aber, die Zellwände der Hefen nicht zu lysieren scheint. Von einer Störung der Zellzyklusanalyse durch die Hefen-DNA ist demnach nicht auszugehen.

Als weiteren Faktor für die Validität des Modells, wurde der Einfluss der Temperatur auf den Verlauf der Infektion untersucht. Stimulationen von PBMOs und CBMOs mit *Candida albicans* (MOI 5) wurden vergleichend bei Raumtemperatur und bei 37 °C durchgeführt (Kapitel 4.4). Mikroskopisch konnte bei den Hefen, die bei 37 °C inkubiert wurden, eine starke Hyphenbildung beobachtet werden, wohingegen die Hefen im Raumtemperatur-Ansatz weiterhin in ihrer ovalen / sphärischen Blastosporen-Form vorlagen (Abbildung 4.4 A & B). Diese Beobachtung deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, wonach die Hyphenbildung durch Inkubation in Serum bei >34 °C induziert wird (Berman & Sudbery, 2002). Darüber hinaus scheint die Hyphenbildung auch ein wichtiger Virulenzfaktor der Erreger darzustellen. Wie in Abbildung 4.5 ersichtlich, führt die Stimulation bei Raumtemperatur zu einem deutlich höheren PICD als bei 37 °C (PBMOs: 44,11 ± 4,75 % vs. 18,76 ± 6,78 %; CBMOs: 33,75 ± 6,29 % vs. 12,55 ± 2,57 %), wohingegen die Grundapoptose der Kontrollen sich sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37 °C im Bereich von 6-10 % bewegte und sich somit nicht signifikant voneinander unterschied. Die Hefen in Blastosporen-Form scheinen vom Immunsystem besser erkannt bzw. effektiver bekämpft werden zu können, was den höheren PICD im Raumtemperatur-Ansatz erklären würde. Es konnte gezeigt werden, dass Hefen in hyphaler Form unter anderem mehr SOD5, einen Transkriptionsfaktor für eine extrazelluläre Superoxid-Dismutase, exprimieren und damit in der Lage sind aus dem Phagolysosom der Phagozyten zu entkommen (Jacobsen et al., 2012). Ein weiterer Aspekt könnte auch einfach die Größe der Hyphen darstellen, die im Gegensatz zu den deutlich kleineren Blastosporen, andere Anforderungen an den Prozess der Phagozytose stellen. Die Inhibition der Morphologie von *Candida albicans* wäre demnach ein therapeutischer Ansatz für die Bekämpfung von Candida-Infektionen.

Auf der Suche nach einem Modell mit inaktivierten Hefen, wurde *Candida albicans* in einem Wasserbad bei 56 °C über 90 Minuten hitzeinaktiviert (Kapitel 4.3). Der anschließende Ausstrich auf 4%-Sabouraud-Agar zeigte den tatsächlichen Verlust der Vitalität. Bei der Stimulation von Monozyten zeigte sich eine signifikant verminderte Apoptose-Induktion durch die hitzeinaktivierten Hefen (Abbildung 4.12 A), was wiederum Hinweise auf die

Wichtigkeit der morphologischen Plastizität, die nur bei lebenden Hefen gegeben ist, für die Pathogenität des Organismus gibt (Berman & Sudbery, 2002). Bei der Analyse der Phagozytoseparameter fiel bei den PBMOs ein signifikant verminderter Phagozytoseindex (Anzahl phagozytierender Zellen) bei der Stimulation mit hitzeinaktivierter *Candida* auf. Bei den CBMOs war keine Beobachtung dieser Signifikanz zu machen (Abbildung 4.12 B). In der Auswertung der Phagozytosekapazität (Menge des phagozytierten Materials) wurde der Unterschied noch signifikanter (Abbildung 4.12 C). Da die Auswertung in diesem Falle aber anhand der *Mittleren Fluoreszenzintensität* (MFI) durchgeführt wird und ein Denaturieren des GFPs durch die Hitzeinaktivierung möglich ist, müssen die Daten vorsichtig interpretiert werden. Ein falsch-niedriges Ergebnis bei der Phagozytosekapazität von hitzeinaktivierten Hefen ist auf Grund von Denaturierung in Betracht zu ziehen. Die Vitalität der Hefen ist demnach vermutlich eine unbedingte Voraussetzung für die Abbildung des In-vivo-Sepisgeschehens im Reagenzglas.

Diese Tatsache, zusammen genommen mit der oben schon beschriebenen Hyphenbildung als wichtigen Pathogenitätsfaktor, beschreibt die Herausforderungen des in dieser Arbeit genutzten Modells. Die FACS-Analyse *post infectionem* verlangt in jedem Fall umfangreiche Fixierungsschritte einschließlich dem Abtöten der Hefen, bei dem Auswirkungen auf die Monozyten nicht ausgeschlossen werden können und die Ergebnisse hinsichtlich dieser Beeinflussung hinterfragt werden müssen.

Um die Differenzierung von Oberflächenstrukturen der Monozyten untersuchen zu können, wäre es interessant die *Candida*exposition der Zellen nach einer definierten Inkubationszeit zu beenden. Als möglichen Ansatz dafür wurde die Abtötung des Pathogens mittels eines Antimykotikums in Betracht gezogen. Aus diesem Grund wurde eine Titration mit Fluconazol durchgeführt und die Wirkung auf Zellen und Hefen untersucht. Nach Versetzen der Zell-Hefen-Suspensionen mit verschiedenen Fluconazolkonzentrationen über Nacht, war eine Reduktion der Kolonisation erst bei Konzentrationen von 500-1000 $\mu\text{g/ml}$ zu beobachten (Abbildung 4.6). Selbst bei der höchsten Konzentration waren aber weiterhin, wenn auch vereinzelt, Kolonien auf den Platten auszumachen. Des Weiteren wurden auch der Zellzyklus der Monozyten nach Fluconazolkontakt (20 $\mu\text{g/ml}$ über Nacht) analysiert. Im Vergleich zu den unbehandelten Proben (Abbildung 4.7 A) zeigte sich bereits bei dieser Konzentration ein starker Ausschlag im Bereich der Zellen mit hyperdiploiden Chromosomensatz (Abbildung 4.7 B). Dieser Ausschlag spricht für eine vermehrte Anzahl von Zellen mit Zellzyklusarrest am G2/M-Checkpoint und damit für eine frühe Apoptose (Cerella et al., 2009). Ob dieser Zustand einer frühen Apoptose reversibel ist, bleibt unklar. Es ist demnach davon auszugehen, dass Fluconazol einen Apoptose-induzierenden Effekt auf Monozyten hat. Darüber hinaus führt Fluconazol auch nur zu geringen Verminderungen

des PICDs bei PBMOs. Unbehandelte PBMOs zeigten einen PICD von 9,15 % wohingegen bei Fluconazolbehandlung der PICD nur auf 7,51 % gesenkt werden konnte (Abbildung 4.7 C & D). Eine Nutzung von Fluconazol für die definierte Modulation der Apoptoseinduktion zu einem bestimmten Zeitpunkt ist nicht möglich, da keine signifikante Verhinderung des PICDs erkannt und von einem Einfluss auf die Vitalität der Monozyten ausgegangen werden muss.

