

Aus dem  
**Institut für Immunologie**  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Leiter: Prof. Dr. Stefan Bauer

**Die Wirkung von  
Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) auf  
*Listeria monocytogenes* und seine Funktion im Rahmen einer  
Listerieninfektion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)



Dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Eva-Maria Wittmann**, geb. Herold  
aus Fürth

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg am 09.12.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Markus Schnare

1. Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Steinhoff

*Das außergewöhnliche geschieht nicht auf glattem gewöhnlichem Wege.*

Goethe

---

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)</b>	<b>1</b>
1.1.1. Proteinfamilie, Struktur und Funktion	1
1.1.2. BPI und gramnegative Bakterien	3
1.1.3. Expression, Lokalisation und Regulation von BPI	4
<b>1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>- ein grampositives Bakterium</b>	<b>5</b>
1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften	5
1.2.2. Intrazellulärer Infektionszyklus von <i>L.m.</i>	5
1.2.3. Invasion der Wirtszelle	6
1.2.4. Zielzellen im Darm	8
<b>1.3. Immunantwort während einer Listerieninfektion</b>	<b>9</b>
1.3.1. Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	9
1.3.2. Reaktion der angeborenen Immunität bei Abwehr einer Listerieninfektion	11
<b>1.4. Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2. METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung</b>	<b>14</b>
<b>2.2. <i>In vivo</i> Infektion</b>	<b>14</b>
2.2.1. Blutentnahme zur Serumgewinnung	14
2.2.2. Bestimmung der Keimlast in den Organen	15
2.2.3. Milzzellpräparation	15
2.2.4. Analyse der mRNA-Expression aus Darmgewebe	15
<b>2.3. Gewinnung primärer Zellen</b>	<b>18</b>
2.3.1. Zellzählung	18
2.3.2. Präparation von Knochenmarkszellen	19
2.3.3. Differenzierung von myeloiden, dendritischen Zellen (mDCs)	19
2.3.4. Differenzierung von Makrophagen	19
2.3.5. Gewinnung von Peritonealgranulozyten (pGr)	20
2.3.6. Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten (nGr)	20
2.3.7. Histologie der aufgereinigten nGr	21
<b>2.4. Durchflusszytometrie (FACS)</b>	<b>21</b>
2.4.1. Reinheit von mDCs, Makrophagen und nGr	22
2.4.2. Analyse der Zellpopulationen der Milz	23

---

2.4.3.	Analyse reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in nGr	23
<b>2.5.</b>	<b>Stimulation und Infektion primärer Zellen <i>in vitro</i></b>	<b>25</b>
2.5.1.	Stimulation <i>in vitro</i>	25
2.5.2.	Gentamicin-Schutz-Test	25
2.5.3.	Infektion der nGr mit Fluoreszenz gekoppelten Listerien	26
<b>2.6.</b>	<b>Analyse von Zytokinen</b>	<b>28</b>
2.6.1.	Interleukin (IL)-6 ELISA	28
2.6.2.	TNF- ELISA	29
<b>2.7.</b>	<b>Bakterien</b>	<b>29</b>
2.7.1.	Bakterienzahlbestimmung	29
2.7.2.	UV-Inaktivierung von Bakterien	30
2.7.3.	Antimikrobielle Aktivität gegenüber <i>L.m.</i>	30
2.7.4.	Fluoreszenzmikroskopie: Interaktion hBPI mit CFSE-Listerien	30
<b>2.8.</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>32</b>
3.1.	Puffer	32
3.2.	Kits	32
3.3.	Chemikalien	33
3.4.	Materialien	34
3.5.	Geräte	35
3.6.	Software	36
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
4.1.	<b>Humanes BPI und Listerien</b>	<b>37</b>
4.1.1.	Humane nGr reagieren auf <i>L.m.</i> -Stimulation mit BPI-Expression	37
4.1.2.	Humanes BPI interagiert mit Listerien	38
4.1.3.	Effektivität der CFSE-Markierung und Einfluss auf die Vitalität	39
4.2.	<b>Die antimikrobielle Wirkung von humanem BPI gegen Listerien</b>	<b>41</b>
4.3.	<b>Die Rolle von murinem BPI im Listeriose Modell</b>	<b>42</b>
4.3.1.	Induktion der Expression von BPI RNA im Darm infizierter Mäuse	42
4.3.2.	Bakterienlast in Leber, Milz und Dünndarm nach intragastraler Infektion	43
4.4.	<b>Die Funktion vom BPI im Listeriose Modell nach intravenöser Infektion</b>	<b>45</b>
4.4.1.	Bakterienlast in verschiedenen Organen nach intravenöser Infektion	45

---

4.4.2.	TNF- und IL-6 Expression im Serum infizierter Mäuse	47
4.4.3.	Analyse der einzelnen Zellpopulationen der Milz im Listeriose Modell	48
<b>4.5.</b>	<b>Übertragung der <i>in vivo</i> Infektion auf <i>in vitro</i> Modelle</b>	<b>51</b>
<b>4.6.</b>	<b>Stimulation von Milzzellen aus WT und BPI-/- Mäusen</b>	<b>51</b>
<b>4.7.</b>	<b><i>In vitro</i> Infektion von Makrophagen und DCs mit Listerien</b>	<b>52</b>
<b>4.8.</b>	<b>Die Rolle von nGr bei der Abwehr von Listerien</b>	<b>54</b>
4.8.1.	Histologische Untersuchung und Reinheit nach Aufreinigung von nGr	54
4.8.2.	Die Analyse von ROS in nGr mittels DCFH-DA Assay	56
4.8.3.	nGr aus BPI-/- Mäusen zeigen gesteigerte TNF-Sekretion	58
4.8.4.	<i>In vitro</i> Infektion von nGr mit lebenden <i>L.m.</i>	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>5.1.</b>	<b>Humanes BPI und Listerien</b>	<b>63</b>
<b>5.2.</b>	<b><i>in vivo</i> Infektion von WT und BPI-/- Mäusen mit Listerien</b>	<b>65</b>
5.2.1.	mRNA Expression von BPI im Darm	65
5.2.2.	Funktion von BPI im Infektionsmodell der murinen Listeriose	66
5.2.3.	Analyse der Milzzellpopulationen von WT -und BPI-/- Mäusen	67
<b>5.3.</b>	<b>Untersuchung der Funktion einzelner Immunzellen <i>in vitro</i></b>	<b>68</b>
5.3.1.	Milzzellen	68
5.3.2.	Makrophagen und DCs	68
<b>5.4.</b>	<b>Die Rolle von nGr</b>	<b>70</b>
5.4.1.	nGr Stimulation mit UV-inaktivierten Listerien	70
5.4.2.	nGr Infektion mit lebenden Listerien	71
<b>5.5.</b>	<b>Übertragung der <i>in vitro</i> Daten auf das <i>in vivo</i> Modell</b>	<b>72</b>
<b>5.6.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>

<b>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>11. PUBLIKATIONEN</b>	<b>88</b>
<b>12. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>89</b>
<b>13. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>90</b>
<b>14. DANKSAGUNG</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)

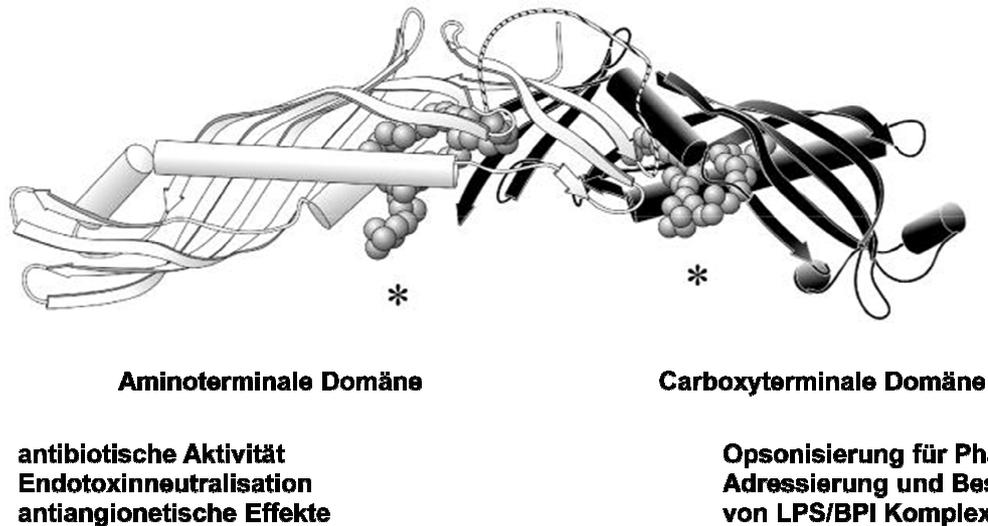
Antimikrobielle Proteine (AMP) sind wichtige Effektoren der angeborenen Immunantwort. BPI als AMP wurde erstmals 1975 von Weiss *et al.* aus den Granula humaner, polymorphnukleärer Leukozyten isoliert. In den folgenden Jahren konnten viele weitere Erkenntnisse über das Vorkommen, die Struktur und Funktion des Proteins und seine verschiedenen Wirkmechanismen gewonnen werden.

### 1.1.1. Proteinfamilie, Struktur und Funktion

BPI gehört zu der Familie der Lipidtransfer (LT)-Proteine, deren Mitglieder sich dadurch auszeichnen, verschiedene Lipidsubstrate binden zu können. Eine für das Immunsystem bedeutende Funktion haben dabei die Proteine, die das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) binden. Gelangt LPS durch gramnegative Bakterien in den Körper, sind unter anderem zwei Proteine maßgeblich für den weiteren Verlauf der Infektion: Zum einen BPI, zum anderen sein engster Verwandter, das LPS-bindende Protein (LBP). BPI besitzt die Fähigkeit LPS zu neutralisieren, so dass eine übersteigerte Immunantwort, verbunden mit der Gefahr eines septischen Schocks, verhindert werden kann. Sein engster Verwandter, das LBP, hingegen präsentiert gebundenes LPS über CD14 an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und führt somit zu einer Induktion der Immunantwort. Abgesehen von der Fähigkeit LPS zu binden und somit seine immunogene Wirkung zu blockieren, verfügt BPI über verschiedene weitere Funktionen, die in seiner Struktur begründet liegen (Weiss 2003).

BPI ist ein einkettiges, stark kationisches Protein mit einer Größe von circa 55 kD, bestehend aus 456 Aminosäuren (AS). Diese stellen sich dreidimensional in Form eines Bumerangs dar (Beamer, Carroll *et al.* 1997), wobei sich einzelne Funktionen von BPI deutlich dem N- oder C-terminalen Rest (AS 1-230 und 250-456) zuordnen lassen (Ooi, Weiss *et al.* 1991).

In der folgenden Abbildung ist die dreidimensionale Struktur des Proteins mit den zugehörigen Funktionen angegeben (Abbildung 1–1).



**Abbildung 1-1: Struktur und Funktion von BPI (modifiziert nach Schultz and Weiss 2007)**

BPI ist in der Lage, die Zellwand gramnegativer Bakterien durch Verdrängung zweiwertiger Kationen zu zerstören, da dadurch die reguläre Anordnung des LPS aufgelöst wird. Für *E. coli* wurde im Detail die Wirkung von BPI aufgeklärt. Als Folge der Membranruptur kommt es bei den Bakterien zunächst zu einem reversiblen Wachstumsstopp. Im Folgenden gelangt BPI auch an die innere, zytoplasmatische Membran (siehe Abbildung 1–2) und beeinflusst dort wichtige Stoffwechselprozesse der Bakterien. Dadurch wird das Wachstum der Bakterien irreversibel gestoppt (Mannion, Weiss et al. 1990, Wiese, Brandenburg et al. 1997).

Der N-terminale Teil von BPI ist für die Bindung des Lipid A-Teils von LPS verantwortlich (Wilde, Seilhamer et al. 1994). Werden die Bakterien von Immunzellen phagozytiert, wird die Lipid A-Region des bakteriellen Endotoxins schnell deacetyliert, wirkt also nicht mehr immunogen (Munford 2005). Lipid A bzw. LPS kann aber nicht nur in der Membran vitaler Bakterien vorliegen, sondern auch in sogenannten „Outer membrane vesicles“, die während des bakteriellen Wachstums konstitutiv gebildet werden (Beveridge 1999) oder in Restpartikeln abgestorbener Bakterien. Da diese Endotoxine bedeutend langsamer deacetyliert werden, übernimmt BPI die wichtige Rolle der Neutralisierung (Marra, Wilde et al. 1990). Gleichzeitig ist der C-terminale Teil in diesem Fall in der Lage, für den Transport der endotoxinhaltigen Partikel zu spezifischen Immunzellen zu sorgen. Diese Funktion übernimmt BPI auch bei intakten gramnegativen Bakterien, deren Phagozytose durch Opsonisierung verstärkt wird (Iovine, Elsbach et al. 1997). Die Verstärkung der Phagozytose wurde zudem auf eine Induktion des Komplementsystems durch BPI zurückgeführt. Die aus der Komplementkomponente C3 hervorgehenden Fragmente C3b/iC3b binden kovalent an

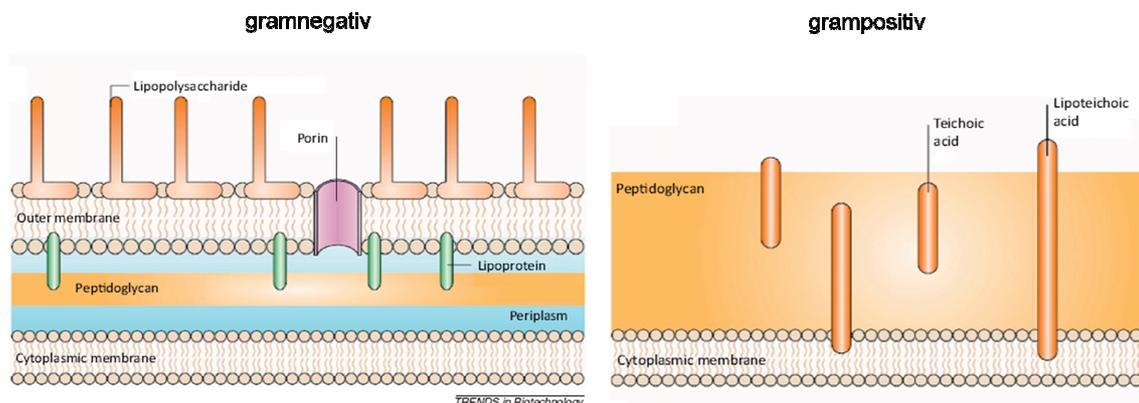
die Oberfläche von Bakterien und führen so über Komplementrezeptoren auf phagozytierenden Zellen zu einer verstärkten Aufnahme. Nishimura *et al.* konnten für hBPI und einen *E. coli*-Stamm nachweisen, dass BPI die Bindung von C3b/iC3b dosisabhängig induziert und so die Phagozytoseleistung humaner Neutrophiler verstärkt (Nishimura, Gogami et al. 2001).

Des Weiteren wurde im Jahr 2000 für den N-terminalen Teil von BPI eine anti-angiogenetische Wirkung beschrieben, die bisher allerdings lediglich für rekombinante Versionen des Proteins nachgewiesen ist (van der Schaft, Toebes et al. 2000).

### 1.1.2. BPI und gramnegative Bakterien

Für die folgende Arbeit bedeutend ist der Umstand, dass für BPI bisher lediglich eine Funktion gegenüber gramnegativen Bakterien (Elsbach 1994, Wittmann, Schönefeld et al. 2008) und *Toxoplasma gondii* (Khan, Lambert et al. 1999) nachgewiesen wurde, nicht aber gegenüber grampositiven Erregern.

Diese beiden Arten von Bakterien unterscheiden sich in erster Linie durch den Aufbau ihrer Zellwand, der in der Abbildung 1-2 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 1-2: Aufbau der Bakterienzellwand** (modifiziert nach Hajipour et al. 2012)

Gramnegative Bakterien besitzen außer ihrer zytoplasmatischen Membran noch zwei weitere Schichten, die durch den periplasmatischen Raum abgetrennt sind: Eine dünne Peptidoglykanschicht und eine äußere Membranschicht aus verschiedenen Proteinen, Phospholipiden und LPS. LPS ist für die negative Ladung der Zellmembran und für die strukturelle Integrität verantwortlich. Für BPI ist, wie oben erläutert, bekannt, dass es an den Lipid A-Teil des LPS bindet und so in diese Membranen eindringen kann.

Die Zellwand grampositiver Bakterien hingegen besteht aus einer dicken Schicht Peptidoglykan (PGN), in das Lipoteichon- und Teichonsäure sowie weitere Proteine eingelagert sind. Diese Zellwand enthält jedoch kein LPS (Hajipour, Fromm et al.

2012). Somit ist zum jetzigen Zeitpunkt völlig unklar, in welcher Form BPI auf grampositive Erreger wirken könnte.

### 1.1.3. Expression, Lokalisation und Regulation von BPI

Unter physiologischen Bedingungen ist das humane BPI im Knochenmark in Vorläuferzellen für neutrophile Granulozyten (nGr), in den azurophilen Granula ausdifferenzierter nGr, auf deren Zelloberfläche und in geringem Maße auch in Eosinophilen exprimiert. Auch mukosale Epithelien, die häufig in Kontakt mit Bakterien kommen und somit über effektive Abwehrmechanismen verfügen müssen, exprimieren BPI. So konnte funktionales hBPI in gesunden Menschen in Ösophagus und Kolon nachgewiesen werden (Canny, Levy et al. 2002).

Das murine Ortholog ist dahingegen unter physiologischen Bedingungen schwach in primären nGr und in lymphoiden Organen wie Knochenmark, Milz, Lymphknoten bzw. Thymus exprimiert. Eine deutliche Expression konnte in Hoden und Nebenhoden und nach Stimulation mit LPS auch in Thioglykolat-induzierten Peritoneal-Granulozyten detektiert werden (Eckert, Wittmann et al. 2006). Zudem konnte BPI in intestinalem Gewebe, insbesondere in Epithelzellen der Villi und Krypten nachgewiesen werden, wobei die Expression im distalen Teil des Darms abnimmt (Canny, Cario et al. 2006).

Im Moment sind für die Regulation von BPI in verschiedenen Zellen diverse Mechanismen bekannt. Zum Beispiel unterliegt die Regulation von humanem BPI In nGr anderen Mechanismen als die anderer Proteine in den azurophilen Granula. Dabei binden die Transkriptionsfaktoren AML-1, PU.1 und Sp3 in humanen myeloiden Zellen direkt an die Promotorregion des BPI, was zu einer transkriptionellen Aktivierung des Proteins führt (Lennartsson, Pieters et al. 2003). In murinen nGr ist bekannt, dass die mRNA-Expression von BPI durch TLR-Liganden induziert wird, wobei LPS als stärkster Stimulus fungiert. Dabei wird die Expression über einen MyD88-unabhängigen, aber TRIF-abhängigen Signalweg vermittelt (Eckert, Wittmann et al. 2006).

## 1.2. *Listeria monocytogenes*- ein grampositives Bakterium

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von BPI auf das grampositive Bakterium *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) untersucht.

### 1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften

*L.m.* ist ein stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes und auf Grund von Flagellen eigenbewegliches Bakterium. Da *L.m.* sehr geringe Ansprüche an seine Umgebung stellt, ist sein Vorkommen als ubiquitär zu bezeichnen. *L.m.* wurde im Verdauungstrakt vieler Tierarten, im Erdreich sowie auf diversen Lebensmitteln nachgewiesen (Vázquez-Boland, Domínguez-Bernal et al. 2001). Temperaturen zwischen 10°C und 25°C stellen den Optimalbereich für die Proliferation von *L.m.* dar, wobei verlangsamtes Wachstum auch noch bei 4°C möglich ist. Man geht zudem davon aus, dass zwei bis sechs Prozent der gesunden Bevölkerung als sogenannte Dauerausscheider *L.m.* mit dem Stuhl ausscheiden (Rocourt, Jacquet et al. 2000).

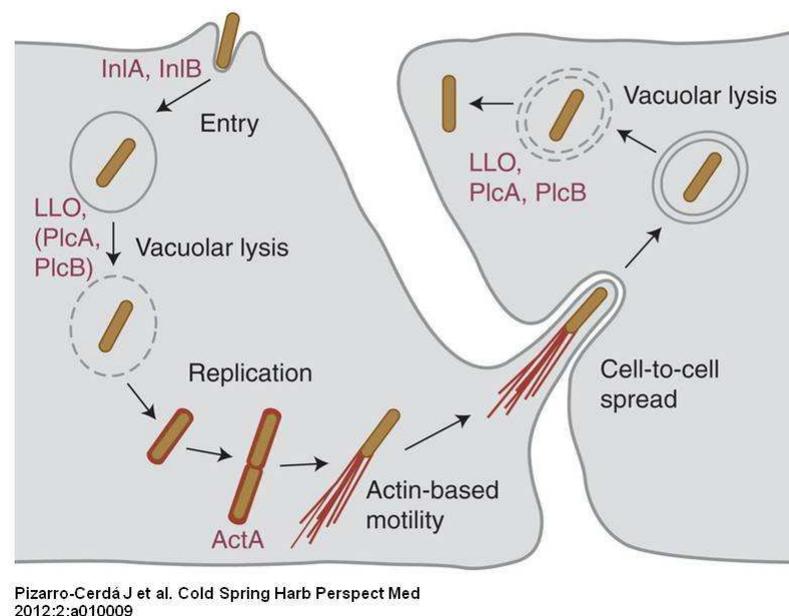
Darüber hinaus ist das Bakterium widerstandsfähig gegenüber saurem oder basischem Milieu, Trockenheit und hohen Salzkonzentrationen. Es ist in der Lage, auf vielen Oberflächen einen Biofilm zu bilden, allerdings unfähig zur Sporenbildung. Insbesondere die Verbreitung auf Lebensmitteln, hier vornehmlich Fleisch-/Fisch- und Käseprodukten (Gandhi and Chikindas 2007), ist als problematisch anzusehen, da *L.m.* bei Menschen über eine Infektion des Gastrointestinaltrakts Auslöser einer ernsthaften Erkrankung, der Listeriose, ist. Besonders gefährdet sind immungeschwächte Personen wie Menschen über 65, Kranke oder schwangere Frauen. Die Krankheit kann von einer Gastroenteritis bis zur Meningitis oder Enzephalitis verschiedenste Symptome zeigen. Bei schwangeren Frauen, die an einer Listeriose erkranken, ist *L.m.* zur Überquerung der Plazenta fähig, so dass es zu einer Infektion des Ungeborenen mit der Gefahr einer Tot-/Fehlgeburt oder einer Neugeborenen-Listeriose kommt. Die Inzidenz der Erkrankung lag für das Jahr 2012 bei 0,5 Erkrankungen/100 000 Einwohner, die Letalität bei 8% der Erkrankten und bei Neugeborenen-Listeriose erreichte die Lethalität 16% (Jahrbuch 2012, Robert-Koch Institut).