5.2 Verminderte Immunreaktion der CBMOs bei gleicher Phagozytose.

Eine Hypothese dieser Arbeit lautete, dass Monozyten von Neu- und Frühgeborenen im Vergleich zu adulten eine abweichende Reaktion auf *Candida*-Infektionen zeigen. Was bereits in Stimulationsansätzen mit *Escherichia coli* (Gille et al., 2008) und *Typ B Streptokokken* (Gille et al., 2009b) gezeigt werden konnte, sollte auch für *Candida albicans* untersucht werden. Zunächst wurde dafür mit Hilfe des GFP-exprimierenden Stammes, der Phagozytoseindex (Anzahl phagozytierender Zellen) und die Phagozytosekapazität (Menge des phagozytierten Materials) bestimmt (Kapitel 4.6). Die Monozyten beider Populationen (PBMOs und CBMOs) wurden im FACS anhand ihrer Größe und Granularität, aber auch durch ihre Expression von CD14 identifiziert (siehe Kapitel 3.4.1). Monozyten, die sowohl CD14-positiv als auch GFP-positiv waren, wurden als von Monozyten phagozytierte oder gebundene Candidapartikel interpretiert. Eine Unterscheidung zwischen der wirklichen Phagozytose und eines Anlagern bzw. Binden des grünen Candidapartikels an den Monozyten konnte mit dieser Methode nicht vorgenommen werden. Insbesondere durch die Fähigkeit zur Hyphenbildung ist ein Konzept der kompletten Phagozytose in Frage zu stellen. Entweder sind die Monozyten in der Lage einzelne Stücke aus der Hyphenintegrität heraus zu lösen und zu phagozytieren oder es findet lediglich eine Anlagerung der Zellen an die Hyphen statt. In anderen Arbeiten wurde eine Methode beschrieben, in der FITC-gefärbte Hefen, die sich noch außerhalb des Phagolysosoms befanden, durch Ethidiumbromid entfärben ließen (Saresella et al., 1997). Alternativ könnte auch eine Färbung mit Anti-GFP-Antikörpern zur Klärung des Sachverhalts beitragen. Ansätze dieser Art um die beschriebenen Unterschiede genauer differenzieren zu können, wurden in dieser Arbeit nicht verfolgt.

PBMOs und CBMOs zeigten in unseren Daten vergleichbare Phagozytoseeigenschaften. Sowohl der Phagozytoseindex (Abbildung 4.8 A) als auch die Phagozytosekapazität (Abbildung 4.8 B) fielen bei PBMOs und CBMOs gleich aus. Vor allem bei Diagramm B kann

hierbei eine Kinetik zwischen MOI und Phagozytosekapazität erkannt werden, die bei einer MOI von 5 zu ihrem Maximum kommt und dann wieder abnimmt. Bei Diagramm A ist ebenfalls eine, wenn auch nicht so deutliche, Kinetik zwischen MOI und Phagozytoseindex erkennbar, die bereits bei einer MOI von 2,5 zu ihrem Höhepunkt kommt und dann etwas abflacht. Es ist davon auszugehen, dass bei Stimulation mit *Candida albicans* das Pathogen eine vergleichbare Phagozytose durch PBMOs und CBMOs erfährt, die Zellen Erwachsener und Neugeborener sich in diesem Punkt also nicht unterscheiden.

Die daraufhin durchgeführte Zellzyklusanalyse (Kapitel. 4.7) zeigte jedoch einen signifikanten Unterschied im phagozytose-induzierten Zelltod (PICD) nach zwei Stunden. Bei PBMOs führt die Stimulation mit *Candida albicans* zu einem deutlich höheren PICD als bei den CBMOs (Abbildung 4.9). Auch hier ist ebenfalls bei den PBMOs im Verlauf der MOI-Steigerung eine Kinetik in Form einer Zunahme des hypodiploiden Anteils erkennbar, wohingegen diese Beobachtung bei den CBMOs nur sehr vage auszumachen ist. Der Anteil der Zellen mit hypodiploiden Nuclei, der den mit Apoptose einhergehenden DNA-Verlust darstellt, vergrößert sich zwischen der Kontrolle und MOI 10 bei den CBMOs etwa um das Doppelte (Kontrolle: $5,09 \pm 3,61\%$; MOI 10: $10,34 \pm 1,65\%$) und bei den PBMOs um etwas mehr als das Dreifache (Kontrolle: $6,8 \pm 0,95\%$; MOI 10: $22,13 \pm 3,17\%$). Die Daten legen nahe, dass adulte Monozyten auf Stimulation mit *Candida albicans* in einem Zeitraum von zwei Stunden sensibler zu reagieren scheinen und eine deutlich stärkere Apoptoseinduktion als CBMOs erfahren. Die Beobachtungen decken sich damit mit den bereits bei *E. coli* und *Typ-B Streptokokken* gemachten.

Bei Ausweitung des Zeitraums auf 22 Stunden ist diese Beobachtung nicht mehr zu machen (Abb. 4.10). Obwohl aus methodischen Gründen die MOI bei diesem Versuchsaufbau auf 0,1 reduziert werden musste, pendelt sich der PICD bei den PBMOs auf $24,1 \pm 7,68\%$ bzw. CBMOs auf $18,24 \pm 4,1\%$ ein (Vgl. dazu PBMOs, 2h, MOI 10: $22,13 \pm 3,17\%$). Die Reduktion der MOI spielt hierbei keine Rolle, da es durch Vermehrung der Hefen im Ansatz wieder zu einer ausreichend hohen Konzentration kommt. Die PBMOs scheinen also in der frühen Phase der Infektion einen Vorsprung bei der Apoptose zu haben, der im Verlauf von den CBMOs wieder aufgeholt wird. Die neonatalen Zellen scheinen also einem im Ausmaß ähnlichen programmierten Zelltod zu unterlaufen, aber mit einer verlängerten Latenz. Dies lässt sich entweder als Suszeptibilität der CBMOs gerade im frühen Stadium der Infektion deuten oder ist schlichtweg Zeichen eines maximalen Stimulus durch die sich in sehr starkem Maße vermehrenden Hefen über die Zeit.

Des Weiteren wurden die Apoptoseraten auch in Abhängigkeit der Phagozytose untersucht (Abbildung 4.17). Dafür wurde mit Hilfe des GFP-exprimierenden *Candida*-Stammes zwischen phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Monozyten unterschieden. In der

Durchflusszytometrie wurden CD14-positive Zellen als Monozyten identifiziert und bei gleichzeitig vorliegendem Signal im GFP-Kanal von einer Zelle ausgegangen, die Candida-Partikel phagozytiert bzw. gebunden hatte. Insbesondere die Daten der CBMOs (Abbildung 4.17 A) konnten zeigen, dass eine Apoptose im Prinzip nur bei phagozytierenden Zellen statt fand. GFP-negative Zellen zeigten eine deutlich geringere Apoptoserate. Dies ist ein grundsätzlicher Unterschied zu den Daten unserer Arbeitsgruppe im Infektionsmodell mit *E. coli*: Dort zeigten, im Sinne einer "Bystander-Apoptose", insbesondere die nicht-phagozytierenden Monozyten hohe Apoptoseraten. Die Phagozytose von *E. coli* durch Monozyten führte zu hohen TNF- α -Spiegeln und damit verbundener Apoptoseinduktion bei den umliegenden Zellen. Im Trans-Well-Versuch wurde bei phagozytierenden Zellen ein signifikant niedrigerer Zelltod als bei den umliegenden nicht-phagozytierenden Zellen nachgewiesen (Dreschers et al., 2013). Die immunologische Reaktion auf *C. albicans* und *E. coli* scheint grundsätzlich unterschiedlich zu verlaufen. Worauf sich die beschriebenen Unterschiede begründen und ob sich die Beobachtungen auch mit einer Veränderten Zytokin-Sekretion bei Candida-Infektion deckt, muss durch weiterführende Experimente gezeigt werden. Bei den CBMOs sind entsprechende Beobachtungen nicht zu machen (Abbildung 4.17 B). Dies könnte zum einen ebenfalls an dem bereits beschriebenen generell verminderten phagozytose-induzierten Zelltod liegen oder durch die methodische Schwierigkeit, dass CD14 durch verringerte Präsentation auf der Zelloberfläche als Identifizierungsmarker nicht zur Verfügung steht (siehe nächster Abschnitt), erklärt werden. Die an den Fehlerbalken ersichtliche große Streuung, insbesondere bei den CBMOs, ist durch eine deutlich verminderte CD14-Expression zu erklären.