### 1.2.2. Intrazellulärer Infektionszyklus von *L.m.*

*L.m.* kann intrazellulär überleben und sich damit der humoralen Infektabwehr entziehen. Nach Infektion gibt es für *L.m.* generell zwei verschiedene Wege, um in eine Wirtszelle zu gelangen: Entweder durch Phagozytose, was nur für spezielle

Immunzellen möglich ist oder durch aktive Infektion. *L.m.* ist in der Lage, sowohl die epitheliale Barriere im Magen-Darm Trakt, die Blut-Hirn Schranke als auch die Plazentaschranke zu überwinden.

Über die Proteine Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB) heftet sich *L.m.* an die Wirtszelle und führt zur Endozytose. Ist *L.m.* von der Wirtszelle aufgenommen worden, befindet es sich in einem Phagosom. Um ins Zytosol der Zelle zu gelangen, ist es in der Lage, durch sezerniertes Listeriolysin O (LLO) und zwei Phospholipasen, genetisch codiert durch *PlcA* und *PlcB*, die Membran des Phagosoms zu zerstören. Im Anschluss wird durch das bakterielle Protein ActA die zelluläre Aktinpolymerisation induziert und Aktinfilamente in der Zelle gebündelt. *L.m.* nutzt die entstandenen Filamente zur Fortbewegung innerhalb des Zytosols und um in sogenannten Pseudopodien in benachbarte Zellen zu gelangen (Abbildung 1–3). Auf diese Art bewegt sich das Bakterium im Körper unentdeckt von Immunzellen (Pizarro-Cerdá, Kühbacher et al. 2012).



**Abbildung 1-3: Intrazellulärer Infektionszyklus von *L.m.* (Pizarro-Cerda et al., 2012)**

InIA: Internalin A; InIB: Internalin B; LLO:Listeriolysin O; PlcA: phosphatidylinositol spezifische PLC Phospholipase (PI-PLC) A; PlcB: Phospholipase B (PC-PLC)

### 1.2.3. Invasion der Wirtszelle

Die beiden entscheidenden Proteine von *L.m.* zur Invasion der Wirtszelle sind InIA und InIB. InIA interagiert mit epitheliale Cadherin (E-Cadherin). Bei E-Cadherin handelt es

sich um ein Protein, das für die Ausbildung von Adhäsionsverbindungen, sog. „adherens junctions“, an den Barrieren des Intestinaltrakts, der Blut-Hirn Schranke und der Plazenta beteiligt ist (Mengaud, Ohayon et al. 1996). Hier ist anzumerken, dass E-Cadherin speziesspezifisch ist. Die Aminosäure Prolin an Position 16 im humanen (und Meerschweinchen) E-Cadherin ist für die Interaktion notwendig. In Mäusen oder Ratten befindet sich Glutamat an Position 16, was eine Erkennung des E-Cadherin durch InlA verhindert, so dass Mäuse gegenüber einer Listeriose deutlich resistenter sind (Lecuit, Dramsi et al. 1999, Lecuit, Vandormael-Pournin et al. 2001). Experimentell konnte dieses Problem gelöst werden, indem transgene Mäuse mit einem humanisierten E-Cadherin generiert wurden (Lecuit, Vandormael-Pournin et al. 2001) oder eine Mutation in *L.m.* eingefügt wurde, die die Affinität zu murinem E-Cadherin deutlich erhöht (Wollert, Pasche et al. 2007).

Die Bindung von InlA an E-Cadherin führt in Kombination mit anderen Proteinen wie beispielsweise Myosin zu der Internalisierung des Bakteriums mittels Endozytose (Bonazzi and Cossart 2006).

Des Weiteren verfügen *L.m.* über Internalin B (InlB), für das verschiedene Wirtsmoleküle als potentielle Rezeptoren identifiziert wurden. Dabei gilt als entscheidendes Molekül der „Hepatocyte growth factor“ (HGF) Rezeptor Met (Shen, Naujokas et al. 2000). Das bakterielle InlB mimt HGF durch die Bindung seiner „Leucin rich repeats“ an Met (Braun, Nato et al. 1999). Auch in diesem Fall ist die Interaktion von InlB und Met speziesspezifisch. Wobei InlB mit humanem und murinem Met aber nicht mit dem aus Meerschwein oder Kaninchen interagiert (Khelef, Lecuit et al. 2006). Nach Bindung des InlB kommt es zu verschiedenen Veränderungen im Zytoskelett und zum Prozess der Endozytose der Zelle. Zum einen wird durch Dimerisierung des Met-Rezeptors dessen Phosphorylierung ausgelöst, die über Zwischenschritte zur Dissoziation des E-Cadherins vom Aktinzytoskelett führt. Es kommt zur Öffnung der „adherens junctions“, wodurch freies InlB schneller an Zelloberflächen gelangt und damit die weitere Dissoziation von „adherens junctions“ auslöst, wodurch wiederum E-Cadherin leichter zugänglich wird. Zum anderen wird die induzierte Signalkaskade durch Internalisierung des Rezeptors gestoppt, wobei die Internalisierung über Ubiquitinierung vermittelt wird, die letztlich zur Bildung Clathrin-bedeckter Vesikel führt und damit zur Endozytose (Bonazzi and Cossart 2006). Dadurch werden gebundene Bakterien mit in die Zielzelle aufgenommen.

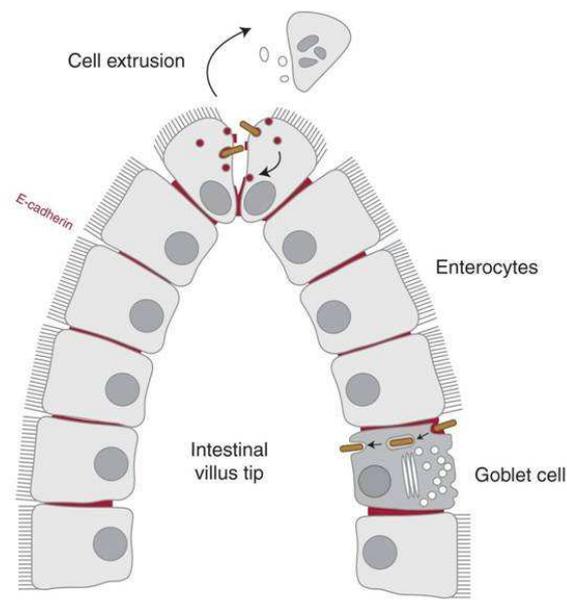
Am Endozytoseprozess von *L.m.* sind neben Clathrin und Myosinfilamenten eine Vielzahl anderer Proteine beteiligt. Dabei wurden in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Interaktionen zwischen der clathrinvermittelten Endozytose,

verschiedenen Phosphoinositolen und dem Aktinskelett der Zelle entschlüsselt. Es zeigt sich, dass der Invasionsprozess von *L.m.* sehr komplex und abhängig von der infizierten Zelle sehr variabel ausgeprägt ist (Pizarro-Cerdá, Kühbacher et al. 2012).

#### 1.2.4. Zielzellen im Darm

Im Dünndarm liegt E-Cadherin an der basolateralen Seite der Enterozyten oder der Becherzellen vor, und ist somit eigentlich für *L.m.* nicht zugänglich. Aber die Bakterien machen sich den stetigen Erneuerungsprozess der Darmzellen zunutze, indem sie im Bereich der Villi apikal exprimiertes E-Cadherin binden. Dieses findet sich an Enterozyten, die im Zuge der Zellerneuerung an der Spitze der Villi ausgestoßen werden oder an den Verbindungsstellen zu den Becherzellen liegen. Diese Zellen werden hauptsächlich von *L.m.* infiziert (Nikitas, Deschamps et al. 2011) (Abbildung 1-4). In Ratten konnte zudem die Infektion von M-Zellen in den Peyerschen Platten nachgewiesen werden (Corr, Hill et al. 2006).

In Zellen des Darmepithels nutzen die Bakterien die effektiven Transzytosemechanismen dieser Zellen und überqueren dadurch die intestinale Barriere. Auch im Caecum und Kolon des Dickdarms wurde dieser Prozess beobachtet (Nikitas, Deschamps et al. 2011).



**Abbildung 1-4: Überquerung der intestinalen Barriere durch *L.m.* (Pizarro-Cerda et al., 2012)**

Schematische Darstellung eines Darmvillus mit verschiedenen Zelltypen wie Enterozyten und Becherzellen (Goblet cells), in braun dargestellt *L.m.*

### 1.3. Immunantwort während einer Listerieninfektion

Bei einer intragastralen (i.g.) Infektion gelangen die Bakterien durch die intestinale Barriere (siehe oben) ins Blut und Lymphflüssigkeit. Dadurch verteilen sich die Bakterien rasch in Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten. Bei einer intravenösen (i.v.) Infektion (im Rahmen eines *in vivo* Modells in der Maus) erfolgt die direkte Verteilung der *L.m.* über das Blut in Milz und Leber. Letztlich ist die Immunantwort zur Kontrolle der Bakterien unabhängig vom Infektionsweg sehr ähnlich.

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort gegen *L.m.* spielen insbesondere Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen (DCs) und nGr eine entscheidende Rolle. In der Leber sind zusätzlich Hepatozyten und Kupffersche Sternzellen am immunologischen Abwehrprozess beteiligt.

Die adaptive Immunantwort gegen eine Listerieninfektion wird im Besonderen über zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Ladel, Fleisch et al. 1994).

#### 1.3.1. Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Für die Erkennung von *L.m.* durch das angeborene Immunsystem sind drei Gruppen von Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR) verantwortlich: membranständige und endosomale (TLRs) sowie zytosolische NOD-like Rezeptoren (NLRs). Diese Rezeptoren erkennen die „Pathogen-associated-molecular patterns“ (PAMPs) des Bakteriums, was in Folge zur Induktion diverser Signalkaskaden führt (Akira, Uematsu et al. 2006).

Makrophagen erkennen *L.m.* als Pathogen biphasisch. Zuerst solange sich das Bakterium außerhalb der Zelle aufhält, wofür TLRs entscheidend sind und anschließend nach der Phagozytose, wenn sich *L.m.* im Zytosol der Zelle befindet. Die Erkennung der Bakterien im Zytosol wird durch „Nod-like receptors“ (NLRs) geleistet (McCaffrey, Fawcett et al. 2004). Bestandteile der Zellwand und –membran von extrazellulären *L.m.*, wie PGN, Lipoteichonsäure und Lipoproteine, werden von TLR2 erkannt (Machata, Tchatalbachev et al. 2008). Das bakterielle Flagellin aktiviert TLR5 (Hayashi, Smith et al. 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die defizient für das Signalmolekül MyD88 sind, einem zentralen Adaptermolekül der meisten TLRs, eine deutlich höhere Suszeptibilität für eine Listeriose aufweisen (Seki, Tsutsui et al. 2002). Die Bindung der TLRs führt über Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und Interferon regulatory factor 3 (IRF3). Diese Transkriptionsfaktoren bewirken die Induktion von Genen, die die Immunabwehr kontrollieren, beispielsweise die Zytokinproduktion (Creagh and O'Neill 2006).

Für die Detektion von zytosolischen *L.m.* ist die NLR-Familie verantwortlich. Dazu gehören unter anderem NOD- und NALP-Proteine (Proell, Riedl et al. 2008). Peptidoglykanfragmente werden durch NOD1 und NOD2 erkannt und führen zur Expression proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide. Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen zusätzlichen zytosolischen DNA-Sensor, der bisher nicht identifiziert werden konnte. Über ihn kommt es mittels IRF3 zur Induktion der Typ I Interferon-vermittelten Immunantwort. Zudem spielt die Aktivierung verschiedener Inflammasomen eine wichtige Rolle bei der Induktion der immunologischen Abwehr. Diese Multiproteinkomplexe induzieren Caspase-1, die wiederum für die Aktivierung von IL-1 $\beta$  und IL-18 verantwortlich ist. Wichtige Inflammasomen für die Immunantwort gegen *L.m.* sind das NALP3-, das NLRC4- und das AIM2-Inflammasom (Eitel, Suttrop et al. 2010).

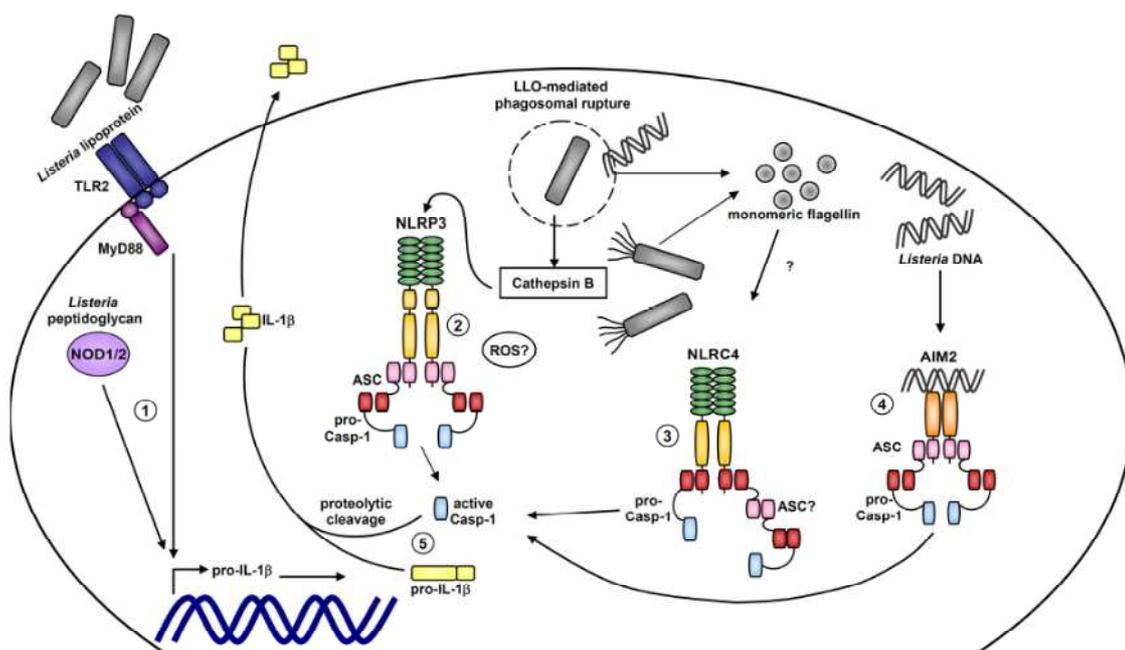


Abbildung 1-5: Modell einer Inflammasom-Aktivierung durch *L.m.* (Eitel, Suttrop et al. 2010)

### 1.3.2. Reaktion der angeborenen Immunität bei Abwehr einer Listerieninfektion

In der Milz werden die Bakterien zunächst von gewebsständigen Makrophagen phagozytiert, die Chemokine produzieren, welche wiederum zur Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen zum Infektionsort führen. Spezialisierte Monozyten werden über das Chemokin CCL2 und dessen Rezeptor CCR2 angelockt. Vor Ort differenzieren diese Monozyten zu Makrophagen und spezialisierten DCs. Letztgenannte zeichnen sich durch ihre TNF- und iNOS-Produktion aus und werden als Tip-DCs bezeichnet (Serbina, Shi et al. 2012).

Die aktivierten Makrophagen sezernieren TNF $\alpha$  und IL-12, welche Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren und diese zur Produktion von Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) anregen (Tripp, Wolf et al. 1993). IFN $\gamma$  führt zur Antigen-unabhängigen Aktivierung sogenannter „bystander“ CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tripp, Wolf et al. 1993) und induziert zusätzlich die Differenzierung der Monozyten zu Tip-DCs. Allerdings wird die Funktion der NK-Zellen kontrovers diskutiert, da in Studien sowohl ein protektiver als auch ein nicht-protektiver Effekt dieser Zellen im Rahmen einer Listerieninfektion nachgewiesen wurde (Dunn and North 1991, Auerbuch, Brockstedt et al. 2004, Viegas, Andzinski et al. 2013).

Zudem kommt es durch zytosolische Bakterien zur Ausschüttung von Typ I Interferonen (Typ I IFN). Jedoch scheint die Produktion von Typ I IFN für einen schwereren Krankheitsverlauf während einer Infektion mit *L.m.* verantwortlich zu sein, da Typ I IFN-Rezeptor-defiziente Mäuse vor einer Listeriose besser geschützt sind als Wildtyp (WT)-Mäuse (Auerbuch, Brockstedt et al. 2004).

DCs in der Marginalzone der Milz phagozytieren *L.m.*, produzieren Zytokine und führen letztlich zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort (Waite, Leiner et al. 2011). Innerhalb der ersten 24 h nach Infektion wandern die DCs nach Phagozytose der Bakterien gemeinsam mit NK-Zellen in die periarterielle Lymphozytenscheide (PALS) der Milz. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass die Phagozytoseleistung der DCs durch den Komplementfaktor C3, der an der Oberfläche der Bakterien anheftet, verstärkt wird (Verschoor, Neuenhahn et al. 2011). DCs sind zum einen in der Lage die phagozytierten Bakterien abzutöten, zum anderen durch Kreuzpräsentation Antigene an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren. Dabei spielen für die Induktion der adaptiven Immunantwort insbesondere CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs eine entscheidende Rolle (Kapadia, Sadikovic et al. 2011).

Die *in vivo* Funktion von nGr im Rahmen einer Listerieninfektion wurde über die spezifische Depletion dieser Zellen durch einen Antikörper (anti-Ly6C) definiert. Diese Experimente verdeutlichten, dass die Depletion von nGr zu einer um das 100 - 1000 fach gesteigerten Listerienlast innerhalb der ersten drei Tage einer Infektion führt. Dies konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn der AK einen Tag vor Infektion gegeben wurde. Wurde die Depletion gleichzeitig mit der Infektion durchgeführt, zeigte sich kein Effekt (Carr, Sieve et al. 2011, Shi, Hohl et al. 2011).

In der Leber befinden sich als spezialisierte Makrophagen, die Kupfferschen Sternzellen. Diese Zellen sind in der Lage, die Bakterien aus dem Blut über die Interaktion von Lektinen ihrer Zellmembran mit Sacchariden der bakteriellen Zellmembran herauszufangen (Ofek and Sharon 1988). Jedoch scheinen sie die Bakterien nicht effektiv zu phagozytieren und abzutöten. Sie sezernieren nach Kontakt mit den Listerien TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , was wiederum andere Immunzellen stimuliert. Die am stärksten infizierten Zellen in der Leber sind die Hepatozyten, die sich auf verschiedene Arten gegen die Infektion wehren können: Sie sind in der Lage, immunstimulatorische Moleküle zu sezernieren, *L.m.* direkt abzutöten, in Apoptose zu gehen oder effektiv mit nGr zu interagieren (Cousens and Wing 2000).

Grundsätzlich sind sowohl Makrophagen als auch DCs und Neutrophile durch verschiedene Abwehrmechanismen in der Lage, phagozytierte Bakterien abzutöten. Allerdings verfügen *L.m.* über diverse Mechanismen, um der Immunantwort zu entkommen. Dadurch ist eine protektive Immunantwort gegenüber Listerien sowohl von der Menge der Bakterien, der Infektionsroute und bei murinen *in vivo* Modellen ebenfalls vom Genotyp des verwendeten Mausstamms abhängig.

#### 1.4. Ziel der Arbeit

Da bisher lediglich eine antimikrobielle Wirkung von BPI gegen gramnegative Bakterien bekannt war, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob BPI auch eine antimikrobielle Funktion gegen grampositive Listerien besitzt. Vordaten aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass humane nGr nach Stimulation mit grampositiven Listerien verstärkt BPI freisetzen. Daher stellte sich die Frage, ob es dabei zu einer direkten Interaktion zwischen hBPI und *L.m.* kommt. Zudem sollte untersucht werden, ob BPI antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene klinische Isolate, die aus an Listeriose erkrankten Patienten gewonnen wurden, besitzt.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der *in vivo* Analyse der antimikrobiellen Funktion von BPI gegenüber grampositiven Bakterien. Dessen Funktion sollte in einem Modell der murinen Listeriose eingehender analysiert werden. Zuerst wurde die Regulation von BPI im Darm von i.g. mit *L.m.* infizierten WT-Mäuse untersucht. Um die Rolle von BPI *in vivo* zu beleuchten, wurde der Krankheitsverlauf nach *L.m.*-Infektion in Wildtyp-Mäusen mit dem Verlauf in BPI<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Der Einfluss des Darmepithel-exprimierten BPI für die Kontrolle der *L.m.* wurde durch die Verwendung von zwei verschiedenen Infektionsrouten, i.g. als auch i.v., analysiert.

Welche Zellen für die Unterschiede in der Schwere der murinen Listeriose zwischen WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich sind, wurde anschließend untersucht. Dabei lag das besondere Interesse auf *ex vivo* isolierte Makrophagen, DCs und nGr. Diese Zellen sind in der Frühphase der Infektion für die Kontrolle der Bakterien von großer Bedeutung.

## 2. Methoden

### 2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die durchgeführten Versuche wurden C57BL/6 (WT) Mäuse (Jackson Laboratory) und BPI-*knock-out* (BPI<sup>-/-</sup>) Mäuse (Prof. Dr. Dr. Gessner, Universität Regensburg), basierend auf einem C57BL/6 Hintergrund, verwendet. Alle Tiere wurden in einzeln belüfteten Käfigen unter keimarmen Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur (RT) lag bei konstant 20°C, die Luftfeuchtigkeit war ebenfalls konstant und es wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h aufrechterhalten.

### 2.2. *In vivo* Infektion

Um die Rolle von BPI bei der Kontrolle von grampositiven Bakterien *in vivo* zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente in Mäusen durchgeführt. Als Infektionserreger wurde *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) Stamm EGD ausgewählt.

Für die intragastrale (i.g.) Infektion wurden die Mäuse mittels einer Fütterungsnadel mit Rundkopf mit 200 µL einer Bakteriensuspension aus *L.m.* und sterilem PBS infiziert. Dabei lag die Bakterienlast pro Maus bei  $2,5 \times 10^8$  Colony Forming Units (CFU).

Die intravenöse (i.v.) Infektion wurde mit einer Bakterienlast von  $5 \times 10^3$  CFU pro infiziertem Tier durchgeführt. Die Mäuse wurden unter einer Wärmelampe für mehrere Minuten erwärmt, um eine Erweiterung der Gefäße herbei zu führen. Danach wurde die Bakteriensuspension mittels einer Tuberkulin-Spritze und einer Kanüle der Größe 26xG in die Schwanzvene injiziert. Nach Infektion wurde zur Kontrolle der Bakterienlast ein Inokulum der Injektionslösung auf LB-Agar ausgestrichen (siehe 2.7.1).

#### 2.2.1. Blutentnahme zur Serumgewinnung

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach sofortigem Eröffnen des Brustkorbs wurde das Blut mittels Herzpunktion mit einer Kanüle gewonnen und bis zur Gerinnung (2-4 h) bei RT gelagert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei RT mit 5000 rpm konnte das Serum als Überstand abgenommen werden und bis zur weiteren Analyse mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.2. Bestimmung der Keimlast in den Organen

Den infizierten Mäusen wurden folgende Organe entnommen: Milz, Leber und im Rahmen der intragastralen Infektion zusätzlich der Dünndarm. Der Dünndarm wurde der Länge nach geöffnet und mit kaltem PBS gespült, um Stuhlreste zu entfernen. Die Organe wurden in einem definierten Volumen PBS (Milz: 500  $\mu$ L; Leber: 1 mL; Dünndarm: 1 mL) in speziellen Plastikbeuteln („Whirl Paks<sup>®</sup>“) mechanisch zerkleinert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Schritte unter sterilen Bedingungen. Von den einzelnen Organhomogenisaten wurden 1:10 Verdünnungsreihen mit PBS hergestellt und jeweils 100  $\mu$ L von mindestens fünf verschiedenen Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Agar ausplattiert. Um beim Ausplattieren der Dünndarm-Proben eine Selektion für *L.m.* zu erreichen, wurden diese auf Palcam-Agar, einem Selektivagar für Listerien, ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C konnten die Kolonien gezählt werden und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren die CFUs berechnet werden.

### 2.2.3. Milzzellpräparation

Aus infizierten oder Kontroll-WT bzw. BPI-/- Mäusen wurde die Milz zur genaueren Analyse der einzelnen Zellpopulationen entnommen. Diese wurde in eine Petrischale mit RPMI-komplett (siehe 2.3) gegeben und anschließend unter sterilen Bedingungen mit weiteren 5 mL RPMI-komplett durch ein Zellsieb gedrückt, um eine Einzellsuspension herzustellen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch Zugabe von 4 mL ACK-Puffer für 5 Minuten bei RT eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Nach kurzem Resuspendieren wurden 10 mL RPMI-komplett zugegeben und die Zellsuspension erneut zentrifugiert (siehe oben). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL Medium für die Zellzählung (siehe 2.3.1) resuspendiert. Für eine Stimulation der Zellen wurden diese auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$ /mL eingestellt (siehe 2.5.1). Für Analysen mittels Durchflusszytometer wurden die Zellen wie unter Punkt 2.4 beschrieben behandelt.

### 2.2.4. Analyse der mRNA-Expression aus Darmgewebe

Für die quantitative Analyse der BPI-RNA-Expression im Darmgewebe der Mäuse, wurde RNA aus Dün- und Dickdarmgewebe aufgereinigt und nach reverser

Transkription in komplementäre DNA (cDNA) mittels quantitativer Real time PCR analysiert.

#### 2.2.4.1. RNA-Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung

Für die Isolation von RNA aus Darm wurden 0,5 cm Dünn- bzw. Dickdarm präpariert, der Länge nach aufgeschnitten und mit reichlich PBS Stuhlreste aus dem Lumen gespült. Das Darmgewebe wurde in 400 µL Lysepuffer („PeqlabGOLD RNA Isolation Kit“) aufgenommen und mit einem mechanischen Dispergierer homogenisiert. Bis zur Aufreinigung der RNA wurden die Proben bei - 80°C gelagert. Für die Aufreinigung wurde das Kit „PeqlabGOLD RNA Isolation Kit“ der Firma Peqlab nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

#### 2.2.4.2. cDNA-Synthese und Qualitätskontrolle

Jeweils 1 µg der aufgereinigten Gesamt-RNA wurde nach DNA-Verdau mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für den DNA-Verdau wurde die RNA mit 1 µL 10 x Reaktionspuffer (enthält 100 mM MgSO<sub>4</sub>) und 1µL DNase I (1 Unit/µL) versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 µL 20mM EGTA-Stopplösung beendet. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese. Dafür wurde das „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Thermo Scientific verwendet und das Protokoll nach Herstellerangabe befolgt. Um die Qualität der cDNA zu überprüfen, wurde eine Aktin-PCR mit folgenden Primern und folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Primer	Sequenz 5'-3'
mActin1F	cac ccg cca cca gtt cgc ca
mActin2R	cag gtc ccg gcc agc cag gt

**Tabelle 1: Aktinprimer**

Aktin PCR Ansatz für 1 Probe		PCR Programm		
5 x Green Go Taq Puffer	5,0 µL	Schritt 1	95°C	5 min
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5 µL			
dNTPs (10mM)	0,5 µL	Schritt 2	94°C	30 sek
Aktin 1F Primer (40 µM)	0,125 µL	Schritt 3	60°C	30 sek
Aktin 2R Primer (40 µM)	0,125 µL	Schritt 4	72°C	30 sek
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,25 µL	→ Schritt 2: 35 x		
H <sub>2</sub> O	15,5 µL	Schritt 5	72°C	10 min
cDNA	1 µL	Schritt 6	4°C	5 min

**Tabelle 2: Aktin PCR**

Jeweils 10 µL der Proben wurden auf ein 1%iges Agarosegel (1 g Agarose aufgekocht in 100 mL TAE-Puffer) aufgetragen und mittels 6 µL des Längenstandards „Gene Ruler™ 100 bp“ die Größe der Fragmente bestimmt. Das Gel wurde im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und mit Hilfe des „Gel Imagers“ (MWG Biotech) das Ergebnis dokumentiert.

#### 2.2.4.3. Quantitative Real-time-PCR

Die quantitative Real-time-PCR wurde mit dem „Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix“ der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine sondenbasierte Real time PCR, die das genaue Quantifizieren der DNA-Menge bzw. im Rückschluss der RNA-Menge mittels Fluoreszenz ermöglicht. Um die Anzahl der BPI- bzw. PBGD-Transkripte zu bestimmen, wurde neben den spezifischen BPI bzw. PBGD Primern eine sequenzspezifische Sonde verwendet, die zwischen den beiden Amplifikationsprimern in der Zielsequenz bindet. Am 5'Ende der Sonde befindet sich ein fluoreszierender Farbstoff und am 3'Ende ein Quencher-Farbstoff. Solange sich diese beiden Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird das Fluoreszenzsignal durch den Quencher inhibiert. Die verwendete Taq-Polymerase besitzt eine 5'Exonukleaseaktivität, wodurch die Sonde während der Polymerisation der Zielsequenz abgebaut wird. Dies resultiert in der Freisetzung des Fluoreszenz-Farbstoffes, so dass die am Ende eines jeden Zyklus gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu der vorliegende Transkriptmenge ist. Ein für BPI als auch für PBGD mitgeführter, definierter Standard erlaubt die genaue Berechnung der Kopienzahl. Um die Menge der BPI-Transkripte zu quantifizieren, wurde für jede Probe der Quotient aus BPI und dem Referenzgen PBGD gebildet.

Primer & Sonden	
PBGD Sonde BHQ1	5'-gga gcc atc tgc aaa cgg gaa aa-3'
PBGD 3F	5'-atg tgc cta cca tac tac ctc-3'
PBGD 4R	5'-gaa aga caa cag cat cac aag-3'
BPI Sonde BHQ1	5'-acg ttt tac ccc tac cag aa-3'
BPI TM1F	5'-gga tcc ggt tca gcc act t-3'
BPI TM2R	5'-ccg ctt caa gca aca gga a-3'

**Tabelle 3: Sequenzen verwendeter Primer und Sonden**

qPCR (1x)	PBGD	BPI
Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2 x)	7,5 µl	7,5 µl
Primer fw (40 µM)	0,1125 µl	0,1125 µl
Primer rev (40 µM)	0,1125 µl	0,1125 µl
Probe (40 µM)	0,075 µl	0,075 µl
Nuklease-freies Wasser	5,2 µl	4,2 µl
cDNA	1 µl	2µl

Tabelle 4: Pipettieransatz für PBGD und BPI

PCR Programm	PBGD		PCR Programm	BPI	
Schritt 1	95°C	10 min	Schritt 1	95°C	10 min
Schritt 2	95°C	15 sek	Schritt 2	95°C	15 sek
Schritt 3	54°C	30 sek	Schritt 3	46°C	30 sek
Schritt 4	72°C	15 sek	Schritt 4	72°C	15 sek
→ Schritt 2: 40 x			→ Schritt 2: 45 x		
Schritt 5	4°C	∞	Schritt 5	4°C	∞

Tabelle 5: PCR Programm für PBGD und BPI

### 2.3. Gewinnung primärer Zellen

Alle primären Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100 % gehalten. Die primären Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in RPMI 1640 mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min), 1% L-Glutamin (2mM), 1% Penicillin-Streptomycin (100 U/mL- 100 µg/mL), 0,5% β-Mercaptoethanol (0.25 mM) (RPMI komplett) kultiviert.

#### 2.3.1. Zellzählung

Die Zellzählung wurde mittels einer Eosin-Ausschlussfärbung ermittelt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop rot. Die Zählung wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die jeweilige Zellsuspension wurde bedarfsgerecht verdünnt und mit Eosin in einer Verdünnung von 1:10 versetzt, um die Zellen anzufärben. Davon wurden 10 µL in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und vier Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl berechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Quadrate}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) = \text{AnzahlZellen/mL}$$

Formel 1: Quelle Marienfelde

### 2.3.2. Präparation von Knochenmarkszellen

Zur Präparation der Knochenmarkszellen wurden die Hinterbeine euthanasierter Mäuse entnommen. Nach Entfernung von Fell und Muskulatur wurden die Knochenenden eröffnet und mittels einer Kanüle das Knochenmark in ein 50 mL Reaktionsröhrchen gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und mit 4 mL ACK-Puffer während einer 6 minütigen Inkubation bei RT eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Durch Zugabe von 10 mL RPMI-komplett wurde diese abgestoppt und die Zellsuspension über ein Zellsieb (Cell Strainer 70 µM, Fisherbrand) gegeben, um eventuell vorhandene Knochensplitter zu entfernen. Danach wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 mL RPMI-komplett für die Zellzählung resuspendiert. Pro Maus ist mit einer Zellzahl von circa  $5 \times 10^7$  zu rechnen.

### 2.3.3. Differenzierung von myeloiden, dendritischen Zellen (mDCs)

Die Differenzierung der mDCs aus den Knochenmarkszellen erfolgt durch die Zugabe des Zytokins GM-CSF. GM-CSF wurde dem Kulturmedium in Form eines konditionierten GM-CSF-haltigen Zellkulturüberstandes zugesetzt. Der GM-CSF-haltige Überstand wurde aus einer X6310 Zelllinie generiert, die rekombinantes GM-CSF konstitutiv exprimiert (Zal, Volkmann et al. 1994). Der gewonnene Überstand der Zelllinie wurde steril filtriert und konnte bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden. Für die mDC Differenzierung wurden  $3-6 \times 10^6$  Knochenmarkszellen in 10 mL RPMI-komplett/10% des GM-CSF konditionierten Mediums (GM-CSF) in einer 10 cm Petrischale ausgesät. Während der folgenden siebentägigen Inkubation wurden die Zellen erschütterungsfrei im Brutschrank kultiviert. An Tag drei und Tag sechs wurden 10 mL RPMI-komplett/10% GM-CSF vorsichtig dazu pipettiert. An Tag sieben wurden die Zellen durch vorsichtiges Abspülen der Petrischalen geerntet und für 7 min bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Vor weiterer Verwendung der Zellen wurde eine Qualitätsanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (siehe 2.4.1.) und die Zellzahl bestimmt. Als Ergebnis der Differenzierung sind ungefähr so viele Zellen zu erwarten wie zu Beginn eingesetzt wurden.

### 2.3.4. Differenzierung von Makrophagen

Für die Makrophagen-Differenzierung wurden nach Präparation des Knochenmarks (siehe 2.3.2.)  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 mL RPMI-komplett in einer 10 cm Petrischale

ausgesät und rekombinantes murines M-CSF (PeproTech) in einer Endkonzentration von 20 ng/mL zugegeben. Die Zellen wurden für fünf Tage im Brutschrank kultiviert. Am Tag drei wurden erneut 20 ng/mL M-CSF zugegeben. Am Tag fünf wurden die Zellen geerntet, indem das Medium von den adhären Zellen abgenommen wurde und die Zellen mit 5 mL PBS/3%FCS/2mM EDTA für 15 min im Brutschrank inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen durch konsequentes Abspülen von der Kulturschale abgelöst und in einem 50 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 7 min bei 300 x g, 4°C konnte das Pellet in entsprechendem Volumen zur Zellzählung aufgenommen werden. Vor weiterer Verwendung der Zellen wurde eine Qualitätsanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (siehe 2.4.1.). Bei Aussaat von  $5 \times 10^6$  Zellen pro Schale zu Beginn der Differenzierung ergibt sich eine Ausbeute von ungefähr so vielen Zellen wie zu Beginn eingesetzt wurden.

### 2.3.5. Gewinnung von Peritonealgranulozyten (pGr)

Um aus dem Bauchraum von WT- sowie BPI-/- Mäusen pGr zu gewinnen, wurde Mäusen jeweils 2 mL einer 4% igen Thioglykolatlösung intraperitoneal injiziert. Nach 16 h wurde den euthanasierten Mäusen der Bauchraum eröffnet, ohne dabei das Peritoneum zu beschädigen. Mittels 24G-Kanüle wurde die Bauchhöhle mit 8 mL RPMI komplett ohne Antibiotikum laviert. Die gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert und auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$ /mL für den Gentamicin-Schutz-Test eingestellt. Aus einer injizierten Maus lassen sich circa  $1 - 1,5 \times 10^7$  pGr gewinnen. Die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation wurde mittels folgender Antikörper (AK) untersucht:

Zellen	Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
pGr	Gr-1/Ly-6C	FITC	RB6-8C5	eBioscience	2 µg/mL
Makrophagen	F4/80	FITC	BM8	eBioscience	0,4 µg/mL
B-Zellen	CD19	APC	6D5	Miltenyi	unbekannt

**Tabelle 6: verwendete AK für pGr**

### 2.3.6. Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten (nGr)

Für die Aufreinigung von nGr aus Knochenmark wurde das „Neutrophil Isolation Kit“ aus der „Magnetic Cell Separation“ (MACS) Reihe der Firma Miltenyi verwendet. Bei diesem System handelt es sich um eine Negativselektion. In einem ersten AK-Mix befinden sich verschiedene monoklonale AK, die Biotin gekoppelt sind und alle unerwünschten Zellpopulationen im Knochenmark markieren. In einem zweiten Schritt

werden diese Biotin gekoppelten AK von magnetischen Micro-Beads gebunden. Die Zellsuspension wird im Anschluss über eine „LS“ MACS Säule (Bindekapazität für bis zu  $2 \times 10^9$  Zellen) gegeben, die in einem Magneten platziert wird. Die magnetisch markierten Zellen werden dabei an die Säule gebunden, so dass der Durchfluss nur die erwünschten nGr enthält. Der Durchfluss wurde für 10 min bei  $300 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, das Zellpellet in angemessenem Volumen RPMI-komplett oder antibiotikafreiem RPMI-komplett resuspendiert und die Zellen gezählt. Vor weiterer Verwendung der Zellen wurde die Aufreinigungseffizienz im Durchflusszytometer bestimmt. Aus dem Knochenmark einer Maus lassen sich circa  $3\text{-}5 \times 10^6$  nGr aufreinigen.

### 2.3.7. Histologie der aufgereinigten nGr

Um histologisch die Reinheit der isolierten nGr am Lichtmikroskop zu überprüfen, wurden die Zellen mittels „Diff-Quik<sup>®</sup>“ Färbung angefärbt. Dazu wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen durch einen Zytospin auf einen Objektträger bei 300 rpm für 3 min zentrifugiert. Danach erfolgte die Färbung der Zellen nach Herstellerprotokoll mittels „Diff Quik<sup>®</sup>“ der Firma Medion Diagnostics. Im Anschluss wurde der Objektträger unter VE-Wasser abgespült und bei RT getrocknet. Die Zellen konnten darauf mit Hilfe eines Olympus BX51 Lichtmikroskops und der zugehörigen „Soft Imaging System“ Software in 40-facher Vergrößerung aufgenommen werden.

## 2.4. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen, die fluoreszenz-gekoppelte AK tragen, basierend auf der Erfassung von Reflexions- und Streulichtphänomenen. Diese resultieren daraus, dass Licht einer definierten Wellenlänge auf den jeweiligen Farbstoff trifft und diesen zur Emission charakteristischer, elektromagnetischer Wellen anregt. Dieses Fluoreszenzspektrum kann durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Als zusätzliche Parameter werden durch den Forward- und Sidewardscatter, über Lichtbeugung und -streuung die Größe und Granularität der jeweiligen Zelle bestimmt. Voraussetzung ist, dass die Zellen vereinzelt in der Trägerflüssigkeit an einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt werden.

Die für die FACS-Färbung verwendeten AK finden sich unter den jeweiligen Unterpunkten in Tabellenform aufgelistet. Zudem wurde für jeden verwendeten AK eine Isotypenkontrolle (siehe Tabelle 10) eingesetzt, die Aufschluss über die Spezifität der

Färbung gibt. Die FACS-Färbung wurde unabhängig von den verwendeten Antikörpern nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Es wurden zwischen  $2,5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, für 7 min bei  $300 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Im Anschluss wurden abhängig von den verwendeten Antikörpern 30  $\mu\text{L}$  entsprechender Fc-Block (siehe Tabelle 7) zugegeben, um die Fc-Rezeptoren auf den Zellen abzusättigen und unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Zellen wurden mit dem Fc-Block-Reagenz gemischt und auf Eis für 7 min inkubiert. Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper wurden die Zellen für 25 min dunkel bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte (siehe oben). Nach Zugabe von 150  $\mu\text{L}$ -300  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer konnten die Zellen am FACS Calibur unter der Verwendung der Software „Cell Quest Pro“ untersucht werden.

Wenn eine sofortige Analyse der Zellen nicht möglich war, wurden die Zellen nach folgendem Protokoll fixiert und gelagert. Nach dem letzten Waschschrte wurden 400  $\mu\text{L}$  2%iges Formaldehyd zugegeben und die Zellen für 20 min dunkel bei RT inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Waschschrte und die Zellen konnten bis zur Untersuchung dunkel bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Die Auswertung der im FACS generierten Daten erfolgte mit der Software „Flow Jo“.

Fc-Block	Hersteller	Konzentration
ChromPure Syrian Hamster IgG	Jackson Immuno Research	1,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ChromPure Rabbit IgG	Jackson Immuno Research	0,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ChromPure Rat IgG	Jackson Immuno Research	0,224 $\mu\text{g}/\text{mL}$

**Tabelle 7: AK für Fc-Block**

#### 2.4.1. Reinheit von mDCs, Makrophagen und nGr

Sowohl mDC-Kulturen, Makrophagenkulturen als auch die mittels MACS aufgereinigten nGr wurden mit Hilfe des FACS auf ihre Reinheit untersucht. Dazu wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Antikörper verwendet:

Zellen	Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Konzentration
mDCs	MHCII	PE	M5/114.15.2	eBioscience	0,2 µg/mL
	CD11c	APC	N418	eBioscience	0,4 µg/mL
Makrophagen	F4/80	FITC	BM8	eBioscience	0,4 µg/mL
	CD11c	APC	N418	eBioscience	0,4 µg/mL
nGr	Gr-1/Ly-6C	FITC	RB6-8C5	eBioscience	2 µg/mL
	CD11b	APC	M1/70	eBioscience	2 µg/mL

Tabelle 8 FACS-AK

#### 2.4.2. Analyse der Zellpopulationen der Milz

In der folgenden Tabelle finden sich die verwendeten AK, die zur Analyse der einzelnen Milzzellpopulationen nach Infektion der Mäuse mit *L.m.* bzw. in nicht infizierten Kontrolltieren verwendet wurden:

Zellen	Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Konzentration
mDCs	MHCII	PE	M5/114.15.2	eBioscience	0,2 µg/mL
	CD11c	APC	N418	eBioscience	0,4 µg/mL
Makrophagen	F4/80	FITC	BM8	eBioscience	0,4 µg/mL
	CD11c	APC	N418	eBioscience	0,4 µg/mL
nGr	Gr-1/Ly-6C	FITC	RB6-8C5	eBioscience	2 µg/mL
	CD11b	APC	M1/70	eBioscience	2 µg/mL
T/B-Zellen	CD3e	PE	145-2C11	BD Bioscience	4 µg/mL
	CD19	APC	6D5	Miltenyi	unbekannt

Tabelle 9: FACS AK

Isotyp	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Konzentration
Rat IgG2bk	APC	eB149/10H5	eBioscience	2 µg/mL
Rat IgG2bk	PE	A95-1	BD Bioscience	0,2 µg/mL
Rat IgG2bk	FITC	A95-1	BD Bioscience	0,4 µg/mL 2 µg/mL
Rat IgG2ak	APC	eBR2a	eBioscience	2 µg/mL
Rat IgG1κ	PE	R3-34	BD Bioscience	4 µg/mL
Hamster IgG1	APC	G235-2356	BD Bioscience	0,4 µg/mL

Tabelle 10: Isotypkontrollen

#### 2.4.3. Analyse reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in nGr

Ein typischer Abwehrmechanismus von nGr gegen Pathogene ist die Induktion eines sogenannten „Oxidativen Burst“. Dabei kommt es durch die Reduktion von Sauerstoffmolekülen zur Bildung von antimikrobiell wirksamen Substanzen. Durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase wird aus NADPH und Sauerstoff ein

Sauerstoffradikal, NADP und ein Proton gebildet. Diese Sauerstoffradikale reagieren mit Protonen und sich selbst zu Wasserstoffperoxid und einem weiteren Sauerstoffradikal. In weiteren Schritten kommt es dann zur Bildung stark antimikrobieller Substanzen wie Hypochlorid und Chloraminen. Um den „Oxidative Burst“ in nGr aus WT und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zu analysieren, wurde 2,7-Dichlorofluoreszin Diazetat (DCFH-DA) verwendet. Dieses Reagenz ist nicht fluoreszierend und in der Lage, in die Zelle einzudringen. In der Zelle kommt es zum Abspalten einer Estergruppe, so dass die Substanz (DCFH) in der Zelle verbleibt, allerdings noch als nicht fluoreszierendes Molekül. Durch das im Rahmen der ROS-Bildung entstandene Wasserstoffperoxid wird die Substanz zu DCF oxidiert, was zur Bildung von stark fluoreszierendem DCF führt. Somit lässt die in der Durchflusszytometrie detektierbare Fluoreszenz einen indirekten Rückschluss auf die Bildung von ROS im Rahmen des „Oxidative Burst“ zu (Elbim and Lizard 2009).

Für die Analyse der aufgereinigten nGr wurden 250 µL der Zellsuspension in einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$ /mL in einer 48 well Platte ausgesät. Nach einer Ruhezeit von 3-4 h wurden die Zellen mit 50 ng/mL IFN $\gamma$  für eine Stunde vorstimuliert. Im Anschluss wurden die folgenden Stimuli zugegeben:

Stimulus	Ausgangskonz.	Endkonz.
Lipopolysaccharid (LPS)	1 mg/mL	100 ng/mL
Interferon (IFN) $\gamma$	100 µg/mL	50 ng/mL
<i>L.m.</i> (UV-inaktiviert)	$2 \times 10^8$ /mL	MOI 10
Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA)	100 µg/mL	100 ng/mL

**Tabelle 11: Stimuli**

Nach einer Inkubation von 18 h wurden die nGr in 1,5 mL Reaktionsgefäßen für 10 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 500 µL PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µL PBS/20 µM DCFH-DA gelöst. Ein Ansatz wurde als Positivkontrolle mit 100 ng/mL PMA stimuliert. Alle Proben wurden für 15 min im Brutschrank inkubiert.

Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 2 mL FACS Puffer für jeweils 7 min bei  $300 \times g$  und 4°C gewaschen. Anschließend konnte die Fluoreszenz der Proben in der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

## 2.5. Stimulation und Infektion primärer Zellen *in vitro*

Zur Analyse der Zytokinfreisetzung wurden sowohl Milzzellen, mDCs als auch Makrophagen und nGr aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen in der Zellkultur mit verschiedenen Stimuli inkubiert bzw. mit *L.m.* infiziert.

### 2.5.1. Stimulation *in vitro*

Für die *in vitro* Stimulation von Milzzellen, mDCs, Makrophagen und nGr wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$ /mL eingestellt und in 12-Well-Platten ausgesät. Die verwendeten Stimuli sind in Tabelle 9 aufgeführt:

Stimulus	Ausgangskonz	Endkonz
Lipopolysaccharid (LPS)	1 mg/mL	100 ng/mL
<i>L.m.</i> (UV-inaktiviert)	$2 \times 10^8$ /mL	MOI 10
Flagellin	100 µg/mL	100 ng/mL
Peptidoglykan (PGN)	10 mg/mL	5 µg/mL

**Tabelle 12: Stimuli**

Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und bei 8000 rpm, für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um eventuelle Zellreste zu pelletieren. Die abgenommenen Überstände konnten bis zur weiteren Analyse mittels ELISA oder NO-Assay bei -20°C gelagert werden.

### 2.5.2. Gentamicin-Schutz-Test

Zur Analyse der Phagozytoserate und der Kompetenz der Zellen, Bakterien abzutöten, wurde ein Gentamicin-Schutz-Test sowohl mit DCs, Makrophagen als auch nGr durchgeführt. DCs oder Makrophagen wurden geerntet (siehe 2.3.3, 2.3.4), auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$ /mL (nGr:  $2 \times 10^6$ /mL) in RPMI-komplett ohne Antibiotikum eingestellt und je 500 µL (nGr: 1 mL) in einer 24-Well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen für zwei (DCs) oder drei (Makrophagen) Stunden im Brutschrank inkubiert um eine Adhärenz an die Platte zu ermöglichen.

Anschließend wurden *L.m.* in einer „Multiplicity of infection“ (MOI) von 10 zugegeben und zur Synchronisation der Infektion die Platte für 5 min bei 1300 rpm, RT zentrifugiert.

Bei DCs und Makrophagen wurde nach einstündiger Inkubation der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen zweimal mit warmen PBS (37°C) gewaschen und 500 µL RPMI-komplett mit 100 µg/mL Gentamicin zupipettiert, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Bei nGr handelt es sich um teils adhärente, teils konfluente Zellen, so dass auf den Waschschrift verzichtet wurde. Nach einstündiger Inkubation wurden 100 µg/mL Gentamicin zupipettiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde das Medium abgenommen (nGr: Überstände abzentrifugiert bei 300 x g für 10 min, RT; Zellpellet mit adhären Zellen im Well vereint), für die Analyse des 2 h Werts wurden die Zellen mit PBS/Triton für 15 min bei RT lysiert und Verdünnungsreihen hergestellt. Um ein Aneinanderheften der Bakterien zu verhindern, wurden die Verdünnungen in PBS/0,1% Tween hergestellt. Von der jeweiligen Verdünnung wurden in Doppelbestimmung 100 µL auf LB-Agarplatten ausgestrichen und diese über Nacht (üN) bei 37°C inkubiert. Danach konnten die Kolonien gezählt werden und unter Berücksichtigung der Verdünnung die CFU/mL berechnet werden.

Für den 24 h-Wert von DCs und Makrophagen wurde nach 2 h Inkubation mit den Bakterien RPMI-komplett mit 25 µg/mL Gentamicin zugegeben und die Zellen für weitere 22 h inkubiert. Bei nGr wurde auf den Mediumwechsel verzichtet. Nach insgesamt 24 h wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert und ebenfalls verschiedene Verdünnungsstufen ausgestrichen.

Der 2 h-Wert gibt Aufschluss über die Phagozytoseleistung der untersuchten Zellen, der 24 h-Wert über ihre Kapazität die aufgenommenen Bakterien abzutöten.

### 2.5.3. Infektion der nGr mit Fluoreszenz gekoppelten Listerien

Damit *L.m.* sowohl für die Durchflusszytometrie als auch für die Mikroskopie visualisiert werden konnten, wurden die Bakterien mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert. Diese markierten Bakterien wurden für eine Infektion der nGr verwendet (siehe 2.5.3.3)

#### 2.5.3.1. Anfärben der Listerien mit CFSE

Bei CFSE-SE als Ausgangsstoff für die Markierung handelt es sich um ein lipophiles Molekül, das außerhalb von Zellen nur geringe Fluoreszenz aufweist. Wenn die Substanz in eine Zelle gelangt, kommt es durch eine Esterase zum Abspalten einer Acetylgruppe, was zur Bildung von CFSE führt, das eine starke Fluoreszenz aufweist. Die Succinimidyl-Estergruppe bindet kovalent an Aminogruppen intrazellulärer Proteine

sowohl in Säuger- als auch Bakterienzellen (Weston and Parish 1990, Tuominen-Gustafsson, Penttinen et al. 2006).

Zum Anfärben der *L.m.* wurden Bakterien, die sich in der statischen Wachstumsphase befinden, verwendet. Die Bakterien wurden bei 3000 rpm, 10 min bei 4°C abzentrifugiert und das Bakterienpellet mit 10 mL eiskaltem PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Pellet in einem angepassten Volumen resuspendiert, um die OD<sub>600</sub> zu messen. Nach Berechnung der *L.m.* Zellzahl (siehe 2.7.1) wurde die Bakteriensuspension auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$ /mL eingestellt. Davon wurden jeweils 500 µL in Reaktionsgefäßen mit CFSE in einer Endkonzentration von 10 µM pipettiert und für 30 min im Brutschrank bei 37°C auf einem Überkopf Rotationschüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µL FCS gestoppt und die Bakteriensuspension für 10 min bei 6000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem PBS/3% FCS dreimal gewaschen. Vor Verwendung der CFSE-markierten *L.m.* wurde ein Inokulum zur Kontrolle der Bakterienzahl ausgestrichen.

#### 2.5.3.2. Durchflusszytometrie und mikroskopische Analyse

Zunächst wurde die Effizienz der CFSE-Färbung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden die Bakterien wie unter Punkt 2.5.3.1 beschrieben gefärbt und anschließend das Pellet für die Durchflusszytometrie in 300 µL FACS Puffer aufgenommen.

#### 2.5.3.3. Infektion der nGr

Für die Infektion der nGr wurden diese in RPMI-komplett ohne Antibiotika auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$ /mL eingestellt und 500 µL in einer 48-Well-Platte ausgesät. Die CFSE-markierten *L.m.* (siehe 2.5.3.1) wurden in einer MOI von 10 zugegeben. Um die Infektion zu synchronisieren, wurden die Platten bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank Gentamicin in einer Konzentration von 100 µg/mL zugegeben, um alle extrazellulären Bakterien abzutöten. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen wie folgt aufbereitet:

Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und bei 300 x g und 4°C für 7 min zentrifugiert. Die Überstände konnten zur Analyse im ELISA abgenommen und bei -20°C gelagert werden. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 1,5 mL FACS-Puffer gewaschen. Kurz vor der Durchflusszytometrie wurden 200 µL einer 2%igen

Trypanblaulösung zugegeben. Trypanblau quencht die CFSE-Fluoreszenz und verhindert somit das falsch positive Signal extrazellulärer Bakterien.

## 2.6. Analyse von Zytokinen

Die aus Stimulations- oder Infektionsexperimenten gewonnenen Überstände konnten mittels folgender Tests genauer untersucht werden.

### 2.6.1. Interleukin (IL)-6 ELISA

Nach jeder Inkubation wurde ein viermaliger Waschschrift mit Waschpuffer in einem Volumen von 300  $\mu$ L durchgeführt und die Platte gründlich ausgeschlagen. Von allen verwendeten AKs, der Standardreihe und den Proben wurden jeweils 50  $\mu$ L pro Well eingesetzt. In der folgenden Tabelle finden sich die verwendeten AK bzw. Standard:

Anwendung	AK/Standard	Firma	Bestellnr.:	eingesetzte Konzentration
Beschichtung	anti-mouse IL-6	R&D	MAB406	1 $\mu$ g/mL
Detektion	biotin-rat anti-mouse IL-6	R&D	BAF406	0,1 $\mu$ g/mL
Standard	murines IL-6	R&D	406-ML	10 ng/mL
Konjugat	Streptavidin-POD Konjugat	Roche	11089153001	0,1 U/mL

**Tabelle 13: IL-6 ELISA AK**

Für den IL-6 ELISA wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte mit 1  $\mu$ g/mL anti-Maus IL-6 in PBS beschichtet und über Nacht (üN) bei 4°C inkubiert. Der AK wurde entfernt und pro Well 250  $\mu$ L Blockpuffer aus PBS/1% BSA für 1 h bei RT zugegeben. Danach wurde eine Standardreihe aus murinem IL-6 in 1:2 Verdünnung von 10 ng/mL bis 0,039 ng/mL angesetzt und jeweils 50  $\mu$ L der Standardreihe als auch 50  $\mu$ L der Proben in die Wells pipettiert. Bei Bedarf wurden die Proben mit Blockpuffer verdünnt. Nach einer Inkubation von 90 min wurde das gebundene IL-6 mittels eines Biotin-Ratte anti-Maus AKs detektiert. Nach einer Inkubation von 90 min wurden 50  $\mu$ L Streptavidin-POD Konjugat in einer 1: 5000 Verdünnung für 30 min zugegeben. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung mittels „TMB Super Sensitive Substrat“ (BioFX, Sur Modics), das abhängig von der Menge des detektierten IL-6 zu einer Blaufärbung führt. Die Farbreaktion wurde mit je 25  $\mu$ L 1M Phosphorsäure abgestoppt und die Platte im „E max Precision Microplate Reader“ (Molecular Device) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte mit der Software „Softmax Pro“.

## 2.6.2. TNF- ELISA

Der ELISA wurden nach Angabe der Hersteller „PeproTech“ durchgeführt. Die einzige Abweichung zum Protokoll lag in einer Halbierung der vorgeschlagenen Volumina für alle verwendeten Antikörper, die Standardreihe und die eingesetzten Proben. Als Substrat wurden 50 µL „TMB Super Sensitive Substrat“ (BioFX, Sur Modics) verwendet, die Reaktion wurde mit 25 µL 1 M Phosphorsäure abgestoppt. Messung und Berechnung der Konzentration erfolgte wie für den IL-6 ELISA.

## 2.7. Bakterien

Für die *in vivo* Versuche wurden *L.m.* des Stammes EGD verwendet. *In vitro* wurden zudem Analysen verschiedener klinischer Isolate durchgeführt. Alle Listerien wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der verwendeten *L.m.*-Stämme erfolgte in LB-Medium. Es wurden stets üN-Kulturen in speziellen Anzuchtröhrchen aus 5 mL LB-Medium mit einer Bakterienkolonie einer Agarplatte angeimpft, die in einem Bakterenschüttler bei 220 rpm und 37°C hochgezogen wurden. Ausgestrichen wurden die *L.m.* abhängig vom jeweiligen Experiment auf LB-Agarplatten oder Palcam-Agar, einem Selektivagar für Listerien.

### 2.7.1. Bakterienzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl der angezogenen Bakterien wurde die üN-Kultur abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet zweimal mit 10 mL PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in einem angepasstem Volumen PBS resuspendiert und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen. Aufgrund einer für Listerien erstellten Wachstumskurve, bei der einer bestimmten OD eine entsprechende Bakterienzahl in der linearen Wachstumsphase zugeordnet werden kann, konnte folgende Formel zur Berechnung der Bakterienanzahl verwendet werden:

$$OD_{600} (0,333) = 4 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$$

**Formel 2 Quelle: AG Schnare**

Im Anschluss wurde zur Überprüfung der berechneten Bakterienzahl ein Inokulum auf LB-Agar ausgestrichen.

### 2.7.2. UV-Inaktivierung von Bakterien

Um nGr zu stimulieren, wurden Listerien mittels UV-Inaktivierung abgetötet. Dazu wurden die Bakterien in einer ün-Kultur hochgezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und das Pellet zweimal mit 10 mL PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 2 mL PBS resuspendiert und in Petrischalen überführt. Vor UV-Inaktivierung wurde eine Bakterienprobe entnommen und zur Kontrolle der Bakterienzahl ausplattiert. Die UV-Inaktivierung erfolgte auf Eis mittels einer UV-Lampe unter der Sterilbank für 20 min bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zur Kontrolle der Inaktivierung wurde ein Ausstrich auf LB-Agar hergestellt.

### 2.7.3. Antimikrobielle Aktivität gegenüber *L.m.*

Die für diesen Test verwendeten Bakterien wurden in einer ün-Kultur angezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und das Pellet zweimal mit 10 mL kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in einem angepassten Volumen PBS resuspendiert und die Anzahl der Bakterien bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^4$  CFU/mL eingestellt. Das verwendete humane BPI-Peptid wurde auf eine Konzentration von 50 µg/mL mit PBS verdünnt. Sowohl von der Peptidlösung als auch von der Bakteriensuspension wurden 25 µL in eine 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert und für 90 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden nach gründlichem Resuspendieren jeweils 10 µL aus dem Well entnommen und in 1:10 Verdünnungen mit PBS/0,1% Tween auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 stündiger Inkubation konnten die Kolonien gezählt werden und ein Rückschluss auf die bakterizide Wirkung des Proteins gezogen werden.

### 2.7.4. Fluoreszenzmikroskopie: Interaktion hBPI mit CFSE-Listerien

Um eine Interaktion zwischen hBPI und CFSE-markierten Listerien zu untersuchen, wurden  $7,5 \times 10^5$  CFU/mL der CFSE-Bakterien mit 10 µg/mL hBPI für 1 h inkubiert. Soweit möglich erfolgten alle Schritte im Dunkeln. Deckgläschen wurden mit einer Chitosanlösung beschichtet. Dazu wurden 20 µL Chitosan/Ethanol-Lösung (70 Teile 1% Chitosan/ 1% Essigsäure und 30 Teile 99,5%igem Ethanol) auf Deckgläschen angetrocknet. Im Anschluss wurden 50 µL der Bakteriensuspension für ca. zwei Stunden auf den Deckgläschen angetrocknet. Die anschließende Fixierung erfolgte mittels 2%igem Paraformaldehyd für 15 min.

Um unspezifische Bindungen der AK zu vermeiden, wurden die Präparate für 30 min in Blockpuffer (2% Bovines Serumalbumin, 2% Ziegen Serum/ PBS) inkubiert, bevor Erst- und Zweitantikörper (markiert mit Alexa 568) für je eine Stunde mittels Parafilm auf die Deckgläschen aufgebracht wurden. Zwischen den Färbeschritten erfolgte ein viermaliges Waschen der Objektträger, dreimal mit PBS, einmal mit VE-Wasser. Nach dem Trocknen der Präparate wurden die Deckgläser mit 15  $\mu$ L Mowiol auf einem Objektträger eingedeckelt und bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“ (Firma Zeiss, Jena) bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software „Axiovision“ der Firma Zeiss.

Antikörper	Hersteller	Konzentration
mouse anti-huBPI mAb	Hycult Biotechnology	0,5 $\mu$ g/mL
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	6,67 mg/mL
rabbit anti-mBPI pAb	AG Schnare	unbekannt
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	6,67 mg/mL

**Tabelle 14: verwendete AK für Fluoreszenzmikroskopie**

## 2.8. Statistische Auswertung

Die Daten aus den *in vivo* Experimenten wurden mittels der Software GraphPad Prism® 4.01 und mit Hilfe des „Mann-Whitney Test“ auf Signifikanz hin untersucht. *In vitro* generierte Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt und die Signifikanzanalyse mittels „Student’s unpaired T-test“ durchgeführt, wofür ebenfalls die Software GraphPad Prism® 4.01 verwendet wurde. Die Signifikanzwerte sind wie folgt dargestellt:

- \*      p<0,05
- \*\*     p<0,01
- \*\*\*    p<0,001

### 3. Material

#### 3.1. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
MACS-Puffer	1 x PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
FACS-Puffer	1 x PBS 3 % FCS 0,01 % NaN <sub>3</sub>
TAE Laufpuffer	40 mM Tris 0,1 % Essigsäure 1 mM EDTA
ELISA Waschpuffer	1 x PBS 0,05 % Tween 20
ELISA Blockpuffer	1 x PBS 1 % BSA
ELISA Verdünnungspuffer	1 x PBS 0,1 % BSA 0,05 % Tween 20

#### 3.2. Kits

verwendetes Kit	Hersteller
Diff Quik®	Medion Diagnostics, Düdingen, CH
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Mannheim, D
Maxima <sup>TM</sup> first Strand cDNA Sythesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Maxima <sup>TM</sup> Probe/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
Murine TNF ELISA Development Kit	Peptotech, Hamburg, D
Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
PeqlabGOLD RNA Isolation Kit	Peqlab, Erlangen, D

## 3.3. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Peqlab, Erlangen, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad, USA
BSA	Merck, Darmstadt, D
CFSE	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Desoxyribonuklease I	Thermo Scientific, Waltham, USA
Desoxynukleotide	Thermo Scientific, Waltham, USA
2'7'Dichlorofluorescin Diacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt, D
DMSO	Roth, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS def	PAA Laboratories, Cölbe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Eosin	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Fötales Kälber Serum (FCS Gold)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Gene Ruler 100 bp DNA Leiter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Hepes	PAA Laboratories, Cölbe, D
humanes BPI-Peptid	GeneScript, Piscataway, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Interferon $\gamma$	Immunotools, Friesoythe, D
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe, D
LB-Agar	Roth, Karlsruhe, D
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, D
LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
M-CSF	Peprtech, Hamburg, D
Naphtylethylendiamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
O-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, D
Palcam-Agar	Oxoid, Hampshire, UK
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Petidoglykan	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, D
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe, D

Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Thioglykolat	Difco, Lawrence, USA
TMB Super Sensitive Substrat	BioFX, Sur Modics, Eden Prairie, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, D
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Serva, Heidelberg, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Ultrapure Wasser	Biochrom, Berlin, D

### 3.4. Materialien

Material	Hersteller
Bechergläser	Merck, Darmstadt, D
Combitips plus (5 mL, 500 µL)	Eppendorf, Hamburg, D
Deckgläschen	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, D
ELISA Platten Nunc Maxisorp	Thermo Scientific, Waltham, USA
Flaschen (1 L, 500 mL, 250 mL,...)	Schott, Mainz, D
Impfeschlinge	VWR, Darmstadt, D
Impfösen	VWR, Darmstadt, D
Kanülen BD Microlance (20G, 24G, 26G)	BD Bioscience, Heidelberg, D
MACS Multistand Magnet	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
MACS Säulen LS	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Messzylinder	Merck, Darmstadt, D
Micro-Küvetten	Greiner, Bio-One, Solingen, D
Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	W.Schreck, Hofheim, D
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Petrischalen DC Kultur: Nunclon Surface	Thermo Scientific, Waltham, USA
Petrischalen Makrophagen Kultur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Petrischalen Agarplatten	Greiner, Bio-One, Solingen, D
Pipettenspitzen mit Filter	Peqlab, Erlangen, D
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D
15 mL Reaktionsgefäß	Greiner, Bio-One, Solingen, D
50 mL Reaktionsgefäß	Greiner, Bio-One, Solingen, D
Round Bottom FACS Tube	BD Bioscience, Heidelberg, D
Round Bottom Tube, 15 mL	BD Bioscience, Heidelberg, D
Rundkopf-Fütterungsnadel	WPI, Berlin, D
Spatel, L-Form	VWR, Darmstadt, D
Spritze (20 mL, 10 mL, 5 mL)	BD Bioscience, Heidelberg, D
Wägeschälchen	LLG, Meckenheim, D

Whirl Pak® 2-oz Organbeutel	Nasco, Fort Atkinson, USA
Zellkultureinwegartikel (Kulturflaschen, Petrischalen, Pipetten)	Greiner, Bio-One, Solingen, D
Zellkulturplatten (6-,12-,24-,48-,96-well)	Greiner, Bio-One, Solingen, D
Zellsieb Nylon 70 µm	Fisher Scientific, Schwerte, D

### 3.5. Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage R160P-D1	Sartorius, Göttingen, D
Bunsenbrenner GAS1	Schütt Biotec, Göttingen, D
Biorad C 1000 Thermal Cycler	Biorad, München, D
Colony Counter	Bio Kobe, Kobe, J
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg, D
E max Precision Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, D
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Heizblock TS-100	Peqlab, Erlangen, D
IKA-Schüttler MTS2	IKA-Werke, Staufen, D
Inkubator CO2 Auto Zero	Heraeus, Hanau, D
Inkubator	Heraeus, Hanau, D
Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick, Edison, USA
Lichtmikroskop	Zeiss-Optik, Jena, D
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, D
Neigungswaage P1000	Mettler, Gießen, D
Olympus BX 51 Systemmikroskop	Olympus GmbH, Hamburg, D
Pipetboy	IBS Integra Bioscience, Fernwald, D
pH-Meter pH 523	WTW, Weilheim, D
Photometer "Bio"	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rotator	Peqlab, Erlangen, D
RotorgeneTM6000	Qiagen, Hilden, D
Schwenktisch Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, D
Spectrophotometer NanoDrop-1000	Peqlab, Erlangen, D
Sterilbank Hera Safe KS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Tecnowflow	Integra Bioscience, Fernwald, D
Stericup®Filter Units	Millipore, Schwabach, D
UV-Lampe MinUVIS Duo	Duratec, Hockenheim, D
Vortex- Schüttler VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Wasserbad	WTW, Weilheim, D
Zentrifuge GS 15R	Beckman, Krefeld, D
Zentrifuge MIKRO 200R	Hettich, Tuttlingen, D

Zentrifuge Mini	LMS, Tokyo, J
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Rotanta/RPC	Hettich, Tuttlingen, D

### 3.6. Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
AxioVision	Zeiss, Jena, D
Cell Quest Pro	BD Bioscience, Heidelberg, D
Flow Jo	Tree Star, Ashland, USA
Soft Imaging System	Olympus GmbH, Hamburg, D
Soft Max Pro	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Graph Pad Prism 4.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Omega Data Analysis	BMG Labtech, Ortenberg, D

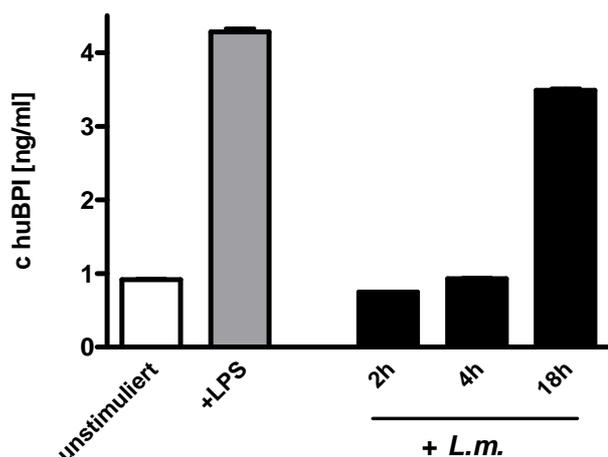
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Humanes BPI und Listerien

Ein Abwehrmechanismus nGr gegen eine bakterielle Infektion ist die Produktion und Sekretion antimikrobieller Proteine, darunter auch humanes BPI (hBPI). hBPI wird in erster Linie in den azurophilen Granula von nGr gespeichert und auf Aktivierung der Zellen hin, sezerniert (Calafat, Janssen et al. 2000). Schon seit über 30 Jahren ist bekannt, dass hBPI in der Lage ist an gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) zu binden und dabei eine antimikrobielle Wirkung zu entfalten (Weiss, Elsbach et al. 1978). Über die Wirkung von hBPI auf grampositive Bakterien, insbesondere *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) lagen bisher keine Erkenntnisse vor. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob humane nGr mit einer gesteigerten BPI-Expression auf eine Stimulation mit *L.m.* (Stamm EGD) reagieren, ob hBPI eine direkte Interaktion mit *L.m.* eingeht und ob hBPI in der Lage ist, das Wachstum von *L.m.* zu hemmen oder sogar die Bakterien abzutöten.