Monozyten in Zellkultur wurden anhand ihres CD14-Markers identifiziert (Kapitel 4.10). Dabei fiel eine Heruntermodulation von CD14 durch Candida-Infektion bei neonatalen und erwachsenen Monozyten auf (Abbildung 4.13), die sowohl in der prozentualen Auswertung (Diagramm B), als auch in der nach MFI signifikant ausfällt (Diagramm A). Monozyten scheinen demnach durch Candida-Kontakt oder durch Apoptoseinduktion ihr CD14 zu verlieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine aktive Rolle von CD14 bei der Pathogenerkennung mit konsekutiver Internalisierung. Eine weitere Beobachtung zeigte, dass schon bei der Kontrolle PBMOs signifikant mehr CD14 als CBMOs exprimieren (PBMO: $67,11 \pm 5,33\%$; CBMO: $30,46 \pm 13,79$). Diese Beobachtung ist jedoch in Frage zu stellen. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass bei den CBMOs im Monozyten-Gate viele CD14-negative Normoblasten liegen und es damit zu einer prozentualen Verschiebung bei den CD14-positiver Zellen kommt. Diese Interpretation legt auch die Auswertung nach der MFI nahe: Sie zeigt ebenfalls einen Unterschied der CD14-Expression bei den zwei Zellpopulationen, der jedoch nicht signifikant ausfällt. D.h. der Anteil CD14-positiver Zel-

len unterscheidet sich in dieser Auswertung nicht zwischen PBMOs und CBMOs. Darüber hinaus lässt die MFI eine Aussage über die CD14-Dichte pro Zelle zu. Sie scheint bei den CBMOs ebenfalls etwas geringer auszufallen. Von einem signifikanten Unterschied kann aber auch hier nicht gesprochen werden.

Da die Erkennung und Initiierung der Abwehr von *Candida*-Infektionen vor allem von Toll-like Rezeptoren auf Monozyten realisiert wird (siehe Kapitel 1.3 und 1.7), wurden die Monozyten im Weiteren auf ihre Expression von TLR2 und TLR4 untersucht. PBMOs und CBMOs trugen im unstimulierten Kontrollansatz nur relativ wenig TLR2, waren aber beide, wie in der Literatur beschrieben, durch Pam3Cys in gleichem Maße maximal stimulierbar. Eine Stimulation mit LPS führte ebenfalls zu einer leichten, aber nicht so starken Reaktion wie auf Pam3Cys, was vermutlich durch wechselseitige Einflussnahmen von TLR2, TLR4 und LPS-Rezeptor zu erklären ist. Auch die Stimulation mit *Candida albicans* führte zu einer Heraufregulation von TLR2 auf den Oberflächen der Monozyten, die aber bei den CBMOs signifikant niedriger ausfiel. Auch mit hitzeinaktivierten Hefen war der Effekt zu beobachten, wenn auch mit niedrig signifikanterem Unterschied zwischen PBMOs und CBMOs (Abbildung 4.15). Da die Expression mit Pam3Cys in gleichem Maße bei PBMOs und CBMOs maximal stimulierbar war, sich jedoch von der auf *Candida* unterschied, scheint die schwächere Modulation der Rezeptorexpression bei CBMOs nicht durch eine geringere Rezeptormenge per se, sondern durch eine abgeschwächte Responsibilität verursacht zu sein. Diese Beobachtung ist vermutlich ein weiteres Indiz für die verminderte immunologische Potenz der CBMOs und könnte darüber hinaus auch im Zusammenhang mit dem verminderten PICD stehen.

Im Gegensatz dazu, war bei der TLR4-Modulation kein Unterschied zwischen PBMOs und CBMOs auszumachen (Kapitel 4.13). Während fast alle Monozyten (70-80 %) im Kontrollansatz TLR4 trugen, war bei Stimulation mit *Candida albicans* (lebend und hitzeinaktiviert) eine signifikante Heruntermodulation bei den PBMOs und CBMOs zu beobachten (Abbildung 4.16). Dieser Effekt geht vermutlich auf Internalisierung der Rezeptoren zurück. Das entspricht Ergebnissen klinischer Daten, bei denen im Blut von neugeborenen Sepsispatienten ebenfalls eine Heraufregulation von TLR2 und eher moderate Veränderungen bei TLR4 beschrieben wurden (Viemann et al., 2005). Interessanterweise waren bei uns keine modulatorischen Effekte bei der Stimulation mit LPS, was als selektives Stimulans für TLR4 beschrieben ist, in der gewählten Konzentration messbar. Eine andere Arbeitsgruppen konnte bei LPS-Stimulation eine Heraufmodulation von TLR4 um das fast zehnfache bei CBMOs und das knapp siebenfache bei PBMOs zeigen (Yerkovich et al., 2007). In diesem Falle wurden die Monozyten aber mit Interferon- γ vorstimuliert, was die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären könnte. Interferon- γ ist als Aktivator

von Makrophagen bekannt und hat vielfältigen Einfluss auf das Verhalten der Zellen im Zusammenhang mit Inflammation und Pathogenabwehr. Es ist unter anderem in der Lage die Zytokinproduktion, Antigenpräsentation und den Zellzyklus in vielfältiger Weise zu modulieren. Insbesondere der Einfluss auf die Erkennung von Pathogenmustern wie LPS und CpG-Motiven durch Toll-like-Rezeptoren ist bekannt und damit eine Erklärung für die beschriebenen Ergebnisse (Schroder et al., 2004).

Bei den Untersuchungen zu TLR2 und TLR4 wurden außerdem Kombinationsstimulationen mit Pam3Cys + Candida bzw. Candida HI und LPS + Candida bzw. Candida HI durchgeführt. In beiden Fällen waren keine additiven Effekte messbar. Die Stimulation mit Pam3Cys führte singular zu einem ebenso starken TLR2-Ausschlag wie bei Pam3Cys und Candida bzw. Candida HI in Kombination. Die gewählte Pam3Cys-Konzentration scheint also einen maximalen Effekt auf die TLR2-Modulation zu haben. Auch die Herunterregulation von TLR4 bei Kombination mit Pam3Cys bzw. LPS ging nicht über die singuläre Modulation durch Candida bzw. Candida HI heraus. Ursache dafür könnte im Falle von TLR4 eine zu niedrig gewählte Konzentration der Stimulanzen, die bereits oben erwähnte fehlende Vorstimulation mit IFN- γ bzw. die sehr hohe Sensibilität auf Candida-PAMPs sein.

Für TLR2 scheint Pam3Cys ein potentes Stimulans und damit eine sehr geeignete Positivkontrolle zu sein, die zur maximalen TLR2-Expression führt und auch durch den Kontakt mit Candida nicht synergistisch verstärkt werden kann.