#### 4.1.1. Humane nGr reagieren auf *L.m.*-Stimulation mit BPI-Expression

In einem ersten Experiment (durchgeführt von Nina Strüßmann) wurden aus humanem Vollblut isolierte nGr mit UV-inaktivierten *L.m.* stimuliert. Durch die UV-Inaktivierung ist eine kontrollierte Stimulation auch über einen längeren Zeitraum (hier 18 h) möglich, mit dem Vorteil, dass nahezu alle immunogenen Einzelkomponenten der Bakterien erhalten bleiben. Als Positivkontrolle wurde LPS verwendet. Nach einer Inkubation von 2 h, 4 h und 18 h wurde in den Überständen der stimulierten Zellen die Konzentration von hBPI mittels ELISA bestimmt.



**Abbildung 4-1: humane nGr reagieren mit verstärkter BPI-Expression auf Stimulation mit *L.m.***

Humane nGr wurden aus frischem, humanem Vollblut (entnommen mittels CPDA Monovetten) über eine Dextran-sedimentation und einen Percoll-Dichtegradienten aufgereinigt. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und „Diff-Quik“ Färbung kontrolliert (94,5% Reinheit).  $4 \times 10^6$  Zellen /mL wurden im 12-well Format mit LPS (100 ng/mL; +LPS grauer Balken) sowie UV-inaktivierten *L.m.* (MOI 10; + *L.m.* schwarze Balken) stimuliert oder unstimuliert (weiße Balken) belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein zellfreier Kulturüberstand gewonnen und hBPI in den Überständen mittels eines humanen BPI ELISAs bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Die Daten wurden der Masterarbeit von Nina Strüßmann (AG Schnare) entnommen.

Durch die Reaktion der Zellen auf LPS zeigt sich, dass diese funktional sind und erwartungsgemäß mit einer gesteigerten BPI-Freisetzung reagieren. Auch die Stimulation mit UV-inaktivierten Listerien führt zu einer zeitabhängigen Steigerung der hBPI-Sekretion, die ihren Höhepunkt nach 18 h erreicht (Abbildung 4–1).

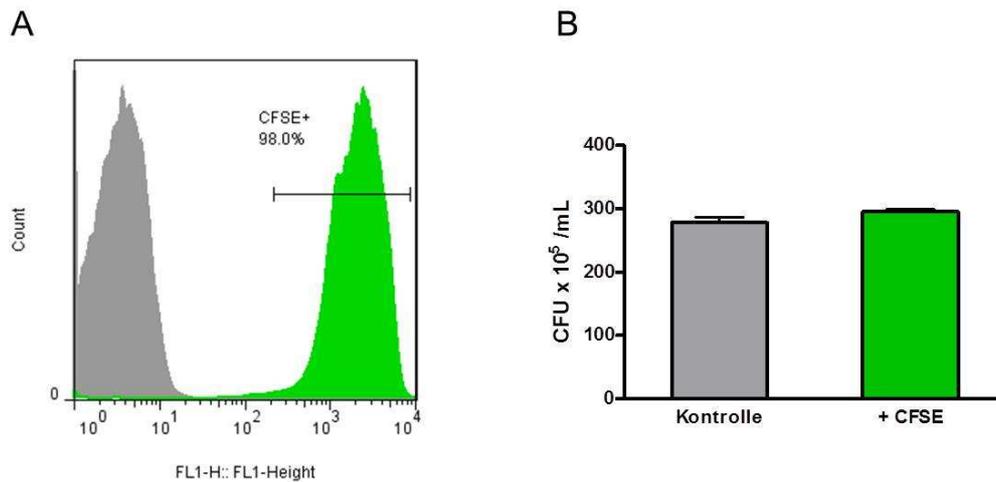
Humane nGr setzen nach Kontakt mit *L.m.* BPI frei, so dass sich die Frage stellt, ob es zu einer direkten Interaktion des hBPI mit den *L.m.* kommt. Nach bisherigem Kenntnisstand bindet hBPI lediglich an die Zellmembran gramnegativer Bakterien.

#### 4.1.2. Humanes BPI interagiert mit Listerien

Um die Frage zu beantworten, ob es zu einer direkten Interaktion zwischen hBPI und *L.m.* kommt, wurden CFSE-markierte *L.m.* mit hBPI-Protein, das aus humanen nGr aufgereinigt wurde, inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zunächst musste sichergestellt werden, dass die Markierung von *L.m.* mit CFSE effektiv ist und keinen Einfluss auf das Überleben der Bakterien nimmt.

#### 4.1.3. Effektivität der CFSE-Markierung und Einfluss auf die Vitalität

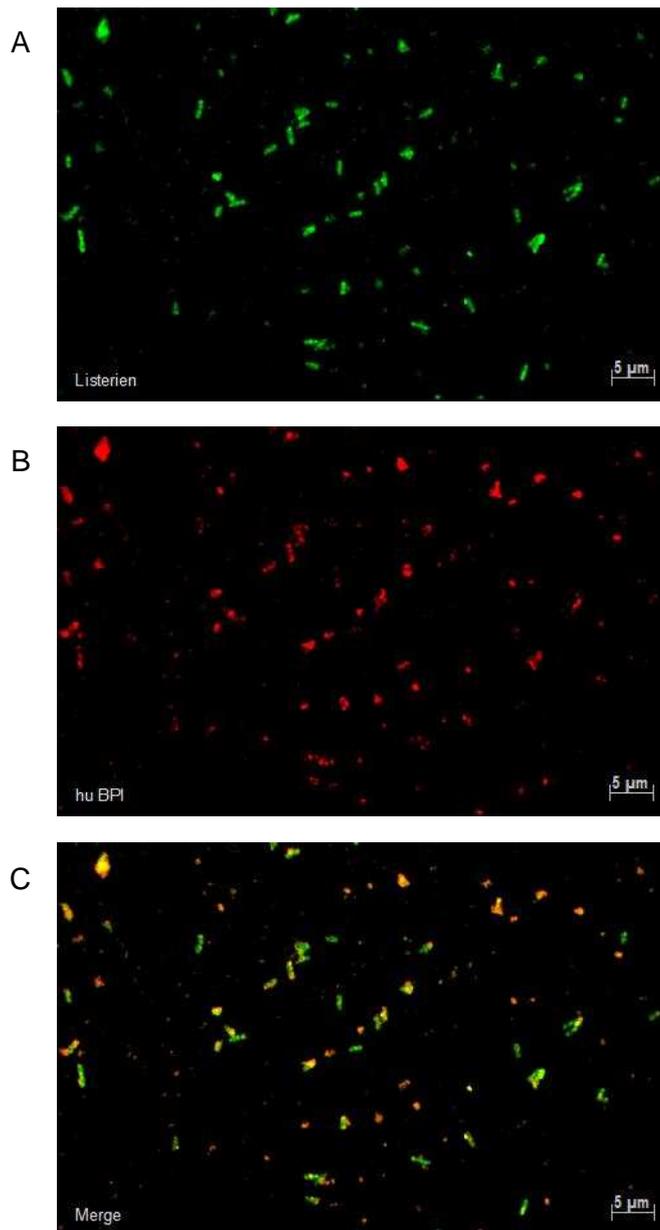
Im ersten Schritt wurde ein Protokoll für die Markierung von *L.m.* mit CFSE etabliert. Entscheidend dabei waren zwei Aspekte. Zum einen sollte die Markierung möglichst effizient funktionieren, um nach Inkubation mit hBPI oder Infektion von nGr alle Bakterien detektieren zu können; zum anderen durfte der Markierungsprozess keinen Einfluss auf die Vitalität von *L.m.* nehmen. Um letzteres zu untersuchen, wurden die Bakterien vor und nach dem Färbeprotokoll auf LB-Agar ausplattiert.



**Abbildung 4-2: CFSE Färbung von *L.m.***

Eine  $\bar{u}N$ -Kultur von *L.m.* wurden mit CFSE ( $10 \mu\text{M}$ ) für 30 min inkubiert. Nach stringentem Waschen, um überschüssiges CFSE zu entfernen, wurde die Effektivität der Färbung mittels Durchflusszytometrie überprüft (grünes Histogramm). Als Kontrolle (graues Histogramm) dienten unmarkierte *L.m.* (A). Vor und nach dem Anfärben der Bakterien wurde zur Kontrolle der Viabilität ein Inokulum ausgestrichen. Ungefärbte Bakterien sind als grauer Balken (Kontrolle) gezeigt, CFSE-markierte Bakterien (+CFSE) sind als grüner Balken dargestellt (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Wie in Abbildung 4–2A deutlich zu erkennen, konnte unter Optimalbedingungen gewährleistet werden, dass durch die Markierung mit CFSE 98% der *L.m.* gefärbt wurden. Die Bakterien wurden durch diesen Markierungsprozess zudem nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt (Abbildung 4–2B) und konnten somit sowohl für Analysen im Fluoreszenzmikroskop als auch für die Infektion von nGr verwendet werden.



#### Abbildung 4-3 Fluoreszenzmikroskopie *L.m.* und hBPI

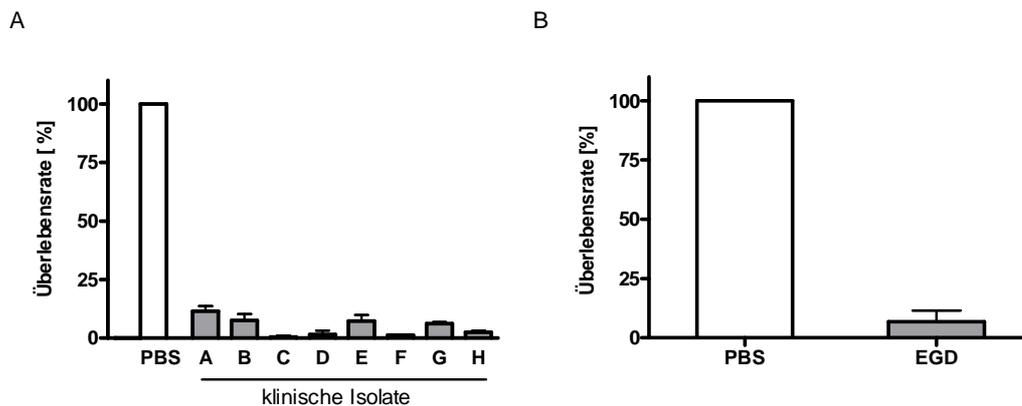
$7,5 \times 10^6$  *L.m.* wurden mit CFSE markiert und mit  $10 \mu\text{g/mL}$  hBPI für 60 min inkubiert. Die Suspension wurde auf Chitosan beschichteten Cover Slips getrocknet und fixiert. Die Färbung erfolgte mit einem Maus anti-human BPI mAk sowie einem Sekundär-Ak Ziege anti-Maus gekoppelt mit Alexa 568. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 60 x Immersionsobjektiv am Fluoreszenzmikroskop.

(A) grün: Listerien, Aufnahme im FITC Kanal; (B) rot: hu BPI, Aufnahme im PE-Kanal; (C) Überlagerung von A und B: Merge

Eine Interaktion zwischen hBPI-Protein und *L.m.* ist deutlich zu erkennen. Während der Inkubation kommt es offensichtlich zu einer Anlagerung des hBPIs an die Bakterien. Zudem ist zu sehen, dass es durch die Anlagerung des Proteins zu einer Veränderung der Form der Bakterien kommt (Abbildung 4–3).

## 4.2. Die antimikrobielle Wirkung von humanem BPI gegen Listerien

Im folgenden Versuch wurde die Wirkung von synthetisiertem hBPI- Peptid (hBPI<sub>P</sub>) auf das Wachstumsverhalten von *L.m.* analysiert. Das Peptid stellt eine 27 Aminosäure lange Sequenz des kompletten BPI-Proteins dar, die eine N-terminale antimikrobielle Domäne des Proteins enthält (Ooi, Weiss et al. 1991). Es wurden insgesamt 14 verschiedene Isolate aus an Listeriose erkrankten Patienten vom „Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg“ zur Verfügung gestellt und mit hBPI<sub>P</sub> inkubiert.



**Abbildung 4-4: humanes BPI-Peptid hat antimikrobielle Wirkung gegenüber klinischen Listerienisolaten und gegenüber *L.m.* Stamm EGD**

Klinische Isolate (A; graue Balken) aus erkrankten Patienten (A-H) bzw. der Listerienstamm EGD (B; graue Balken) wurden in LB-Medium üN kultiviert, auf eine Bakterienzahl von  $2 \times 10^4$ /mL eingestellt und für 90 min mit humanem BPI-Peptid in einer Konzentration von  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten ausgestrichen, nach 24 stündiger Inkubation ausgezählt und daraus die CFU/mL berechnet. Die jeweilige PBS-Kontrolle (weißer Balken) wurde als 100 % Überlebensrate gesetzt und das prozentuale Überleben der Bakterien anhand der CFU/mL in Bezug zur Kontrolle kalkuliert. Gezeigt sind acht repräsentative Isolate von getesteten 14 (A) bzw. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen (B).

Durch hBPI<sub>P</sub> kommt es bei den acht dargestellten Isolaten zu einer deutlichen Hemmung des Bakterienwachstums bzw. zu einem Abtöten der Bakterien (Abbildung 4-4A). Im Mittel reduziert hBPI<sub>P</sub> die Anzahl der überlebenden *L.m.* auf weniger als 4,8 %. Auch das Wachstum der anderen sechs untersuchten Isolate wurde deutlich inhibiert (Daten nicht gezeigt). Der im folgenden Teil dieser Arbeit verwendete Stamm *L.m.* EGD wird ebenfalls durch hBPI<sub>P</sub> in seinem Wachstum auf eine Überlebensrate von 6,9 % gehemmt (Abbildung 4-4B). In unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass auch das Gesamtprotein von hBPI, aufgereinigt aus humanen

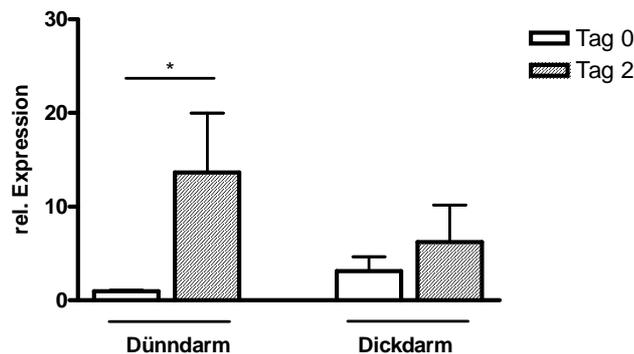
Granulozyten, in der Lage ist, das Wachstum von *L.m.* zu inhibieren, wenn auch bei gleicher Konzentration mit geringerer Effektivität (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund der vielversprechenden Daten, die eine deutliche antimikrobielle Wirkung von hBPI-Protein wie auch hBPI<sub>p</sub> auf *L.m.* zeigten, sollte im Folgenden die Funktion von BPI *in vivo* im Rahmen eines murinen Listeriose-Modells untersucht werden.

### 4.3. Die Rolle von murinem BPI im Listeriose Modell

#### 4.3.1. Induktion der Expression von BPI RNA im Darm infizierter Mäuse

Zu Beginn sollte untersucht werden, ob die intragastrale (i.g.) Infektion mit *L.m.* zur Induktion der Expression von BPI im Darmepithel führt. Dazu wurden Wildtyp (WT)-Mäuse i.g. mit *L.m.* infiziert und die Expression von BPI im Darmepithel zwei Tage nach der Infektion mittels quantitativer Real-time-PCR untersucht.



**Abbildung 4-5: Erhöhte mBPI Expression im Dünndarm nach Listerieninfektion**

WT-Mäuse wurden intragastral mit  $2,5 \times 10^8$  CFU *L.m.* Stamm EGD infiziert. An Tag 2 nach Infektion (gestreifte Balken) wurde den Mäusen sowohl Dün- als auch Dickdarm entnommen und RNA aus den Geweben aufgereinigt. Nach dem Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA wurde die mBPI-Expression mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt und auf das Referenzgen PBGD normalisiert. Als Kontrolle diente Darmgewebe, welches von nicht infizierten Mäusen isoliert wurde (Tag 0, weiße Balken). Dargestellt ist ein Experiment mit  $n=4$ .

Die quantitative Real-time-PCR-Analyse zeigt, dass es nach einer i.g. Infektion mit *L.m.* zu einer verstärkten BPI-mRNA Produktion in den Zellen des Dünndarms kommt. Im Vergleich zu uninfizierten Mäusen nimmt die Menge der BPI mRNA um das fast Dreizehnfache zu. Für den Dickdarm lässt sich dieser Effekt nicht beobachten. Hier

zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Expression von BPI mRNA zwischen gesunden und infizierten WT Mäusen.

Eine i.g. Infektion mit *L.m.* induziert die Expression von BPI im Darmepithel.

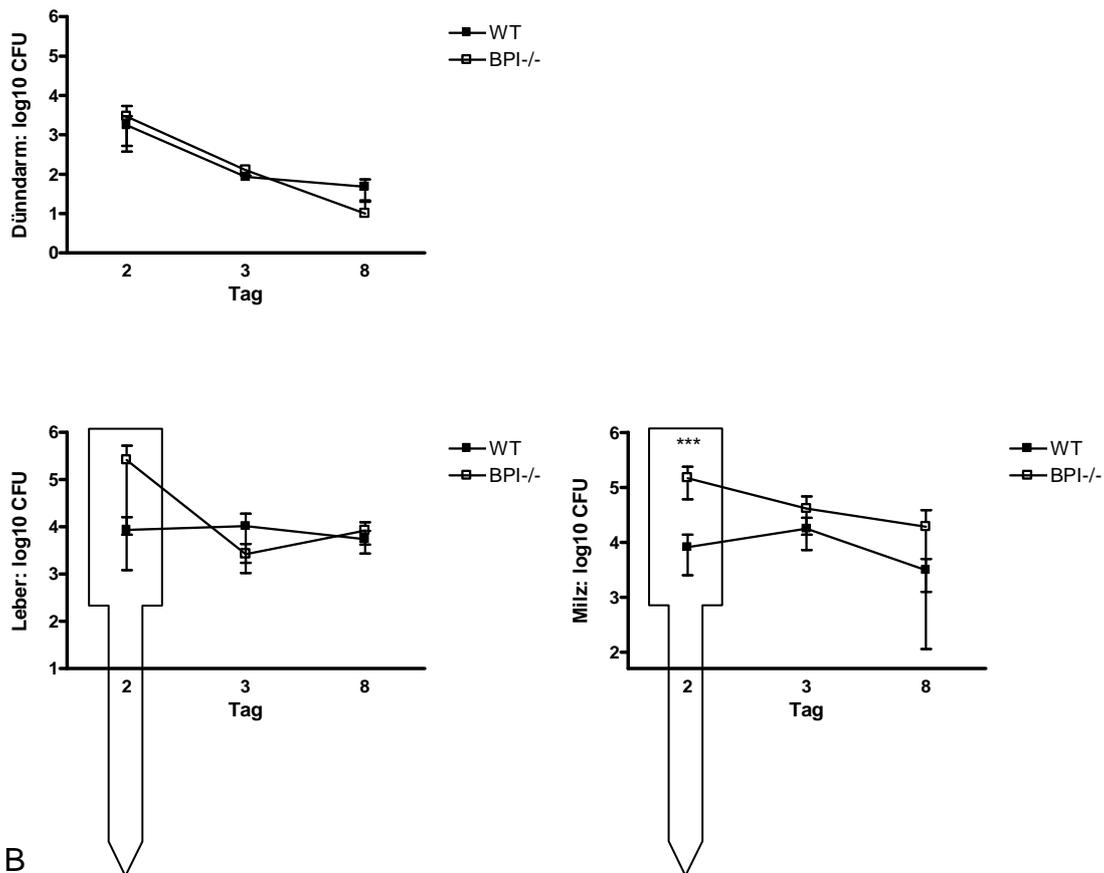
Nachfolgend sollte die Funktion von murinem (mBPI) *in vivo* im Laufe einer Listerieninfektion untersucht werden. Da die Expression von mBPI unter anderem für Darmepithelzellen nachgewiesen ist (Canny, Cario et al. 2006) und wie oben dargestellt, nach *L.m.*-Infektion induziert wird, wurde für das folgende *in vivo* Experiment die i.g.-Infektionsroute gewählt. Um die Bedeutung von BPI während der Infektion zu bewerten, wurden WT-Mäuse mit einer BPI-defizienten Mauslinie (BPI<sup>-/-</sup>) verglichen.

#### 4.3.2. Bakterienlast in Leber, Milz und Dünndarm nach intragastraler Infektion

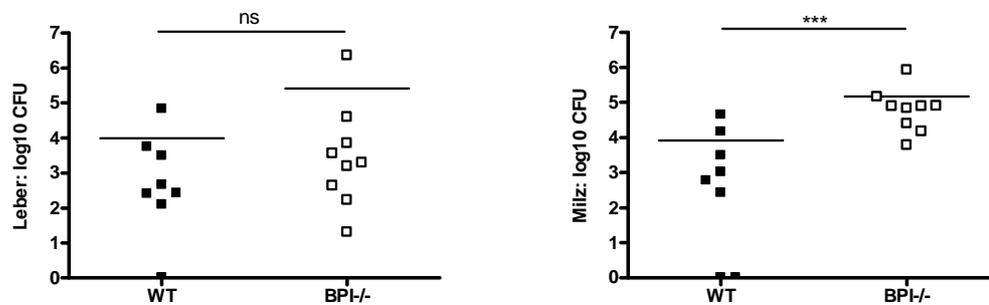
Die i.g.-Infektion mit *L.m.* Stamm EGD stellt die physiologische Infektionsroute dar, über die *L.m.* auch den Menschen infizieren. Jedoch werden hierfür im Modell der murinen Listeriose relativ hohe Bakterien Dosen benötigt, da auf Grund der Wirtsspezifität von *L.m.* die Bakterien nur mit niedriger Affinität mit dem Darmepithel interagieren können. Es wurden sowohl WT- als auch BPI<sup>-/-</sup> Mäuse in einer Gruppengröße von jeweils vier bis fünf Tieren infiziert. Da die Funktion von BPI im Rahmen der angeborenen Immunantwort zu finden ist, wurden als Analysetage Tag zwei und Tag drei nach Infektion gewählt. Des Weiteren wurden die Mäuse an Tag acht untersucht. Zu diesem Zeitpunkt übernimmt die adaptive Immunantwort über antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen die Kontrolle der Bakterien (Busch, Kerksiek et al. 1999).