Zusammenfassend ist bei CBMOs mit Candida-Kontakt bei gleicher Phagozytoseleistung und TLR4-Modulation, ein verminderter phagozytose-induzierter Zelltod und eine verminderte TLR2-Modulation zu beobachten. Diese lässt sich in Übereinkunft mit dem Konzept einer allgemeinen Depression des neonatalen Immunsystems und den Beobachtungen von Gille et al. mit *E. coli* bringen: Eine verminderter phagozytose-induzierter Zelltod und das damit verbundene verlängerte Überleben neonataler Monozyten könnte, z.B. durch anhaltende Sekretion von Entzündungsmodulatoren, zur Aufrechterhaltung des Sepsisgeschehens beitragen (Gille et al., 2008). Möglicherweise besteht hier ein mechanistischer Zusammenhang, bei dem die verminderte TLR2-Modulation Einfluss auf die niedrigere Apoptoseinduktion hat. Die Wichtigkeit von TLR2 auf die Initiierung von immunologischen Mechanismen durch Monozyten wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben: TLR-2-Rezeptoren aktivieren über den MyD88-Signalweg sowohl Fas-Ligand als auch NF κ B und induzieren damit unter anderem Apoptose über Caspase-8 und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Aliprantis et al., 2000). Außerdem sind Toll-like Rezeptoren an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt und haben damit eine wichtige Rolle bei der direkten Immunabwehr (Stutz et al., 2009). Darüber hinaus konnte

gezeigt werden, dass selektive Stimulation von TLR2 zu Sekretion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Sadeghi et al., 2007) und die selektive Blockade zu einer 60-75%igen Inhibition durch *Candida albicans* induzierte TNF α und IL-1 β Sekretion führte, die wichtigen Einfluss auf die Modulation der Inflammation haben. Gleichzeitig konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Blockade von TLR4 keine Auswirkung auf diese Effekte hat (Netea et al., 2002).

5.3 Reaktion der Lyphozytenpopulation im Rahmen der *Candida albicans* Infektion

Über die humorale Antwort im Geschehen der *Candida*-Sepsis ist in der Literatur wenig beschrieben. Im Tiermodell mit Knock-out Mäusen konnte die wichtige Rolle von T_H1 und T_H17 Zellen für die Bekämpfung der *Candida* Infektion gezeigt werden. Mäuse deren Caspase-1 und Speck-like Protein, welche die T_H1/T_H17 Antwort repräsentieren, ausgeschaltet waren, zeigten höheres intravasales *Candida*-Wachstum und eine verminderte Überlebensrate (van de Veerdonk et al., 2011). Die Daten unserer Versuche zeigten bei den Monozyten eine Heraufmodulation von CD86 (B7-2), einem Molekül der B-7 Familie, das für das zweite Signal der T-Zell-Aktivierung bei Antigenpräsentation über MHC-II von Bedeutung ist (Kapitel 4.11). Die Stimulation mit *Candida albicans* führte sowohl bei PBMOs als auch bei CBMOs zu seiner signifikanten Heraufmodulation, die sich zwischen den beiden Zellpopulationen nicht unterschied. CD14-positive Zellen trugen bereits vor der Stimulation etwa zur Hälfte CD86, was durch eine Simulation verdoppelt werden konnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Arbeiten, bei denen eine kombinierte MHC-II / CD86 Heraufmodulation im Mausmodell bei der Stimulation mit β -Glucan-Zellwandbestandteilen von *Candida albicans* gezeigt werden konnte (Inoue et al., 2009). Die Antigenpräsentation an T-Lymphozyten scheint sich also, zumindest in diesem Aspekt, bei den CBMOs nicht defizitär zu verhalten.

Da in der Sepsismodulation ebenfalls apoptotische Prozesse bei Lymphozyten bekannt sind (Hotchkiss & Karl, 2003), wurden auch in unserem Versuchsaufbau die Lymphozyten identifiziert (Kapitel 3.4.2) und einer Zellzyklusanalyse unterzogen. Den Lymphozyten aus adultem und neonatalem Blut konnte dabei sowohl nach 2 Stunden als auch nach 22 Stunden keine signifikante Apoptoseinduktion durch Kontakt mit *Candida albicans* nachgewiesen werden. Kontrollen und infizierte Ansätze zeigten nach 2 Stunden eine Grundapoptose von 2-4 % bzw. 6-8 % nach 22 Stunden. Es ist damit nicht von einem Apoptose-induzierenden Effekt durch die Stimulation mit *Candida* auszugehen. Ähnliche Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe auch bei der Stimulation mit *Escherichia coli*

gemacht, durch die ebenfalls keine Apoptoseinduktion bei Lymphozyten nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Gegensatz zu klinischen Daten aus Milzschnitten, die bei Sepsispatienten einen signifikanten Verlust von CD4-Lymphozyten zeigten (Hotchkiss et al., 2001). Solche organ-spezifischen Effekte sind in unserem In-Vitro-Modell nicht nachvollziehbar. Unter anderem könnten dabei denkbare abhängige Variablen der Zeitraum der Stimulation oder die nicht optimalen gegebenen Bedingungen für Lymphozyten sein. Im Vergleich zu unserem Versuchsaufbau unterschieden sich die betrachteten Zeiträume zum Teil erheblich. Ein weiteres mögliches Konzept wäre eine Fähigkeit der Pathogene die Lymphozytenapoptose in den hier untersuchten Zeitintervallen zu unterdrücken.

Kapitel 6

Methodische Limitationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterliegen verschiedener methodischer Limitationen, von denen im Folgenden einige exemplarisch beschrieben werden sollen. So sind trotz sorgfältiger Gewinnung der Blutproben etwaige Qualitätsunterschiede der Untersuchten Zellpopulationen auf Grund der geringen Fallzahlen nicht auszuschließen. Als Nabelschnurblutspender kamen nur reife, gesunde Neugeborene in Betracht bei denen es keinen Hinweis auf Infektionen gab. Genau wie bei den adulten, gesunden Spendern blieb eine gewisse Unsicherheit hinsichtlich eventuell vorliegender Infektionskrankheiten oder erworbener bzw. angeborener Immundefizienzen, was eine gewisse Heterogenität der Blutproben beider Gruppen mit sich brachte. Auch unterschieden sich, gerade bei dem Nabelschnurblut, die Zeitintervalle zwischen Geburt und Entnahme bzw. Entnahme und Aufarbeitung der Proben auf Grund organisatorischer Unwägbarkeiten im Kreißsaal teilweise erheblich. Aus diesem Grund wurden die Nabelschnurentnahmen auch von verschiedenen Personen - Hebammen, ärztlichem Personal, Studenten – durchgeführt, was ebenfalls Abweichungen bei der standardisierten Durchführung zur Folge hatte.

Die darauf folgende Aufarbeitung des Blutes mit Auftrennung der Zellpopulationen mittels Dichtegradienten, Spülschritten und Milieuveränderungen könnte ebenfalls verschiedene Effekte auf die Zellen haben. Obwohl möglichst schonend und mit etablierten Methoden vorgegangen wurde, ist auch hier eine Einflussnahme auf die Zellen und ein Abweichen von den physiologischen Bedingungen nicht auszuschließen.

Eine weitere Limitation bestand darin, dass durchflusszytometrisch nicht zwischen der tatsächlichen Phagozytose und der Bindung von *Candida* an die Monozyten unterschieden werden konnte. Zeigten Partikel in der FACS-Analyse ein CD14-Signal als Monozytenmarker und wiesen gleichzeitig eine Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des GFPs auf, wurde von Phagozytose ausgegangen. Ob sich das GFP-Signal aber innerhalb des Phagozyten oder außerhalb an die Zellwand bindend befand, konnte nicht festgestellt werden.

Auf Grund des exzessiven Hyphenwachstums von *Candida albicans* waren nur begrenzte Untersuchungszeiträume möglich, weil sonst die durchflusszytometrische Untersuchung technisch nicht mehr möglich gewesen wäre. Auch waren auf Grund der potentiellen Pathogenität die Analyse der Versuchsansätze immer erst nach Fixation, d.h. Abtöten und Arretierung der Zellen und Hefen in ihrem derzeitigen Zustand, möglich. Auch in diesem Falle wurde auf etablierte Methodik zurückgegriffen, welche einen Einfluss auf den Zustand der Zellen aber ebenfalls nicht ausschließen kann.

Zusammenfassend ist zu hinterfragen in welchem Ausmaß das In-vitro-Modell die komplexen In-vivo-Verhältnisse tatsächlich abbilden kann. Dass unser experimenteller Versuchsaufbau hier lediglich als vereinfachte Abbildung der Physiologie gesehen werden darf, muss bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Kenntnis genommen werden.

Kapitel 7

Ausblick

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die eingeschränkte Potenz des neonatalen Immunsystems, zumindest als ein Faktor, auf einem verminderten phagozytose-induzierten Zelltod der Phagozyten beruht. Die von unserer Arbeitsgruppe verfolgte Hypothese besagt, dass Monozyten, die trotz Pathogenkontakt dem programmierten Zelltod entgehen, durch fortbestehende Sekretion von Entzündungsmodulatoren zur Aufrechterhaltung des septischen Geschehens beitragen und damit ihren Teil an der fatal verlaufenden überschießenden immunologischen Reaktion haben. Um diesen Ansatz nun zukünftig weiter zu verfolgen, bietet sich eine Vielzahl von Ansatzpunkten, die an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anknüpfen könnten. Einige Beispiele sollen hier als Ausblick auf weitere Arbeiten genannt werden:

Zytokine. Als weiterer Schwerpunkt bietet sich im Rahmen des beschriebenen Sepsismodells die Untersuchung der Zytokinproduktion und -sekretion an. Wie unterscheidet sie sich im Falle einer Stimulation mit *Candida albicans* zwischen PBMOs und CBMOs? Zur Unterscheidung einer möglicherweise bestehenden defizitären Produktion im Vergleich mit einer möglicherweise defizitären Sekretion wären hierbei sowohl ELISA-Assays des Überstandes als auch intrazelluläre Färbungen denkbar. Im Hinblick auf die ebenfalls beobachteten Unterschiede bei der TLR2-Präsentation, wäre hierbei vor allem die Untersuchung von TNF-alpha, IL-1 β , IL-6 und IL-8 hervorzuheben (Sadeghi et al., 2007).

TLR2. Wie bereits in Kapitel 5 beschrieben, ist ein mechanistischer Zusammenhang zwischen verminderter TLR2-Präsentation und niedrigerem phagozytose-induziertem Zelltod zu vermuten. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, bieten sich weitere Apoptose-Readouts, etwa mit dem TLR2-Agonisten Pam3Cys, und Rezeptorblockierungs-Studien, z.B. mit selektiv TLR2-blockierenden Antikörpern an. Im weiteren Verlauf des Signalwegs wäre die Untersuchung des MyD88-Signalwegs und der Caspase-8-Aktivität inter-

essant. Darüber hinaus könnten hier auch Versuchsaufbauten mit einem TLR2-Knockout-Tiermodell vielversprechend sein.

Weitere PRRs. In dieser Arbeit wurden die Monozyten lediglich phänotypisch hinsichtlich TLR2 und TLR4 untersucht. Wie in Tabelle 1.1. gezeigt, sind aber noch eine große Zahl weiterer Pattern Recognition Receptors (PRRs) bekannt, die für die Erkennung von *Candida albicans* von Bedeutung sind. Auch hier bieten sich weiterführende vergleichende Untersuchungen in Form von Oberflächenphänotypisierungen oder Blockierungsstudien an.

Bindung vs. Phagozytose. Die Arbeit konnte, wie bereits oben beschrieben, keine Differenzierung zwischen gebundenen und phagozytierten, also wirklich innerhalb der Zelle befindlicher Partikel, bieten. Bezüglich dessen werden in der Literatur einige vielversprechende Methoden beschrieben (Saresella et al., 1997), die auch in unserem Versuchsaufbau Aufschluss über die Interaktion von Candida-Hyphen und neonatalem bzw. adultem Monozyt geben könnten.

Killing Assays. Eine weitere mögliche Fokussierung wäre die Untersuchung der Effektivität der Elimination des Pathogens durch die Phagozyten. Eine unterschiedlich effektive Inaktivierung oder Abtötung des Pathogens durch neonale und adulte Monozyten könnte ebenfalls großen Einfluss auf den Erfolg bzw. Perpetuation der Immunreaktion haben. Nach Zusammenbringen von Zellen und Hefen über einen definierten Zeitraum könnte eine anschließende Kultivierung und Quantifizierung der überlebenden Organismen statt finden.

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Bei den Erkrankungen des Neugeborenen ist neben bakteriellen Infektionen *Candida albicans* eine häufige Ursache für Septitiden. Durch Phagozytose von Bakterien wird bei Monozyten Apoptose (phagozytose-induzierter Zelltod, PICD) ausgelöst. Bei identischer Phagozytoserate von *E. coli* und *Streptokokken* zeigen neonatale Monozyten (CBMO) deutlich weniger PICD als Monozyten von Erwachsenen (PBMO). **HYPOTHESE:** Phagozytose von *Candida albicans* induziert ebenfalls PICD von Monozyten. Vergleichbar zu bakteriellen Infektionen verhalten sich CBMO bei Candida-Infektion ähnlich unempfindlich. PBMO und CBMO unterscheiden sich in ihrer TLR2- und TLR4-Modulation, die wichtig für die Pathogenerkennung sind. **METHODIK:** Mononukleäre Zellen wurden isoliert, phänotypisiert und mit einem GFP-exprimierenden *C. albicans*-Stamm infiziert. Die Kinetik von Phagozytose- und Apoptoseraten in Zellkultur wurden durch Nachweis von hypodiploider DNA (Nicoetti) ermittelt. Expression von TLR2, TLR4, CD86, CD14 wurde mittels Antikörper-Färbungen quantifiziert. Positivkontrollen wurden durchgeführt (TLR2: 5 µg/ml Pam3Cys; TLR4: 10 ng/ml LPS). **ERGEBNISSE:** Bei identischer Phagozytoserate von PBMO und CBMO (70,46 ± 5,03 % bzw. 66,27 ± 7,88 %) fand zwei Stunden post infectionem bei PBMO ein deutlicherer PICD als bei CBMO statt (13,91 ± 3,53 % vs. 6,5 ± 1,71 %; p < 0,05). Nach Infektion fand nach 2 Stunden eine identische Heraufmodulation des ko-stimulatorischen Rezeptors CD86 statt. Bei identischer Grundexpression (1,13 ± 0,28 % bzw. 0,93 ± 0,35 %), wurde TLR2 auf PBMO nach Stimulation mit *C. albicans* signifikant höher exprimiert als bei CBMO (18,42 ± 8,45 % vs. 7,71 ± 3,16 %; p < 0,005). Bei einer Positivkontrolle mit Pam3Cys wurde TLR2 bei PBMO und CBMO in identischem Maße heraufmoduliert (37,59 ± 18,72 % bzw. 34,15 ± 11,86 %). PBMO und CBMO zeigten bei TLR4 sowohl eine identische Grundexpression (82,84 ± 5,1 % bzw. 68,88 ± 21,55 %), als auch eine identische Heruntermodulation durch *C. albicans* (46,68 ± 17,63 % bzw. 57,26 ± 15,45 %). **KONKLUSION:** Trotz identischer Phagozytoserate reagieren CBMO im Vergleich zu PBMO auf Infektion mit *C. albicans* mit einem erniedrigten PICD und einer geringeren TLR2-Expression. Nicht-apoptotische Monozyten könnten zur Perpetuation der Sepsis und zu Organkomplikationen beitragen.