An den jeweiligen Analysetagen wurden Milz, Leber und Dünndarm der WT- als auch der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse auf ihre Bakterienlast hin untersucht. Die Menge der gezählten CFUs in den Organen gibt Aufschluss darüber, inwieweit das Immunsystem des jeweiligen Mausstamms dazu in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren.

A



B



**Abbildung 4-6: Verlauf einer intragastralen Listerieninfektion in WT und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen**

WT (schwarze Quadrate) und BPI<sup>-/-</sup> Mäuse (weiße Quadrate) wurden intragastral mit  $2,5 \times 10^8$  CFU *L.m.* Stamm EGD infiziert. Nach zwei, drei und acht Tagen wurden Homogenisate aus Dünndarm, Leber und Milz hergestellt und verschiedene Verdünnungsstufen auf Palcam-Agarplatten (Dünndarm) bzw. LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die CFU/Organ unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen berechnet. (A) CFU im Verlauf der Infektion an Tag zwei, drei und acht. Dargestellt sind die Mittelwerte des Logarithmus 10 der CFU mit den Standardabweichungen; (B) CFU Leber und Milz an Tag zwei der Infektion; dargestellt sind die Einzelwerte des Logarithmus 10 der CFU mit den Mittelwerten zweier unabhängiger Versuche mit jeweils  $n=4$  für WT,  $n=5$  und  $n=4$  für BPI<sup>-/-</sup> Mäuse.

Die Analyse der CFUs im Dünndarm beider Mausstämmen zeigt einen identischen Infektionsverlauf zwischen WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 4-6A). Deutlich ist zu erkennen, dass die Bakterienlast über die Dauer der Zeit abnimmt.

Die Analyse der CFUs der Leber zeigt an Tag drei und Tag acht kaum Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen, an Tag zwei scheinen BPI<sup>-/-</sup> Mäuse unter einer höheren Bakterienlast zu leiden, wobei auf Grund der großen Streuung innerhalb der Gruppe keine Signifikanz nachzuweisen ist (Abbildung 4-6A und Abbildung 4-6B).

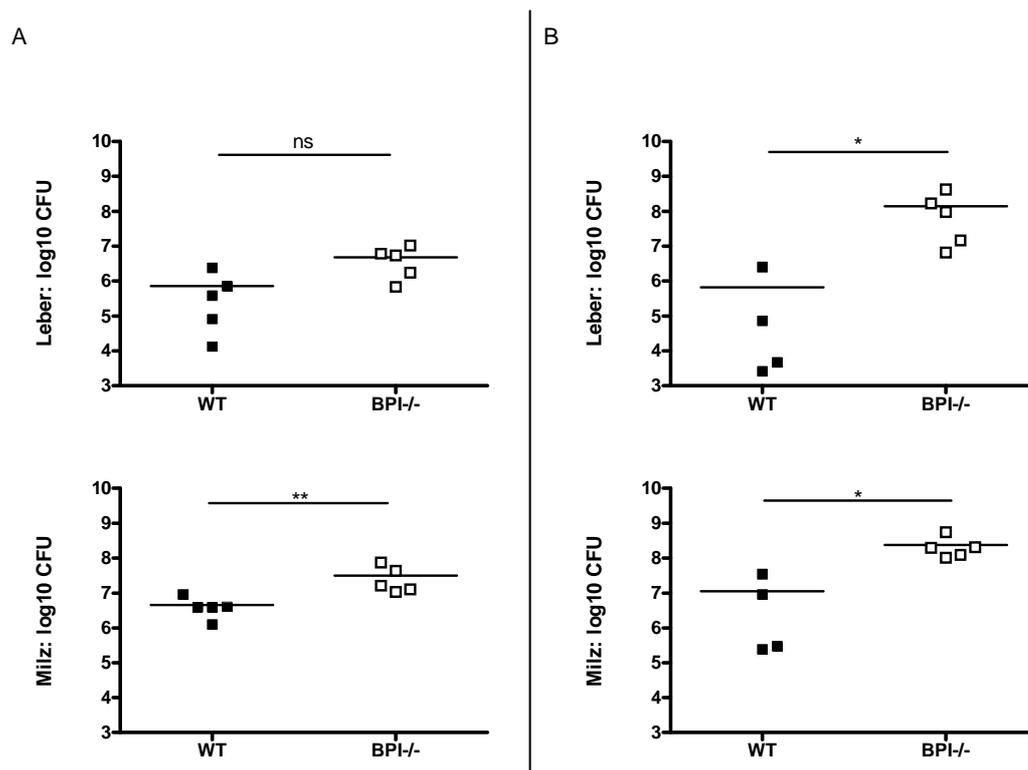
Für die Milz zeigt sich ein der Leber ähnliches Bild für Tag drei und acht. Allerdings sind an Tag zwei signifikante Unterschiede in der Bakterienlast zu Ungunsten der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse zu erkennen. Diese weisen eine um das circa 20-fach erhöhte Bakterienlast in der Milz auf (Abbildung 4-6A und 4-6B).

#### 4.4. Die Funktion vom BPI im Listeriose Modell nach intravenöser Infektion

Um zu analysieren, welchen Beitrag Darmepithel-exprimiertes BPI für die höhere Suszeptibilität der BPI-defizienten Mäuse hat, wurde eine intravenöse (i.v.) Applikationsstrategie der *L.m.* gewählt. Bei dieser Applikationsform wird das Darmepithel umgangen, da die Bakterien direkt in die Blutbahn injiziert werden. Für die i.v. Infektion musste eine geringere Bakterienlast gewählt werden, da die Bakterien über das Blut schneller und effektiver Zielzellen und Gewebe infizieren können.

##### 4.4.1. Bakterienlast in verschiedenen Organen nach intravenöser Infektion

Es wurden pro Gruppe jeweils fünf WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäuse infiziert. Auch in diesem Versuch wurden als Analysetage Tag zwei und drei nach Infektion gewählt. Da bei einer i.v. Infektion *L.m.* ebenfalls Milz und Leber infizieren, wurden die CFUs in diesen Organen bestimmt.



**Abbildung 4-7: BPI-/- Mäuse zeigen im Vergleich zu WT-Mäusen nach intravenöser Infektion mit Listerien eine höhere Bakterienlast in Milz und Leber**

WT und BPI-/- Mäuse wurden intravenös mit  $5 \times 10^3$  CFU *L.m.* Stamm EGD infiziert. Nach zwei (A) bzw. drei Tagen (B) wurden Homogenisate aus Leber und Milz hergestellt und verschiedene Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die CFU/Organ berechnet. Dargestellt sind die Einzelwerte des Logarithmus 10 der CFU mit den Mittelwerten. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen mit  $n=5$  und  $n=4$  (WT Tag 3) ist gezeigt.

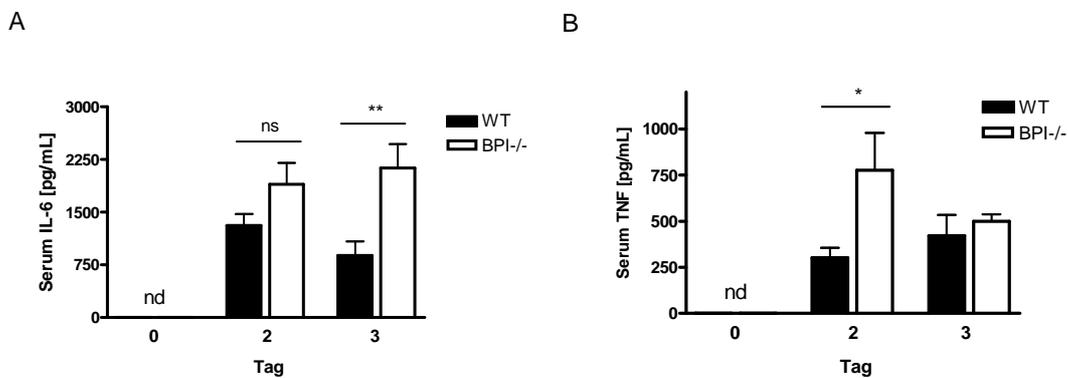
Im Gegensatz zur i.g. Infektion war bei der i.v. Infektion eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustands der BPI-/- Mäuse im Verlauf der Infektion im Vergleich zu WT- Mäusen zu erkennen. Die BPI-/- Mäuse zeigten sowohl tränende Augen als auch nekrotische Ohrmuscheln. Allerdings konnte in einem Vorversuch mit Analysetag fünf gezeigt werden, dass auch bei der i.v.-Infektion sowohl WT- Mäuse als auch BPI-/- Mäuse in der Lage sind, die Infektion zu kontrollieren und nicht daran versterben. In diesem Fall wurde Tag fünf anstatt Tag acht gewählt, da durch die direkte Injektion in die Schwanzvene von einer beschleunigten Etablierung und Beseitigung der Listerieninfektion auszugehen ist.

Die CFUs an Tag zwei und Tag drei nach i.v. Infektion zeigen einheitlich das Bild einer höheren Bakterienlast in BPI-/- Mäusen (Abbildung 4-7). Lediglich der Unterschied an Tag zwei bezogen auf die Leber ist als nicht signifikant zu bewerten (Abbildung 4-7A).

An Tag zwei zeigt sich eine um knapp eine Logstufe erhöhte Bakterienlast in den Organen der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse. An Tag drei steigert sich diese Differenz auf zwei Logstufen (Leber) oder eine Logstufe (Milz) (Abbildung 4-7B).

#### 4.4.2. TNF- und IL-6 Expression im Serum infizierter Mäuse

Zudem wurde den infizierten WT- Mäusen wie auch BPI<sup>-/-</sup> Mäusen Blut entnommen, um im Serum die Entzündungsantwort über die Messung der Zytokinlevel von TNF und IL-6 zu bestimmen. Diese pro-inflammatorischen Zytokine werden im Rahmen der ersten Abwehrreaktion gegen eine Listerieninfektion zum Beispiel von inflammatorischen Monozyten und Makrophagen produziert (Havell 1989, Hoge, Yan et al. 2013).



**Abbildung 4-8: TNF- und IL-6 Konzentration im Serum infizierter Mäuse**

WT (schwarze Balken) und BPI<sup>-/-</sup> Mäuse (weiße Balken) wurden intravenös mit  $5 \times 10^3$  CFU *L.m.* Stamm EGD infiziert. An Tag null, zwei und drei wurde im Serum der Mäuse mittels ELISA die IL-6 (A) sowie die TNF Konzentration (B) bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen mit je n=5 und n=4 (WT Tag 3). nd: nicht detektierbar

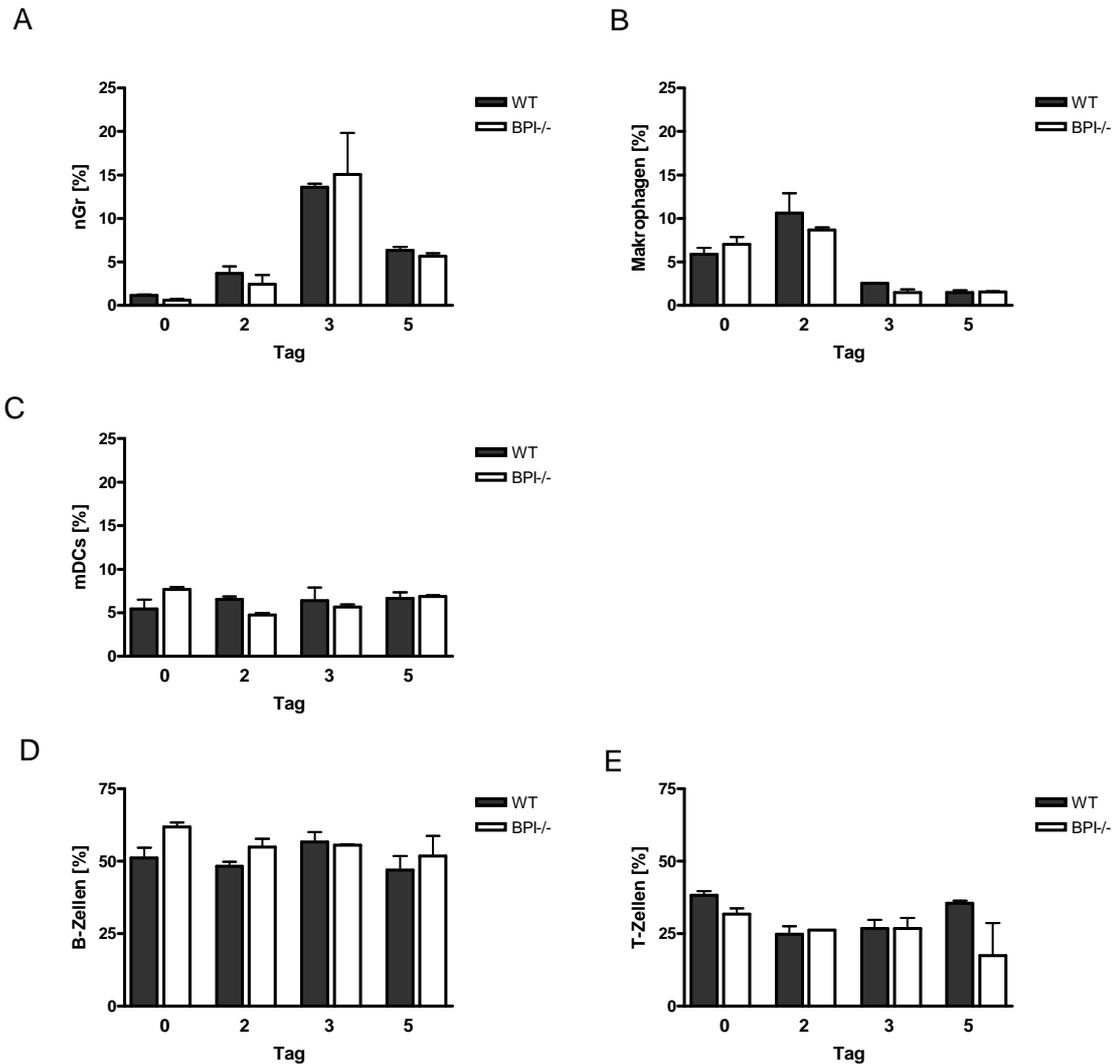
Sowohl für WT- Mäuse als auch BPI<sup>-/-</sup> Mäuse zeigt sich an Tag zwei und Tag drei nach i.v. Infektion mit *L.m.* eine Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 im Serum (Abbildung 4-8). Die Menge an IL-6 im Serum der BPI-defizienten Mäuse ist an Tag drei der Infektion signifikant um das circa 2,5 fache höher als in WT-Mäusen (Abbildung 4-8A). Für TNF zeigt sich an Tag zwei nach Infektion ein ähnliches Bild. Die TNF Menge im Serum der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse ist im Vergleich zu der im Serum der WT- Mäuse um das circa 2,7 fache erhöht (Abbildung 4-8B).

---

Diese Experimente zeigen, dass BPI-defiziente Mäuse susceptibler gegenüber einer Infektion mit *L.m.* sind. Dies ist unabhängig vom Darmepithel.

#### 4.4.3. Analyse der einzelnen Zellpopulationen der Milz im Listeriose Modell

*L.m.* gelangt bei einer i.v.-Infektion als erstes in die Milz, wird dort von Zellen der Marginalzone aus dem Blut gefiltert und von DCs, Makrophagen und nGr phagozytiert (Williams, Schmidt et al. 2012). Deshalb wurden die Milzen von jeweils zwei Mäusen pro Gruppe im Verlauf der Infektion auf ihre einzelnen Zellpopulationen hin untersucht. Als Referenzgrößen wurden die Zellpopulationen der Milz von uninfizierten WT-Mäusen als auch BPI-/- Mäusen analysiert. Damit konnte zum einen gezeigt werden, ob die BPI-Defizienz grundsätzlich zu einer Veränderung der Milzzellpopulationen führt, zum anderen wird deutlich, ob es durch die Infektion mit *L.m.* zu einer Veränderung der Rekrutierung der Zellpopulationen kommt. Analysiert wurde mittels Durchflusszytometrie die Menge an Makrophagen, mDCs, nGr und T- und B-Zellen.



**Abbildung 4-9: Milzzellpopulationen von WT und BPI-/- Mäusen im Verlauf einer Listeriose**

WT (schwarze Balken) und BPI-/- Mäuse (weiße Balken) wurden i.v. mit  $5 \times 10^3$  CFU *L.m.* Stamm EGD infiziert. Uninfizierten Tieren (Tag 0) als auch infizierten (Tag 2, 3, 5) wurde die Milz entnommen, eine Einzelzellpopulation hergestellt und mittels folgender Ak die Zellpopulationen der Milz in der Durchflusszytometrie untersucht:  $\alpha$ Gr1/ $\alpha$ CD11b für nGr (A),  $\alpha$ F4/80/ $\alpha$ CD11c für Makrophagen (B),  $\alpha$ MHCII/ $\alpha$ CD11c für mDCs (C) sowie  $\alpha$ CD3e für T-Zellen (D) und  $\alpha$ CD19 für B-Zellen (E). Gezeigt sind die Anzahl der Zellen in Prozent zur Gesamtmilzzellpopulation, die auf 100% gesetzt wurde. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse aus einem von zwei unabhängigen Versuchen.

Für die Zellpopulation der nGr zeigt sich im Verlauf der Infektion eine deutliche Steigerung der Zellzahl an Tag drei, die bis Tag fünf wieder abnimmt, aber im Vergleich zum Ausgangswert noch erhöht bleibt (siehe Abbildung 4-9A). Bei Makrophagen wird an Tag zwei eine geringfügige Zunahme der Zellen durch die Infektion induziert, die jedoch bereits an Tag drei auf ein Niveau unterhalb des

Ausgangswertes absinkt (siehe Abbildung 4-9B). Für mDCs, die ebenfalls an erster Abwehrlinie gegen eine Listerieninfektion stehen, zeigt sich keine Veränderung (Abbildung 4-9C). T- und B-Zellen bleiben in ihrem Anteil an Milzzellen ebenfalls konstant (Abbildung 4-9D/E). Hervorzuheben ist, dass es für keine der untersuchten Zellpopulationen Unterschiede zwischen WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen gibt, weder in uninfizierten noch in infizierten Tieren.

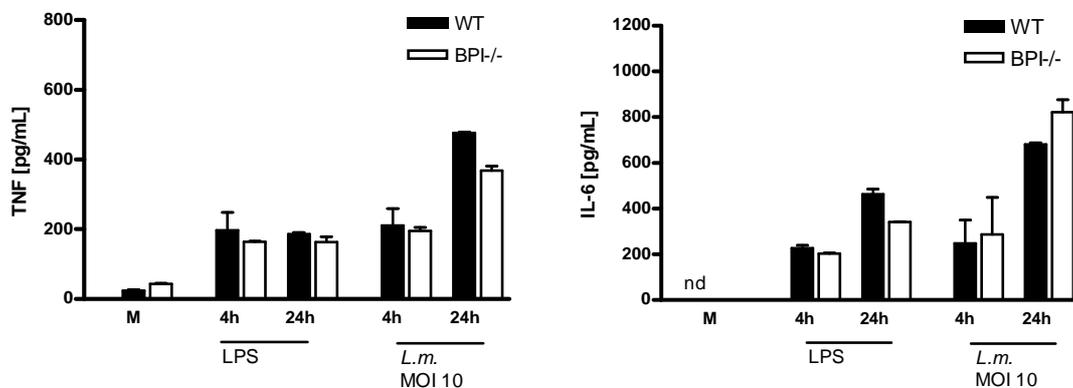
Im Infektionsverlauf rekrutieren BPI-/- Mäuse genauso viele nGr und Makrophagen in die Milz wie WT-Mäuse.

#### 4.5. Übertragung der *in vivo* Infektion auf *in vitro* Modelle

Ziel war im nächsten Schritt das Ergebnis aus den *in vivo* Experimenten, nämlich eine deutliche Benachteiligung der BPI-/- Maus während einer Listeriose, mittels *in vitro* Experimenten detaillierter zu entschlüsseln. Um herauszufinden, welche Zellen für diesen Effekt verantwortlich sind, wurde in den folgenden Experimenten versucht, mittels *in vitro* Stimulation bzw. Infektion von Zellen mit *L.m.* die zu Grunde liegenden Unterschiede bei Milzzellen, Makrophagen, mDCs und nGr aufzudecken.

#### 4.6. Stimulation von Milzzellen aus WT und BPI-/- Mäusen

Da *L.m.* zunächst in der Milz der infizierten Tiere eine Infektion etabliert, wurden WT-Mäusen als auch BPI-/- Mäusen die Milzen entnommen und *in vitro* mit LPS als Positivkontrolle und UV-inaktivierten *L.m.* in verschiedenen MOIs stimuliert. Im Anschluss wurde die Zytokinantwort der Zellen analysiert.



**Abbildung 4-10: Milzzellstimulation mit LPS und *L.m.***

Aus WT- (schwarze Balken) und BPI-/- Milzen (weiße Balken) wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und im 12-well Format unstimuliert belassen (M), mit LPS (100 ng/mL) (LPS) oder UV-inaktivierten *L.m.* (MOI 10) (*L.m.* MOI 10) stimuliert. Nach Inkubation für vier bzw. 24 h wurde in den gewonnenen Überständen die Konzentration von TNF- und IL-6 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängig durchgeführten Experimenten. nd: nicht detektierbar

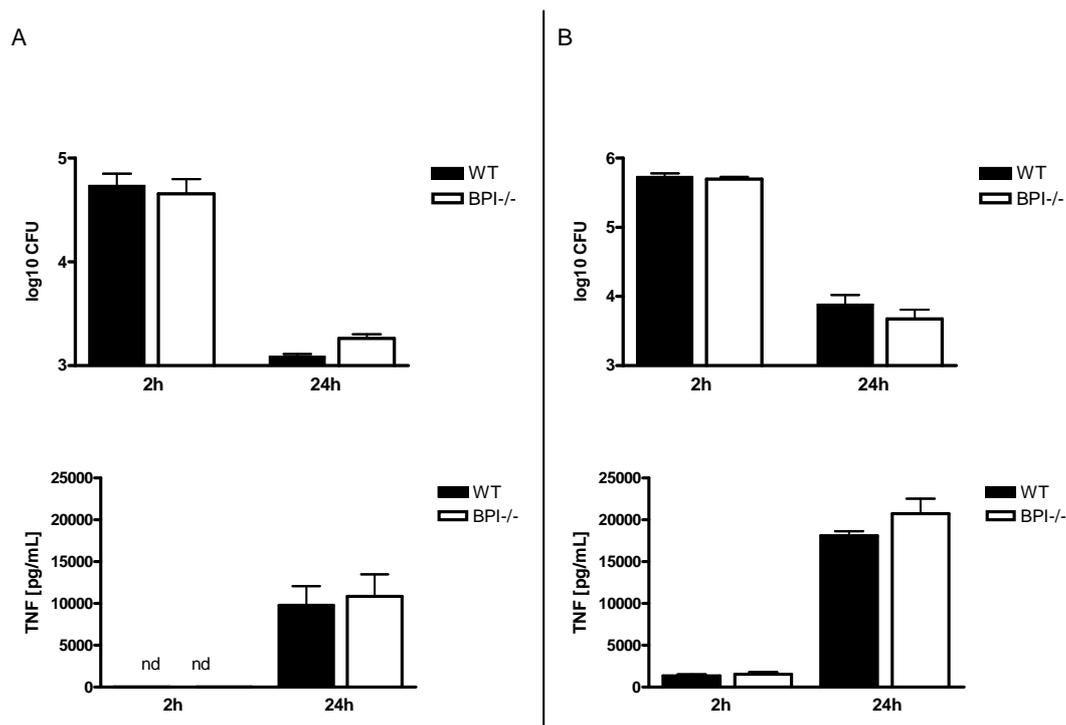
Nach Stimulation mit LPS bzw. UV-inaktivierten Listerien ist für die Milzzellen beider Genotypen eine deutliche Induktion der TNF- als auch IL-6 Produktion messbar. Zudem ist für beide Zytokine nach 24 stündiger Stimulation mit Bakterien eine deutliche Zunahme der sezernierten Menge im Vergleich zum vier Stunden Wert zu erkennen (Abbildung 4-10). Auch bei einer eingesetzten MOI von 50 zeigen sich keine Unterschiede was die Zytokinproduktion der Milzzellen der beiden Genotypen betrifft (Daten nicht gezeigt), so dass die eingesetzte MOI der verwendeten Bakterien eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Des Weiteren wurde die IFN $\gamma$ - Sekretion bestimmt, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen aufwies (Daten nicht gezeigt).