Literaturverzeichnis

- [Abbas et al. 2000] ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; POBER, J. S.: *Cellular and Molecular Immunology*. Fourth Edition. Saunders, 2000
- [Albert 2004] ALBERT, M. L.: Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? In: *Nat Rev Immunol* 4 (2004), Mar, Nr. 3, S. 223–231
- [Aliprantis et al. 2000] ALIPRANTIS, A. O. ; YANG, R. B. ; WEISS, D. S. ; GODOWSKI, P. ; ZYCHLINSKY, A.: The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. In: *The EMBO journal* 19 (2000), Jul, Nr. 13, S. 3325–3336. – ISSN 0261-4189
- [Barrenschee et al. 2010] BARRENSCHEE, M. ; LEX, D. ; UHLIG, S.: Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs. In: *PLoS One* 5 (2010), Nr. 11, S. e13889
- [Benjamin et al. 2010] BENJAMIN, D. K. ; STOLL, B. J. ; GANTZ, M. G. ; WALSH, M. C. ; SÁNCHEZ, P. J. ; DAS, A. ; SHANKARAN, S. ; HIGGINS, R. D. ; AUTEN, K. J. ; MILLER, N. A. ; WALSH, T. J. ; LAPTOOK, A. R. ; CARLO, W. A. ; KENNEDY, K. A. ; FINER, N. N. ; DUARA, S. ; SCHIBLER, K. ; CHAPMAN, R. L. ; VAN MEURS, K. P. ; FRANTZ, I. D. ; PHELPS, D. L. ; POINDEXTER, B. B. ; BELL, E. F. ; O’SHEA, T. M. ; WATTERBERG, K. L. ; GOLDBERG, R. N. ; EUNICE KENNEDY SHRIVER NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH AND HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH NETWORK: Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. In: *Pediatrics* 126 (2010), Oct, Nr. 4, S. 865–873
- [Berman & Sudbery 2002] BERMAN, J. ; SUDBERY, P. E.: Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. In: *Nat Rev Genet* 3 (2002), Dec, Nr. 12, S. 918–930
- [Bøyum 1976] BØYUM, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. In: *Scand J Immunol Suppl* 5 (1976), Jun, S. 9–15

- [Cerella et al. 2009] CERELLA, C. ; SCHERER, C. ; CRISTOFANON, S. ; HENRY, E. ; ANWAR, A. ; BUSCH, C. ; MONTENARH, M. ; DICATO, M. ; JACOB, C. ; DIEDERICH, M.: Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4). In: *Apoptosis* 14 (2009), May, S. 641–654
- [Cheng et al. 2006] CHENG, G. ; YEATER, K. M. ; HOYER, L. L.: Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. In: *Eukaryot Cell* 5 (2006), Jan, Nr. 1, S. 180–191
- [Currie et al. 2011] CURRIE, A. J. ; CURTIS, S. ; STRUNK, T. ; RILEY, K. ; LIYANAGE, K. ; PRESCOTT, S. ; DOHERTY, D. ; SIMMER, K. ; RICHMOND, P. ; BURGNER, D.: Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. In: *Infect Immun* 79 (2011), Apr, Nr. 4, S. 1588–1596
- [Dabas & Morschhäuser 2007] DABAS, N. ; MORSCHHÄUSER, J.: Control of ammonium permease expression and filamentous growth by the GATA transcription factors GLN3 and GAT1 in *Candida albicans*. In: *Eukaryot Cell* 6 (2007), May, Nr. 5, S. 875–888
- [Dreschers et al. 2013] DRESCHERS, S. ; GILLE, C. ; HAAS, M. ; GROSSE-OPHOFF, J. ; SCHNEIDER, M. ; LEIBER, A. ; BÜHRING, H. J. ; ORLIKOWSKY, T. W.: Infection-induced bystander-apoptosis of monocytes is TNF-alpha-mediated. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 1
- [Faust et al. 2011] FAUST, K. ; GÖPEL, W. ; HERTING, E. ; HÄRTEL, C.: Sepsis bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht. In: *Chemotherapie Journal* 20 (2011), Nr. 1, S. 1–8
- [Gille et al. 2008] GILLE, C. ; LEIBER, A. ; SPRING, B. ; KEMPF, V. A. ; LOEFFLER, J. ; POETS, C. F. ; ORLIKOWSKY, T. W.: Diminished phagocytosis-induced cell death (PICD) in neonatal monocytes upon infection with *Escherichia coli*. In: *Pediatr Res* 63 (2008), Jan, Nr. 1, S. 33–38
- [Gille et al. 2009a] GILLE, C. ; STEFFEN, F. ; LAUBER, K. ; KEPPELER, H. ; LEIBER, A. ; SPRING, B. ; POETS, C. F. ; ORLIKOWSKY, T. W.: Clearance of apoptotic neutrophils is diminished in cord blood monocytes and does not lead to reduced IL-8 production. In: *Pediatr. Res.* 66 (2009), Nov, S. 507–512
- [Gille et al. 2009b] GILLE, C. h. ; LEIBER, A. ; MUNDLE, I. ; SPRING, B. ; ABELE, H. ; SPELLERBERG, B. ; HARTMANN, H. ; POETS, C. h. F. ; ORLIKOWSKY, T. W.: Phagocytosis and postphagocytic reaction of cord blood and adult blood monocyte after infection with green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli* and group B Streptococci. In: *Cytometry B Clin Cytom* 76 (2009), Jul, Nr. 4, S. 271–284

- [Goldstein et al. 2005] GOLDSTEIN, B. ; GIROIR, B. ; RANDOLPH, A. ; INTERNATIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON PEDIATRIC SEPSIS: International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. In: *Pediatr Crit Care Med* 6 (2005), Jan, Nr. 1, S. 2–8
- [Hof & Dörries 2009] HOF, H. ; DÖRRIES, R.: *Medizinische Mikrobiologie*. 4. Thieme, 2009
- [Hotchkiss & Karl 2003] HOTCHKISS, R. S. ; KARL, I. E.: The pathophysiology and treatment of sepsis. In: *N Engl J Med* 348 (2003), Jan, Nr. 2, S. 138–150
- [Hotchkiss et al. 2001] HOTCHKISS, R. S. ; TINSLEY, K. W. ; SWANSON, P. E. ; SCHMIEG, R. E. ; HUI, J. J. ; CHANG, K. C. ; OSBORNE, D. F. ; FREEMAN, B. D. ; COBB, J. P. ; BUCHMAN, T. G. ; KARL, I. E.: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. In: *J Immunol* 166 (2001), Jun, Nr. 11, S. 6952–6963
- [Inoue et al. 2009] INOUE, K. ; TAKANO, H. ; KOIKE, E. ; YANAGISAWA, R. ; ODA, T. ; TAMURA, H. ; ADACHI, Y. ; ISHIBASHI, K. ; OHNO, N.: Candida soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells. In: *Respir Res* 10 (2009), S. 68–68
- [Jacobsen et al. 2012] JACOBSEN, I. D. ; WILSON, D. ; WÄCHTLER, B. ; BRUNKE, S. ; NAGLIK, J. R. ; HUBE, B.: Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. In: *Expert Rev Anti Infect Ther* 10 (2012), Jan, Nr. 1, S. 85–93
- [Lavoie et al. 2010] LAVOIE, P. M. ; HUANG, Q. ; JOLETTE, E. ; WHALEN, M. ; NUYT, A. M. ; AUDIBERT, F. ; SPEERT, D. P. ; LACAZE-MASMONTEIL, T. ; SOUDEYNS, H. ; KOLLMANN, T. R.: Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. In: *J Infect Dis* 202 (2010), Dec, Nr. 11, S. 1754–1763
- [Mader et al. 2010] MADER, S. ; MERIALDI, M. ; KELLER, M.: *EU Benchmarking Report 2009/2010*. European Foundation for the Care of Newborn Infants. 2010
- [McFarland 1907] MCFARLAND, J.: The Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. In: *The Journal of the American Medical Association* (1907)
- [Murphy et al. 2009] MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M.: *Janeway Immunologie*. Spektrum, 2009