Weder die Anzahl der rekrutierten Milzzellen unter der Infektion noch die Responsivität der Milzzellen in *in vitro*-Stimulationsexperimenten unterscheidet sich zwischen WT- und BPI $^{-/-}$  Mäusen.

#### 4.7. *In vitro* Infektion von Makrophagen und DCs mit Listerien

Sowohl Makrophagen als auch DCs stehen an erster Linie bei der Abwehr einer Listerieninfektion und sind zudem in der Lage, *L.m.* effektiv zu phagozytieren. Dabei ist bekannt, dass murine Makrophagen im Gegensatz zu mDCs kein BPI exprimieren (Eckert, Wittmann et al. 2006). Deshalb sind mDCs geeignete Kandidaten, um den Unterschied im Infektionsverlauf von BPI $^{-/-}$  im Vergleich zu WT-Mäuse zu erklären.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aus dem Knochenmark von WT- Mäusen als auch BPI $^{-/-}$  Mäusen Makrophagen und mDCs *ex vivo* generiert. Mittels eines Gentamicin-Schutz-Tests lassen sich in diesem Versuch zwei verschiedene Fragestellungen beantworten: Zum einen, ob sowohl Makrophagen als auch mDCs aus WT- Mäusen als auch BPI $^{-/-}$  Mäusen zu gleicher Phagozytoseleistung fähig sind, zum anderen, wie effektiv diese Zellen die intrazellulären Bakterien abtöten. Um die Phagozytose zu untersuchen, werden die Anzahl der intrazellulären Bakterien nach zwei Stunden analysiert, während der 24h-Wert über die Fähigkeit, *L.m.* abzutöten, Auskunft gibt. Zudem konnte in den Überständen die TNF-Produktion der jeweiligen Zellen bestimmt werden.



**Abbildung 4-11: Makrophagen und DCs aus WT und BPI-/- Mäusen sind in der Lage, Listerien abzutöten**

Knochenmarkszellen aus WT-(schwarze Balken) und BPI-/- Mäusen (weiße Balken) wurden mittels M-CSF zu Makrophagen (A) oder mittels GM-CSF zu DCs (B) ausdifferenziert. Die Effizienz der Differenzierung wurde im Durchflusszytometer überprüft und  $5 \times 10^5$  Zellen im 24-well Format ohne Antibiotika mit *L.m.* infiziert. Nach einer Stunde Inkubation wurde Gentamicin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zugegeben, nach einer weiteren Stunde Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel (Gentamicin 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Zu diesem Zeitpunkt (entspricht 2 h-Wert) bzw. nach weiteren 22 h (entspricht 24 h-Wert) wurden die Überstände abgenommen, die Zellen lysiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach 24 stündiger Inkubation konnten die CFUs berechnet werden. Dargestellt sind die Mittelwerte des Logarithmus 10 der CFU mit den Standardabweichungen. Die TNF Konzentration der gewonnenen Überstände wurde mittels TNF-ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei jeweils unabhängigen Versuchen. nd: nicht detektierbar

Sowohl für Makrophagen (Abbildung 4-11A) als auch mDCs (Abbildung 4-11B) zeigt sich nach zwei Stunden eine effiziente Phagozytoseleistung der Zellen, die sich zudem für beide Zellarten von der aufgenommenen Menge an Bakterien stark annähert. Makrophagen scheinen im Vergleich zu mDCs *L.m.* effektiver abzutöten, da der 24 h CFU-Wert für mDCs circa eine Logstufe über dem der Makrophagen liegt. Entscheidend für die Fragestellung war, ob sich Makrophagen oder mDCs aus WT- bzw. BPI-/- Mäusen in ihrem Verhalten unterscheiden. Anhand der dargestellten Daten zeigt sich, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Responsivität zwischen den Zellen der beiden verschiedenen Genotypen gibt.

Die TNF-Produktion ist für Makrophagen (Abbildung 4-11A) nach zwei Stunden nicht detektierbar, für mDCs (Abbildung 4-11B) ist eine Konzentration von circa 1400 pg/mL nachweisbar. Nach 24 h zeigt sich für beide Zelltypen eine starke TNF-Ausschüttung, die für mDCs um fast das Doppelte höher liegt als die von Makrophagen. Auch bei der TNF-Expression zeigt sich kein Unterschied zwischen WT- Mäusen und BPI-/- Mäusen.

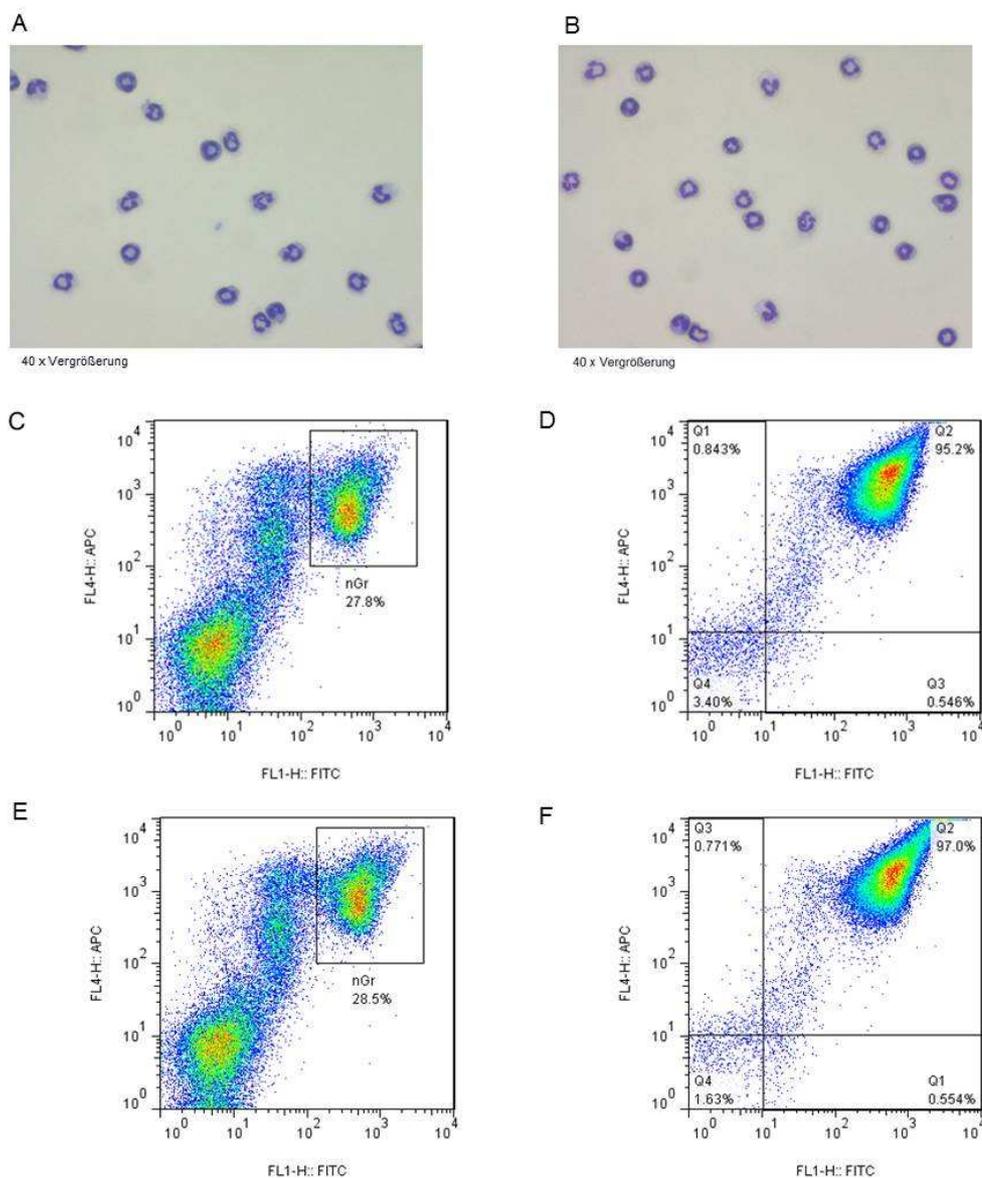
Weder Makrophagen, wie erwartet, noch mDCs scheinen für den beobachteten Phänotyp der höheren Suszeptibilität der BPI-defizienten Mäuse gegenüber einer Infektion mit *L.m.* verantwortlich zu sein.

#### 4.8. Die Rolle von nGr bei der Abwehr von Listerien

Als dritte entscheidende Abwehrzelle gegen eine Listerieninfektion kommen, neben Makrophagen und mDCs, nGr in Frage (Williams, Schmidt et al. 2012). Diese Zellen phagozytieren ebenfalls Bakterien, verfügen aber zusätzlich über andere Abwehrmechanismen wie die Freisetzung antimikrobieller Proteine, die Bildung von „Neutrophil extracellular traps“ (NETs) oder die Fähigkeit zu „oxidative Burst“ (Kolaczowska and Kubes 2013). Außerdem sind neutrophile Granulozyten ebenfalls Produzenten von BPI (Eckert, Wittmann et al. 2006).

##### 4.8.1. Histologische Untersuchung und Reinheit nach Aufreinigung von nGr

Im Gegensatz zu Makrophagen und mDCs, die aus Vorläuferzellen erst ausdifferenziert werden müssen, machen nGr im murinen Knochenmark der verwendeten WT- und BPI-/- Mäuse einen Prozentsatz von circa 30% der Knochenmarkszellen (Abbildung 4-12C und E) aus. Diese Zellen wurden mittels eines MACS-Kits aus WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen aufgereinigt. Um auszuschließen, dass die BPI-Defizienz sich grundsätzlich auf Anzahl oder Morphologie der nGr auswirkt, wurden die aufgereinigten Zellen histologisch im Lichtmikroskop analysiert, die Ausgangsmenge der nGr im Knochenmark von WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen bestimmt und die Aufreinigungseffizienz mittels Durchflusszytometrie überprüft.



**Abbildung 4-12: Vergleich von WT und BPI-/- nGr**

nGr wurden aus Knochenmark von WT (A) und BPI-/- Mäusen (B) mittels MACS isoliert.  $3 \times 10^5$  Zellen wurden über Zytospin auf einen Objektträger zentrifugiert, mit „Diff Quik“ Färbelösung angefärbt und mit Hilfe einer 40 x Objektivvergrößerung lichtmikroskopisch aufgenommen (A:WT, B:BPI-/-). Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit  $\alpha$ Gr-1 FITC (FL1-H:FITC) sowie  $\alpha$ CD11b APC (FL4H:APC) angefärbt (C-F). C: WT Knochenmark nach Erythrozytenlyse vor Aufreinigung D: WT nGr nach Aufreinigung, E: BPI-/- Knochenmark nach Erythrozytenlyse vor Aufreinigung, F: BPI-/- nGr nach Aufreinigung. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 15 Aufreinigungen.

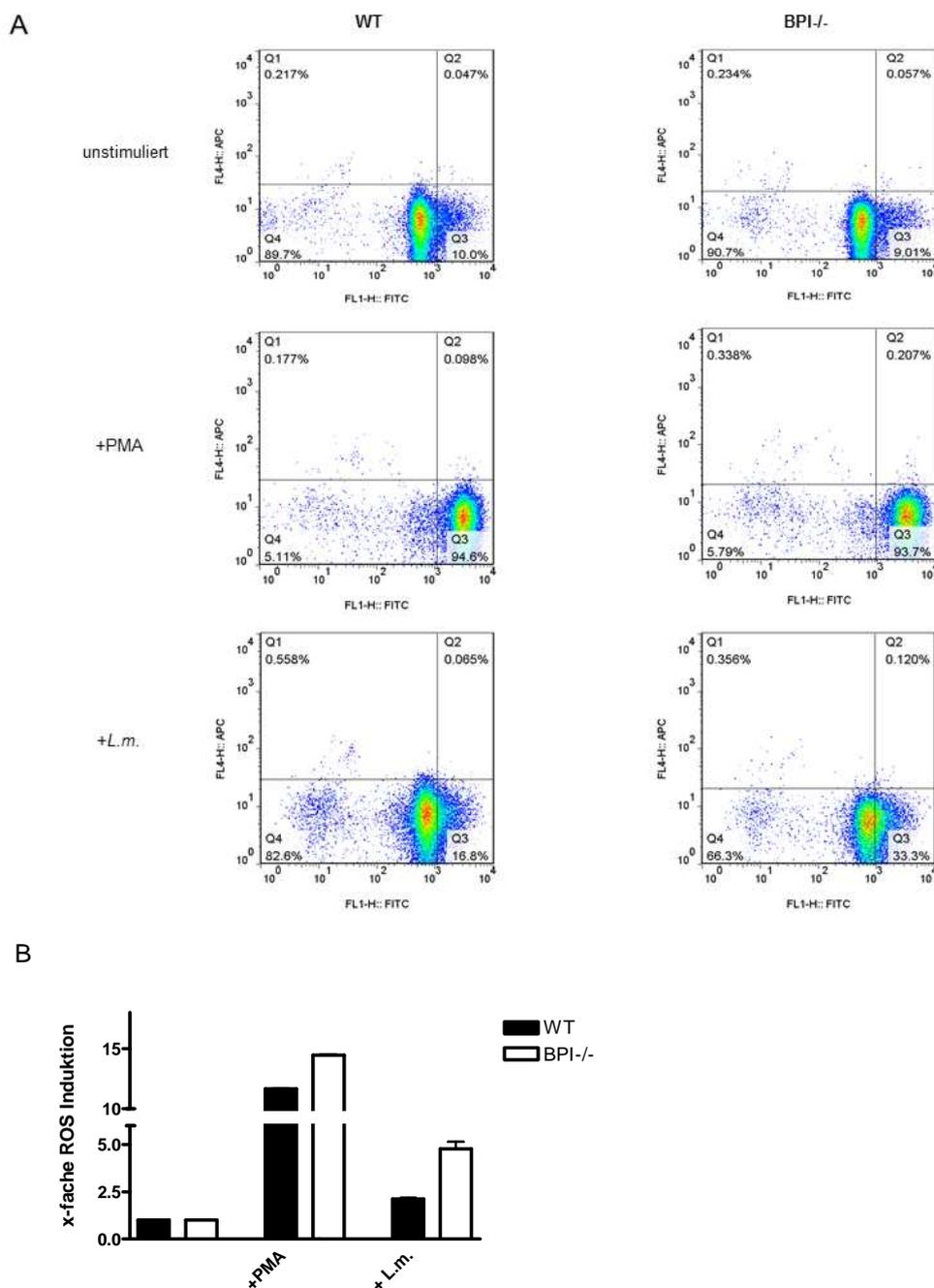
Weder für das histologische Erscheinungsbild, noch für die Ausgangskonzentration der Zellen in WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen oder die Aufreinigungseffizienz der nGr zeigen sich Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen. Beide Histologiebilder zeigen die für Mäuse typischen nGr mit einem ringförmigen,

---

segmentierten Kern. Damit ist belegt, dass die BPI-Defizienz keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Bildung und Morphologie von nGr hat, was für die weiteren Experimente Grundvoraussetzung war.

#### 4.8.2. Die Analyse von ROS in nGr mittels DCFH-DA Assay

Ein Abwehrmechanismus von nGr ist der sogenannte „Respiratory burst“, durch den Stoffe gebildet werden, die entweder selbst antimikrobielle Wirkung entfalten oder in Kombination mit anderen Molekülen antimikrobiell wirken. Als Ausgangsstoff dient Sauerstoff, den das NADPH-Oxidase-System zu einem Sauerstoffradikal und Wasserstoffperoxid verstoffwechselt. Diese beiden fungieren als äußerst effektive Wirkstoffe gegen Mikroorganismen (Robinson 2009). Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DCFH wurde die Bildung von ROS in nGr aus WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen detektiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 15 min mit PMA stimuliert, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt (Saito, Takahashi et al. 2005). Zur Analyse der Stimulation nGr mit *L.m.* wurden UV-inaktivierte Listerien verwendet.



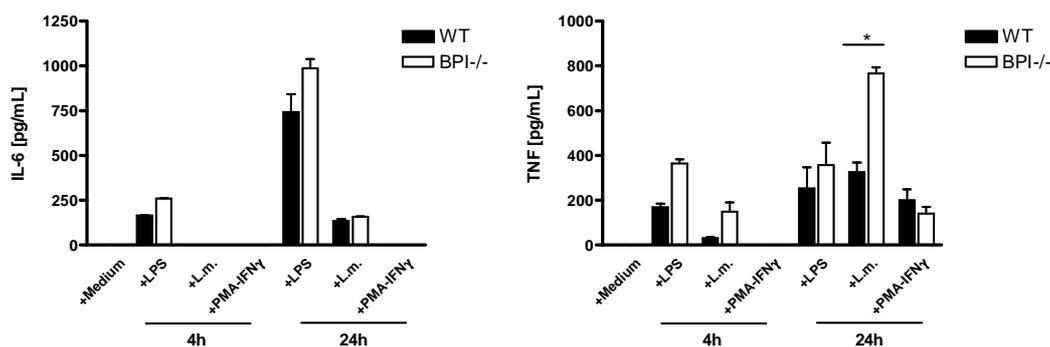
**Abbildung 4-13: DCFH-DA Assay mit nGr aus WT und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen**

nGr wurden aus Knochenmark von WT (WT) und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen (BPI<sup>-/-</sup>) mittels MACS isoliert.  $2 \times 10^6$  Zellen/mL wurden im 48 well Format für 18 h mit UV-inaktivierten Listerien (MOI 10) (+L.m.) stimuliert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in PBS/20  $\mu$ M DCFH-DA resuspendiert. Unstimulierte Zellen wurden als Positivkontrolle für 15 min mit PMA (100 ng/mL) (+PMA) stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist die repräsentative Dotplot-Analyse eines Experiments von zwei unabhängigen Experimente (A). (B) Zwei unabhängigen Experimente sind als Balkendiagramm zusammengefasst. Zur Berechnung der gesteigerten ROS-Produktion wurde die Menge an ROS-positiven Zellen in der unstimulierten Probe (unbezeichnet) auf 1 gesetzt und die Induktion der ROS-positiven Zellen nach PMA- (+PMA) und L.m. (+L.m.) Stimulation in nGr von WT- (schwarze Balken) und BPI<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen darauf bezogen.

Ohne Stimulation liegt der Prozentsatz der DFDA positiven nGr aus WT- und BPI-/- Mäusen bei circa 10 %. Sowohl WT-Zellen als auch nGr aus BPI-/- Mäusen zeigen die gleiche Potenz reaktive Sauerstoffradikale zu bilden, denn nach Stimulation mit PMA kommt es in beiden Genotypen zu einer Induktion der ROS bei circa 94% der Zellen. Werden die nGr mit UV-inaktivierten *L.m.* stimuliert, wird ein deutlicher Unterschied zwischen WT- Mäusen und BPI-/- Mäusen sichtbar. 33,3 % der BPI-/- Zellen reagieren mit einer ROS-Induktion, im Vergleich zu WT-Zellen bei denen lediglich 16,8 % nach *L.m.* Stimulation positiv für DFDA werden (siehe Abbildung 4–13A). Auch die Zusammenfassung zweier unabhängiger Experimente zeigt deutlich, dass BPI-/- nGr mit einer nahezu doppelt so starken ROS-Induktion auf eine Listerienstimulation reagieren im Vergleich zu nGr, die aus WT-Mäusen isoliert wurden (Abbildung 4–13B).

#### 4.8.3. nGr aus BPI-/- Mäusen zeigen gesteigerte TNF-Sekretion

Neben der ROS-Produktion sezernieren nGr nach Stimulation proinflammatorische Zytokine. Zur Analyse der Induktion der Produktion von IL-6 und TNF wurden nGr aus WT- Mäusen als auch BPI-/- Mäusen *in vitro* mit verschiedenen Stimuli für vier Stunden bzw. 24 Stunden stimuliert. Als Kontrollen wurden LPS und PMA in Kombination mit IFN $\gamma$  verwendet. Dazu wurden die nGr für 30 min mit IFN $\gamma$  vorstimuliert, um eine Voraktivierung der Zellen vor Zugabe von PMA zu erreichen. LPS stimuliert die Zellen mittels TLR4 (Poltorak, He et al. 1998). In den Überständen der stimulierten Zellen wurde anschließend die Sekretion von TNF und IL-6 gemessen.



**Abbildung 4-14: BPI-/- nGr zeigen im Vergleich zu WT nGr gesteigerte TNF-Produktion nach Stimulation mit L.m.**

nGr wurden aus Knochenmark von WT (schwarze Balken) und BPI-/- (weiße Balken) Mäusen mittels MACS isoliert.  $2 \times 10^6$  Zellen/mL wurden im 48 well Format mit 100 ng/mL LPS (+LPS), UV-inaktivierten *L.m.* (MOI 10) (+*L.m.*) oder PMA/IFN $\gamma$  (100 ng/mL/ 50 ng/mL) (+PMA-IFN $\gamma$ ) für 4 h bzw. 24 h inkubiert oder unstimuliert belassen (+Medium). Die IL-6- (A) und TNF-Konzentration (B) im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten Versuchen.

Die IL-6-Sekretion der nGr wird bereits nach 4 h von allen verwendeten Stimuli induziert und nimmt nach 24 h bei Stimulation mit LPS und *L.m.* deutlich zu. Es zeigen sich aber weder nach 4 h noch nach 24 h signifikante Unterschiede zwischen der IL-6 Expression von Zellen aus WT-Mäusen verglichen mit denen aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen.