- [Netea & Maródi 2010] NETEA, M. G. ; MARÓDI, L.: Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. In: *Trends Immunol* 31 (2010), Sep, Nr. 9, S. 346–353
- [Netea et al. 2002] NETEA, M. G. ; VAN DER GRAAF, C. A. ; VONK, A. G. ; VERSCHUEREN, I. ; VAN DER MEER, J. W. ; KULLBERG, B. J.: The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. In: *J Infect Dis* 185 (2002), May, Nr. 10, S. 1483–1489
- [Nicoletti et al. 1991] NICOLETTI, I. ; MIGLIORATI, G. ; PAGLIACCI, M. C. ; GRIGNANI, F. ; RICCARDI, C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. In: *J Immunol Methods* 139 (1991), Jun, Nr. 2, S. 271–279
- [Nyugen et al. 2010] NYUGEN, J. ; AGRAWAL, S. ; GOLLAPUDI, S. ; GUPTA, S.: Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. In: *J Clin Immunol* 30 (2010), Nov, Nr. 6, S. 806–13
- [Pérez et al. 2010] PÉREZ, A. ; BELLÓN, J. M. ; GURBINDO, M. D. ; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.: Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. In: *Hum Immunol* 71 (2010), Feb, Nr. 2, S. 151–157
- [Romani 2011] ROMANI, L.: Immunity to fungal infections. In: *Nat Rev Immunol* 11 (2011), Apr, Nr. 4, S. 275–288
- [Sadeghi et al. 2007] SADEGHI, K. ; BERGER, A. ; LANGGARTNER, M. ; PRUSA, A. R. ; HAYDE, M. ; HERKNER, K. ; POLLAK, A. ; SPITTLER, A. ; FORSTER-WALDL, E.: Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. In: *J Infect Dis* 195 (2007), Jan, Nr. 2, S. 296–302
- [Saresella et al. 1997] SARESELLA, M. ; RODA, K. ; SPECIALE, L. ; TARAMELLI, D. ; MENDOZZI, E. ; GUERINI, F. ; FERRANTE, P.: A rapid evaluation of phagocytosis and killing of *Candida albicans* by CD13+ leukocytes. In: *J Immunol Methods* 210 (1997), Dec, Nr. 2, S. 227–234
- [Schroder et al. 2004] SCHRODER, K. ; HERTZOG, P. J. ; RAVASI, T. ; HUME, D. A.: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In: *Journal of leukocyte biology* 75 (2004), Feb, Nr. 2, S. 163–189. – ISSN 0741-5400

- [Stearns-Kurosawa et al. 2011] STEARNS-KUROSAWA, D. J. ; OSUCHOWSKI, M. F. ; VALENTINE, C. ; KUROSAWA, S. ; REMICK, D. G.: The pathogenesis of sepsis. In: *Annu Rev Pathol* 6 (2011), Feb, S. 19–48
- [Stoll et al. 2002] STOLL, B. J. ; HANSEN, N. ; FANAROFF, A. A. ; WRIGHT, L. L. ; CARLO, W. A. ; EHRENKRANZ, R. A. ; LEMONS, J. A. ; DONOVAN, E. F. ; STARK, A. R. ; TYSON, J. E. ; OH, W. ; BAUER, C. R. ; KORONES, S. B. ; SHANKARAN, S. ; LAPTOOK, A. R. ; STEVENSON, D. K. ; PAPILE, L. A. ; POOLE, W. K.: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. In: *Pediatrics* 110 (2002), Aug, Nr. 2 Pt 1, S. 285–291
- [Stutz et al. 2009] STUTZ, A. ; GOLENBOCK, D. T. ; LATZ, E.: Inflammasomes: too big to miss. In: *J Clin Invest* 119 (2009), Dec, Nr. 12, S. 3502–3511
- [Tarry et al. 2005] TARRY, W. ; FISHER, M. ; SHEN, S. ; MAWHINNEY, M.: *Candida albicans*: the estrogen target for vaginal colonization. In: *J Surg Res* 129 (2005), Dec, Nr. 2, S. 278–282
- [Toossi et al. 2011] TOOSI, Z. ; WU, M. ; ROJAS, R. ; KALSDORF, B. ; AUNG, H. ; HIRSCH, C. S. ; WALRATH, J. ; WOLBINK, A. ; HAM, M. van ; SILVER, R. F.: Induction of Serine Protease Inhibitor 9 by Mycobacterium tuberculosis Inhibits Apoptosis and Promotes Survival of Infected Macrophages. In: *J Infect Dis* (2011), Nov
- [Tortora et al. 2010] TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L.: *Microbiology - An Introduction*. Bd. 10. Pearson International, 2010
- [van de Veerdonk et al. 2011] VEERDONK, F. L. van de ; JOOSTEN, L. A. ; SHAW, P. J. ; SMEEKENS, S. P. ; MALIREDDI, R. K. ; MEER, J. W. van der ; KULLBERG, B. J. ; NETEA, M. G. ; KANNEGANTI, T. D.: The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. In: *Eur J Immunol* 41 (2011), Aug, Nr. 8, S. 2260–2268
- [Viemann et al. 2005] VIEMANN, D. ; DUBBEL, G. ; SCHLEIFENBAUM, S. ; HARMS, E. ; SORG, C. ; ROTH, J.: Expression of toll-like receptors in neonatal sepsis. In: *Pediatr Res* 58 (2005), Oct, Nr. 4, S. 654–659
- [Webster et al. 2010] WEBSTER, S. J. ; DAIGNEAULT, M. ; BEWLEY, M. A. ; PRESTON, J. A. ; MARRIOTT, H. M. ; WALMSLEY, S. R. ; READ, R. C. ; WHYTE, M. K. ; DOCKRELL, D. H.: Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. In: *J Immunol* 185 (2010), Sep, Nr. 5, S. 2968–2979

- [Yerkovich et al. 2007] YERKOVICH, S. T. ; WIKSTRÖM, M. E. ; SURIYAARACHCHI, D. ; PRESCOTT, S. L. ; UPHAM, J. W. ; HOLT, P. G.: Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. In: *Pediatr Res* 62 (2007), Nov, Nr. 5, S. 547–552
- [Zähringer et al. 2008] ZÄHRINGER, U. ; LINDNER, B. ; INAMURA, S. ; HEINE, H. ; ALEXANDER, C.: TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. In: *Immunobiology* 213 (2008), Nr. 3-4, S. 205–24
- [Ziegler-Heitbrock 2000] ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.: Definition of human blood monocytes. In: *J Leukoc Biol* 67 (2000), May, Nr. 5, S. 603–606

Anhang

- Patientenaufklärung (Seite 1)
- Patientenaufklärung (Seite 2)
- Einwilligungserklärung (Seite 1)
- Einwilligungserklärung (Seite 2)



Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie

Leitung:

**Prof. Dr. T. Orlikowsky
Dr. rer.nat. S. Dreschers
Tel.: 0241 80 89380
FAX: 0241 80 82437**

Patienteninformation zur Vorbereitung der mündlichen Aufklärung

Untersuchungen zur Immunabwehr des Neugeborenen

(Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Monozyten-Subpopulationen aus Nabelschnur und peripherem Blut von gesunden Erwachsenen)

Sehr geehrte Patientin,

wir wenden uns heute mit einer besonderen Bitte an Sie. Wir bitten Sie, an einer Untersuchung über mögliche Einflüsse der Schwangerschaft auf die Aktivierung von Abwehrzellen im Immunsystem von Früh- und Neugeborenen teilzunehmen.

Das Immunsystem von neu- und besonders von frühgeborenen Kindern weist im Vergleich zum Erwachsenen wesentliche, aber nur unzureichend bekannte Unterschiede auf. Eine wichtige Folge davon ist ein erhöhtes Infektionsrisiko von Neu- und besonders Frühgeborenen. Als eine Ursache kann eine unzureichende Aktivierungsfähigkeit einer bestimmten Abwehrzelle (Makrophage) angesehen werden.

Das Ziel unserer Studie ist es, den Einflußgrößen auf die Immunreaktion und Abwehrzellen des Kindes besser zu verstehen. Ein besseres Verständnis der Aktivierung dieser Abwehrzellen bildet eine wichtige Grundlage einer gegebenenfalls gezielten Unterstützung des kindlichen Immunsystems.

Konkret benötigen wir für unsere Untersuchung insgesamt maximal 30 Milliliter Blut (zum Vergleich: ungefähr das Volumen von einem Espresso) aus der Nabelschnur. Da die Abnahme nach der Abnabelung erfolgt, und da die Nabelschnur ohnehin entsorgt wird, besteht weder für Sie noch Ihr Kind eine zusätzliche Belastung oder ein Risiko. Um die Untersuchungen weiter interpretieren zu können, möchten wir auch Ergebnisse aus Routine-Blutuntersuchungen mit unseren Daten abgleichen können. Auch hier besteht für Sie keine weitere Belastung oder ein Risiko.

Die Daten werden anonymisiert und unter Berücksichtigung des Datenschutzes ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken benutzt. Nach der Untersuchung werden die Proben vernichtet.

Die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben bzw. der -Studie ist ganz und gar freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus irgendwelche Nachteile entstehen.



Prof. Dr. Th. Orlikowski
Leiter Sektion Neonatologie



Dr. rer. nat. S. Drescher
Leiter Immunologisches Labor

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie

Leitung:

Prof. Dr. T. Orlikowsky
Dr. rer.nat. S. Drechsers
Tel.: 0241 80 89380
FAX: 0241 80 82437

Einwilligungserklärung

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Monozyten-Subpopulationen aus Nabelschnur und peripherem Blut von Erwachsenen

Anonymisierte Sammlung und Untersuchung von Blut zur Erforschung von Funktion und Entwicklung bestimmter Immunzellen (Monozyten) aus Nabelschnurblut

Ich bestätige hiermit, dass ich durch den behandelnden Arzt, Herrn/Frau Dr. Orlikowsky..... mündlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der beabsichtigten klinischen Prüfung aufgeklärt wurde und für meine Entscheidung genügend Bedenkzeit hatte.

Ich habe die Patienteninformation gelesen, ich fühle mich ausreichend informiert und habe verstanden, worum es geht. Mein Arzt hat mir ausreichend Gelegenheit gegeben, Fragen zu stellen, die alle für mich ausreichend beantwortet wurden. Ich hatte genügend Zeit mich zu entscheiden.

Ich habe weiterhin verstanden, dass bei wissenschaftlichen Forschungsvorhaben persönliche Daten und medizinische Befunde erhoben werden. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der Studie meine freiwillige Einwilligung voraus. Ich habe verstanden, dass nach Abschluss der Probensammlung keine personenbezogenen Daten gespeichert werden.

Ich habe / wir haben eine Kopie der Patienteninformation und dieser unterschriebenen Einwilligungserklärung erhalten.

Aachen, den _____, _____ Uhr

Unterschrift der Patientin / Proband(in)

Ich habe die Eltern des Patienten / den Patienten über Wesen, Bedeutung, Reichweite und Risiken des Forschungsvorhabens mündlich aufgeklärt.

Aachen, den _____, _____ Uhr

Unterschrift des aufklärenden/ behandelnden Arztes

Posterpublikationen

Saupp P., Dreschers S., Haas M., Große-Ophoff J., Morschhäuser J., Orlikowsky T.: Phagozytose-induzierter Zelltod (PICD) von Monozyten nach Infektion mit *Candida albicans*. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI). Mannheim, 19.-21.04.2012.

Saupp P., Haas M., Große-Ophoff J., Morschhäuser J., Orlikowsky T.: Periphagozytäre Reaktionen von Monozyten nach Infektion mit *Candida albicans*. Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI). 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI). Hamburg, 12.-16.09.2012

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie, unter der Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Thorsten Orlikowsky erstellt. Ich möchte mich ganz herzlich bei den nachfolgenden Personen für Rat und Unterstützung bedanken, die damit großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten:

Herrn Univ.-Prof. Dr. Thorsten Orlikowsky danke ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas der Dissertation, der ständigen Begleitung, Anregung und Diskussion. Ich bedanke mich für die Einführung in die experimentelle pädiatrische Forschung, die überspringende Begeisterung für die Thematik und das Vertrauen in meine Arbeiten.

Herrn Dr. rer. nat. Stephan Dreschers danke ich für die exzellente Betreuung, Einführung in die Methodik, intensive Begleitung jeder Phase der Arbeit, Diskussion, Korrektur und Hilfe in allen Lebenslagen. Danke für die Geduld, den Humor und den nicht selbstverständlichen kollegialen Umgang. Ohne deine Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ich danke dir!

Ganz herzlich Bedanke ich mich auch bei allen Müttern, die ihr Einverständnis zur Nabelschnurblutspende gaben und den Hebammen des Universitätsklinikums Aachen, die mich unkompliziert unterstützten und sich von dem Studenten im Kreißsaal nicht aus der Ruhe bringen ließen.

Andrea Prehn danke ich für die Einführung in die Methodik und Kultur von *Candida albicans*. Ihre unkomplizierte Art und Begeisterung hatten großen Einfluss auf das Gelingen der Experimente.

Frau Dr. rer. nat. Angela Schippers im Speziellen sowie sämtlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Wagner, Tenbrock und Orlikowsky danke ich für die immerwährende Unterstützung bei organisatorischen, experimentellen und emotionalen Unwägbarkeiten. Vielen

Dank für freundschaftliche Atmosphäre und die tolle Zeit!

Herrn Prof. Dr. Joachim Morschhäuser danke ich für die freundliche Überlassung der *Candida albicans* Stämme SC5314 und SCADH1G4A.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Dott danke ich für die Bereitstellung von Gerätschaften und Laborräumen für die Durchführung der Experimente mit *Candida albicans* im Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Uniklinikums Aachen.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern danken, die mir alles und insbesondere das Studium der Medizin ermöglichten und mich stets bei allem, was ich tue, unterstützen.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer, *Univ.-Prof. Dr. Thorsten Orlikowsky*, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie, des Universitätsklinikums Aachen, hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Herr Jakob Peter Saupp** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Verminderter phagozytose-induzierter Zelltod neonataler Monozyten im In-vitro-Sepsismodell mit *Candida albicans*“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe: Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, sowie deren statistische Auswertung.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

A. Dr. rer. nat. Stephan Dreschers: Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, den FACS-Analysen, Einarbeitung und Anleitung in sämtliche experimentelle Methodik, Zellkultur und Datenauswertung sowie Korrektur der Dissertation.

B. Hebammen des Univeristätsklinikums Aachen: Unterstützung im Kreißsaal bei der Akquirierung von Nabelschnurblut.

C. Andrea Prehn: Einarbeitung und Unterstützung in der Methodik und Zellkultur von *Candida albicans*.

D. Dr. rer. nat. Angela Schippers und sämtliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Wagner, Tenbrock und Orlikowsky: Unterstützung bei organisatorischen Problemen und Diskussion von Ergebnissen.

E. Prof. Dr. Joachim Morschhäuser: Freundliche Überlassung der *Candida albicans* Stämme SC5314 und SCADH1G4A.

F. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Dott: Unterstützung sowie Bereitstellung von Gerätschaften und Laborräumen für die Durchführung der Experimente mit *Candida albicans*.

G. Univ.-Prof. Dr. Thorsten Orlikowsky: Studiendesign und –überwachung, regelmäßige Ergebnisdiskussion, Betreuung und Korrektur der Dissertation.

Jakob Peter Saupp

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Jakob Peter Saupp

Univ.-Prof. Dr. med. Thorsten Orlikowsky