Für die TNF-Expression ist nach vier Stunden zu erkennen, dass sowohl die Stimulation mit LPS als auch mit *L.m.* bei nGr aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer gesteigerten TNF-Expression im Vergleich zu Zellen aus WT- Mäusen führt. Nach 24 h ist dieser Effekt bezüglich der LPS-Stimulation nicht mehr detektierbar, die TNF-Sekretion gleicht sich an. Allerdings führt die Stimulation mit UV-inaktivierten *L.m.* nach 24 h zu einer um das 2,3 fache gesteigerten TNF-Sekretion bei nGr aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit Zellen aus WT- Mäusen. Bei Verwendung von PMA und IFN $\gamma$  ist erst nach 24 h TNF nachweisbar, wobei sich für diese Stimuli keine Unterschiede zwischen Zellen aus WT-Mäusen und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen.

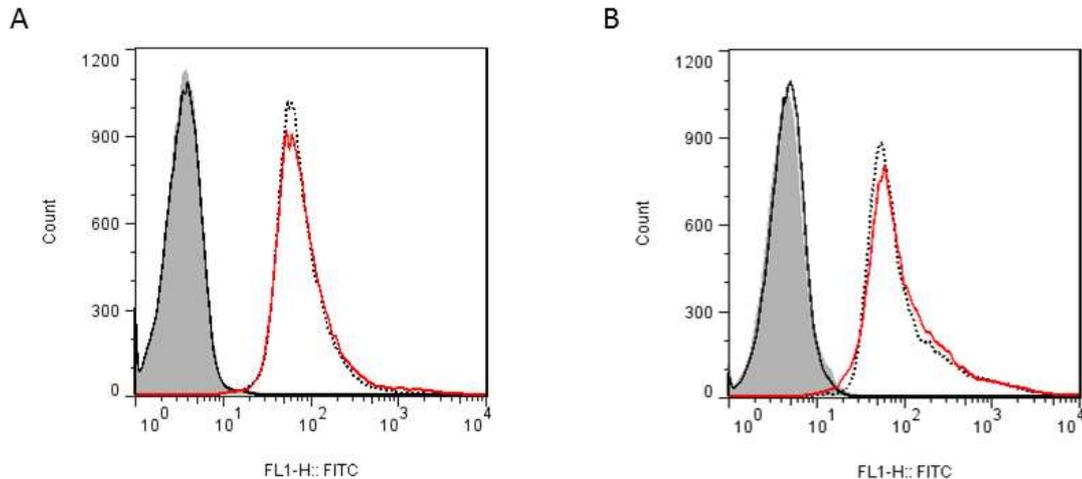
Die Ergebnisse aus 4.8.2 und 4.8.3 verdeutlichen, dass nGr aus BPI-defizienten Mäuse hyperresponsiv gegenüber einer Stimulation mit *L.m.* reagieren.

#### 4.8.4. *In vitro* Infektion von nGr mit lebenden *L.m.*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nGr hyperresponsiv gegenüber einer Stimulation mit *L.m.* reagieren, sollte im Folgenden analysiert werden, welchen Einfluss die gesteigerte ROS- und TNF-Produktion der BPI<sup>-/-</sup> nGr nach Stimulation mit UV-inaktivierten *L.m.* auf lebende Bakterien in den Zellen hat. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die Phagozytoseleistung der nGr zwischen den beiden Genotypen unterscheidet. Dazu wurden *L.m.* mit CFSE markiert und im Anschluss nGr aus WT- Mäusen und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen mit diesen infiziert.

##### 4.8.4.1. Übereinstimmende Phagozytoseleistung von nGr aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen

Die nGr aus dem Knochenmark von WT- Mäusen und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit CFSE-markierten, lebenden *L.m.* infiziert. Bei der anschließenden Detektion im Durchflusszytometer wurde Trypanblau verwendet, um CFSE-Bakterien, die an der Oberfläche der Zellen gebunden sind, zu quenschen.



**Abbildung 4-15: *in vitro* Infektion von WT und BPI<sup>-/-</sup> nGr mit *L.m.***

nGr wurden aus Knochenmark von WT und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen mittels MACS isoliert.  $2 \times 10^6$  Zellen/mL wurden im 24 well Format mit CFSE-markierten, lebenden Listerien (MOI 5) infiziert. Nach 60 min und drei Stunden wurden die Zellen zur Analyse im Durchflusszytometer geerntet und in 0,4% iger Trypanblaulösung aufgenommen.

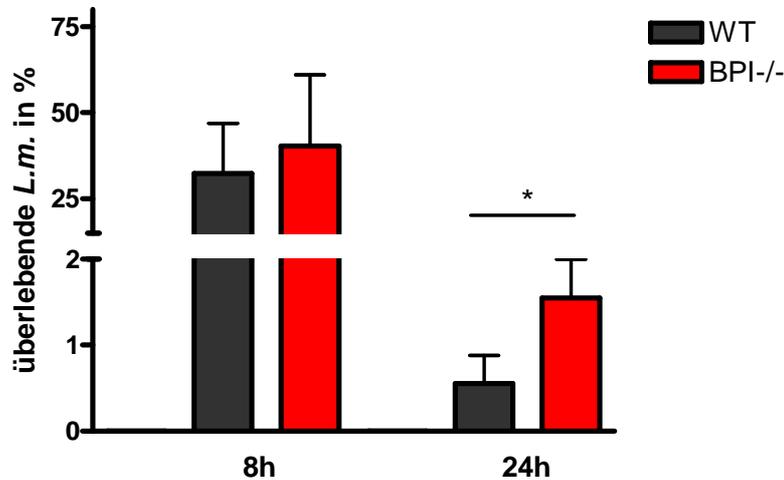
Histogrammlinien: grau ausgefüllt (nicht infiziert, WT), schwarz (nicht infiziert, BPI<sup>-/-</sup>), schwarz unterbrochen (infiziert, WT), rot (infiziert, BPI<sup>-/-</sup>). Die Detektion des CFSE-Signals erfolgte im Fluoreszenz 1-Kanal (FL1H::FITC). (A) 1 h nach Infektion, (B) 3 h nach Infektion. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus drei unabhängigen Experimenten.

Weder nach einstündiger noch dreistündiger Inkubation mit CFSE-Listerien ist ein Unterschied in der Bakterienlast der nGr aus WT- bzw. BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zu erkennen (Abbildung 4–15). Damit ist gezeigt, dass sich die Phagozytoseleistung der Zellen zwischen den beiden Genotypen nicht unterscheidet. Des Weiteren ist auch nach drei Stunden keine Abnahme der Bakterienmenge zu erkennen. Dieser Effekt könnte durch den folgenden Umstand erklärt werden: Abgetötete Bakterien liefern innerhalb der Zellen ein genauso starkes CFSE-Signal wie lebende. Somit ist im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht zu bewerten, ob die Effizienz der nGr beim Abtöten der Listerien unterschiedlich ausgeprägt ist.

#### 4.8.4.2. pGr aus WT-Mäusen töten effektiver phagozytierte *L.m.*

Um die Effizienz der nGr aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen, Listerien abzutöten, miteinander zu vergleichen, wurden Thioglykolat-induzierte Peritonealgranulozyten (pGr) mit lebenden *L.m.* infiziert. Durch die Injektion des Thioglykolats kommt es zur Rekrutierung von nGr aus dem Knochenmark in den Bauchraum. Somit sind diese pGr bereits voraktiviert, da sie durch verschiedene Chemo- und Zytokine zur Invasion angeregt wurden. Nachdem in einem Vorversuch sichergestellt werden konnte, dass

pGr aus WT-Mäusen in der Lage sind *L.m.* abzutöten, wurde die Effektivität der Zellen aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen miteinander verglichen.



**Abbildung 4-16: WT pGr töten effektiver *L.m.* als BPI<sup>-/-</sup> pGr**

Thioglycolat-induzierte pGr aus WT- (graue Balken) und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen (rote Balken) wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  /mL im 24-well-Format mit lebenden *Listeria monocytogenes* (MOI 10) infiziert. Nach 60 min wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von 100 µg/ml Gentamicin abgetötet. Nach 2 h wurden die Überstände gewonnen, die Zellen lysiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach 24 stündiger Inkubation der Agarplatten wurden die CFUs berechnet und als 100% gesetzt. Sowohl nach acht wie auch 24 h wurden ebenfalls Überstände gewonnen, die Zellen lysiert und auf LB-Agar ausplattiert. Angegeben sind die überlebenden Bakterien in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente.

Ausgehend von der phagozytierten Bakterienzahl detektiert nach zwei Stunden, ist nach acht Stunden eine Reduktion der Bakterien auf 33% (WT) bzw. 40 % (BPI<sup>-/-</sup>) zu erkennen (Abbildung 4–16). Die Effizienz diese phagozytierten *L.m.* abzutöten unterscheidet sich nach acht Stunden nicht signifikant zwischen pGr aus WT- oder BPI<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach 24 h zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen WT- und BPI<sup>-/-</sup> pGr. In den WT pGr finden sich nur noch 0,55% der Ausgangsmenge an *L.m.*, in BPI<sup>-/-</sup> pGr dahingegen noch 1,5%. Der Unterschied in der Bakterienlast nach 24 h könnte durch ein unterschiedliches Überleben der Granulozyten im Zuge der *in vitro* Infektion erklärbar sein. Deshalb wurde zusätzlich mittels Annexin V- und TOPRO-Färbung die Apoptoserate bzw. die Anzahl der toten Zellen bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und BPI<sup>-/-</sup> Zellen (Daten nicht gezeigt).

So ist als Fazit zu ziehen, dass BPI<sup>-/-</sup> pGr nicht in gleichem Maß in der Lage sind *L.m.* abzutöten wie pGr von WT-Mäusen. Diese Beobachtung trägt vermutlich zum Phänotyp der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse im *in vivo* Modell bei.

## 5. Diskussion

### 5.1. Humanes BPI und Listerien

Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass humane nGr auf eine Stimulation mit LPS als auch UV-inaktivierten Listerien mit der Sekretion von hBPI reagieren. hBPI wurde erstmals in nGr nachgewiesen, genauer in den azurophilen Granula (Weiss, Elsbach et al. 1978). Periphere nGr im Blut enthalten ebenfalls in ihren primären Granula hBPI, aber keine BPI mRNA bzw. zeigen keine *de novo* Proteinexpression. Die azurophilen Granula der nGr werden in einem promyeloiden Stadium der Zelldifferenzierung gebildet und beladen, so dass ihre antimikrobiell wirksamen Proteine bei Aktivierung der Zelle sofort ausgeschüttet werden können (Gullberg, Andersson et al. 1997).

Die Reaktion der nGr auf die LPS Stimulation diente in diesem Versuch als Positivkontrolle, da LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien als Auslöser einer BPI-Freisetzung bekannt war (Aichele, Schnare et al. 2006). Da BPI über Exozytose aus den primären Granula freigesetzt wird, ist anzunehmen, dass jeder Stimulus, der zur Exozytose von diesen Vesikeln in nGr führt, die Freisetzung von BPI induziert. Deshalb ist es nicht überraschend, dass auch *L.m.* zur Exozytose der primären Vesikel und damit der Sekretion von BPI beiträgt. Prinzipiell kann es durch Listerien über extrazelluläre oder intrazelluläre Detektion der Bakterien zur Aktivierung der nGr kommen. Da es sich bei dem verwendeten Stimulus um UV-inaktivierte Bakterien handelte, fällt allerdings der aktive Infektionsweg der Bakterien als Möglichkeit aus. Bei der UV-Inaktivierung kommt es zu Beschädigungen der DNA, so dass die Listerien abgetötet werden (Birmpa, Sfika et al. 2013). Trotzdem bleiben stimulierende Strukturen wie PGN, Lipoteichonsäuren und Lipoproteine der bakteriellen Membran sowie DNA-Fragmente erhalten. So kann beispielsweise PGN aus der Zellwand der Listerien als Stimulus für TLR2 dienen. Dabei kommt es extrazellulär durch Listerien zur Aktivierung von TLR2, der als Heterodimer mit TLR6 diazyetylierte Lipopeptide grampositiver Bakterien erkennt (Kawai and Akira 2011). Durch Phagozytose der Bakterien gelangen bakterielle Komponenten ins Zytosol und werden dort von NOD1 und NOD2 detektiert (Eitel, Suttrop et al. 2010). Durch die Detektion von Pathogenen kommt es bei nGr zur Aktivierung ihrer Effektorfunktionen, wobei anzumerken ist, dass für die Sekretion der azurophilen Granula ein sehr starker Stimulus vorhanden sein muss (Faurischou and Borregaard 2003). Offensichtlich wird

dieser durch die UV-inaktivierten Bakterien erreicht, so dass die Freisetzung von hBPI deutlich messbar wird (Abbildung 4-1).

Im nachfolgenden Experiment ging es darum zu analysieren, ob es zu einer Interaktion zwischen dem sezernierten BPI und lebenden Listerien kommt, was Voraussetzung für eine antimikrobielle Funktion des Proteins ist. Dabei war deutlich zu erkennen, dass eine Interaktion des Proteins mit den Bakterien statt findet (Abbildung 4-3). Bisher konnte dieser Effekt nur bei gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden. Für AMP ist allgemein bekannt, dass die Bindung an Bakterien durch elektrostatische Kräfte induziert wird. Bei gramnegativen Bakterien durch das anionisch geladene LPS, bei grampositiven Bakterien durch anionisch geladene Teichonsäure (Brogden 2005).

Bei *E. coli* ist genau beschrieben, dass BPI durch seine Ladung in die bakterielle Membran eindringt, zweiwertige Kationen verdrängt und damit die Anordnung von LPS zerstört (Wiese, Brandenburg et al. 1997). So ist also zu vermuten, dass hBPI ebenfalls bedingt durch seine Ladung an Teichonsäuren der Listerien bindet.

Die Hypothese, dass BPI nicht antibakteriell gegenüber grampositiven Bakterien wirkt, beruht auf Untersuchungen, die keine antimikrobielle Funktion von BPI gegenüber von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus faecalis* nachweisen konnten (Weiss, Elsbach et al. 1978). Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass *Staphylococcus aureus* über besondere Zellwandmodifikationen verfügt, die die anionische Ladung der Membran verändern, so dass kationische Peptide und Defensine unwirksam werden (Peschel and Collins 2001).

Mittlerweile gibt es einzelne Hinweise darauf, dass BPI oder verwandte Proteine mit grampositiven Bakterien interagieren. Zum einen zeigten Srivastava et al., dass rekombinantes BPI an *Streptococcus pneumoniae* bindet und dessen Assoziation mit murinen Makrophagen verstärkt (Srivastava, Casey et al. 2007). Zum anderen konnte für das mit BPI eng verwandte LBP eine Funktion bei der Immunantwort gegen grampositive Pneumokokken nachgewiesen werden (Weber, Freyer et al. 2003).

Dass die Bindung von BPI an *L.m.* nicht nur zu einer Interaktion von Protein und Bakterium führt, sondern durchaus einen antimikrobiellen Effekt hat, zeigte sich bei der Effizienz von hBPI<sub>P</sub>, das in der Lage war, nicht nur das Wachstum verschiedener Listerienstämme zu inhibieren, sondern die Bakterien abzutöten (Abbildung 4-4). Dabei wurden klinische Isolate aus an Listeriose erkrankten Patienten verwendet, was die Pathogenität der Bakterien gewährleistete. Zudem wurde der Listerienstamm EGD untersucht. Für alle Stämme wurde der antimikrobielle Effekt von hBPI<sub>P</sub> nachgewiesen.

Dabei ist bisher völlig unklar, wie genau das Peptid in der Lage ist die Bakterien abzutöten.

Die grundsätzliche Wirkung des Peptids war bereits für gramnegative Bakterien beschrieben. Überraschend war die Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien.

## 5.2. *in vivo* Infektion von WT und BPI-/- Mäusen mit Listerien

Um die Funktion von BPI im Rahmen einer Listeriose zu untersuchen, wurden verschiedene Infektionsexperimente mit WT- und BPI-/- Mäusen durchgeführt.

### 5.2.1. mRNA Expression von BPI im Darm

Um zu analysieren, ob auch murine Zellen als Reaktion auf eine Infektion mit *L.m.* mit der Produktion von BPI reagieren, wurden WT-Mäuse intragastral mit *L.m.* infiziert. Da die Bakterien nach der Magenpassage die Epithelzellen im Darm infizieren, wurde die mRNA-Expression von Dünndarm- und Dickdarmzellen untersucht.

Das Immunsystem im Darm ist im Vergleich zu anderen immunologischen Organen sowohl vom Aufbau als auch von seiner Funktion sehr speziell. Durch verschiedene Mechanismen, wie eine abschirmende Mukusschicht und beispielsweise die Expression von TLRs lediglich an basaler Seite der Epithelzellen wird verhindert, dass die im Darm vorhandenen kommensalen Bakterien zu einer dauerhaften Stimulation des Immunsystems führen (Abreu, Fukata et al. 2005, Macpherson, Geuking et al. 2005). TLR2, dem die wichtigste Rolle bei Abwehr einer intestinalen Listerieninfektion zugesprochen wird, wird aber auf der apikalen Seite der Epithelzellen exprimiert und ist damit in der Lage *L.m.* zu detektieren (Schuppler and Loessner 2010).

Bei i.g. Infektion der WT-Mäuse zeigte sich nach zwei Tagen für die Zellen des Dünndarms eine deutlich gesteigerte mRNA Expression von BPI (Abbildung 4-5). Dickdarmzellen zeigen keine Hochregulation der BPI mRNA, was verschiedene Ursachen haben kann: Zum einen könnte die Bakterienzahl vor Erreichen des Dickdarms bereits zu gering sein, um eine erfolgreiche Infektion und damit Stimulation der Dickdarmzellen zu erreichen. Zum anderen sind möglicherweise murine Zellen im Dickdarmbereich nicht in gleichem Maße zur BPI-Expression fähig. Canny et al. konnten zeigen, dass die Expression von BPI zwischen Dünndarm und Colon um 65 % und in distaler Richtung immer weiter abnimmt (Canny, Cario et al. 2006). Da die

Präparation des Dickdarms im letzten Drittel erfolgte, könnte dies die Ursache für die fehlende BPI-Expression sein.

Dass BPI von humanen, mukosalen Epithelien produziert wird, konnte bereits 2002 von Canny et. al gezeigt werden. Die Analyse der murinen, intestinalen Zelllinie MODE-K zeigte sogar eine vierfach höhere BPI Expression als vergleichend untersuchte humane Epithelzelllinien (Canny, Cario et al. 2006). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zudem zeigen, dass die murine, embryonale Darmepithelzelllinie mIC<sub>c12</sub> nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden wie LPS, PGN und *E. coli* mit einer Induktion der BPI-mRNA Expression reagiert. *Ex vivo* isolierte Darmzellen allerdings zeigten nach Stimulation mit UV-inaktivierten *L.m.* nur eine geringe BPI-mRNA Expression, die zudem nicht durch Stimulation induzierbar war (unveröffentlichte Daten, Maria Stromiedel, AG Schnare). Ebenso wenig ließen sich diese *ex vivo* isolierten Zellen mittels TLR Liganden stimulieren, da diese Zellen *in vivo* nur sehr wenig TLR2 und TLR4 exprimieren (Cario and Podolsky 2000) bzw. letzteren hauptsächlich im Golgi Apparat (Hornef, Frisan et al. 2002). Damit wird eine stete Aktivierung der Zellen durch die kommensalen Bakterien verhindert. Die Abweichungen zu den Ergebnissen aus Zelllinien des Darms werden auf epigenetischen Drift während der Zellkulturpassage und verschiedene Kulturbedingungen zurückgeführt (Cario 2005).

Unter Berücksichtigung dessen und da im Rahmen des Versuchs komplette Darmteile präpariert wurden, ist fraglich, ob überhaupt Epithelzellen für die BPI-Expression verantwortlich sind. Die Infektion mit *L.m.* führt durch die ausgelöste Immunantwort zur Rekrutierung von nGr und Makrophagen in das infizierte Epithel. *L.m.* könnte auch diese Immunzellen infizieren, die mit dem Epithel assoziiert sind, so dass auch diese Zellen zur Produktion von BPI beitragen können.

#### 5.2.2. Funktion von BPI im Infektionsmodell der murinen Listeriose

Im Rahmen der durchgeführten i.g.- als auch der i.v.-Infektion mit *L.m.* waren BPI-/- Mäuse susceptibler, wobei auch BPI-/- Mäuse in der Lage sind, die Infektion zu kontrollieren. Man kann postulieren, dass die BPI-Expression im angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle spielt und der adaptive Teil der Immunabwehr zur Kontrolle und Elimination der Bakterien führt. Dadurch, dass bei einer i.v. Applikation der Bakterien der gleiche Phänotyp der höheren Suszeptibilität der BPI-/- Mäuse fest-

gestellt wurde wie bei der i.g. Infektion, kann man davon ausgehen, dass epithelial exprimiertes BPI für die Kontrolle der Bakterien unbedeutend ist. Dies wurde auch durch Stimulationsexperimente verdeutlicht, die zeigen, dass *ex vivo* isolierte Darmepithelzellen auf eine Infektion/Stimulation mit *L.m.* keine gesteigerte Menge an BPI exprimieren (unveröffentlichte Daten, Maria Stromiedel).

Die verstärkte Pathologie in den BPI<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit Listerien kann auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen reagieren möglicherweise nGr hyperresponsiv auf die Stimulation mit *L.m.*. Dabei kommt es zur Produktion höherer Mengen an Zytokinen. Es ist bereits bekannt, dass eine überschießende Immunantwort mit erhöhten Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen zu einer Verschlechterung der Kontrolle der Listerien führt (Walley, Lukacs et al. 1996). Dabei wäre denkbar, dass BPI - wie bei gramnegativen Bakterien für deren Endotoxin nachgewiesen (Marra, Wilde et al. 1990) - den immunstimulativen Effekt der Listerien unterdrückt, indem es an die Bakterien bindet und damit deren PAMPs blockiert. Eine direkte inhibitorische Wirkung von BPI gegenüber PAMPs von *L.m.* muss noch in weiterführenden Experimenten bestätigt werden.

Zum anderen kann die erhöhte Bakterienlast in der Milz und Leber zu einer verstärkten Organschädigung beitragen. Wahrscheinlich beruht die Pathologie der Erkrankung auf dem Zusammenspiel beider Möglichkeiten.

Entscheidend für die Entschlüsselung des Phänotyps von BPI<sup>-/-</sup> Mäusen war die Fragestellung, welche Zellen für die Abwehr der Infektion verantwortlich sind.

### 5.2.3. Analyse der Milzzellpopulationen von WT -und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen

Da sich in der Milz der BPI<sup>-/-</sup> Maus nach Infektion mit *L.m.* erhöhte Bakterienlasten nachweisen ließen, wurde überprüft, ob sich in den Mäusen vor oder während der Infektion Veränderungen in der Zellkomposition der Immunzellen der Milz finden. Denkbar wäre gewesen, dass die BPI-Defizienz zu einer stärker oder schwächer ausgeprägten Rekrutierung von Immunzellen in die Milz führt. Es ließen sich jedoch an keinem der Analysetage Unterschiede in der Zusammensetzung der Milz feststellen (Abbildung 4-9). Erwartungsgemäß zeigte sich eine Rekrutierung von nGr in die Milz an Tag drei und eine Zunahme der Makrophagen an Tag zwei der Infektion, da diese Zellen im Rahmen der angeborenen Immunität bei einer Listerieninfektion eine entscheidende Rolle spielen (Williams, Schmidt et al. 2012).

Aufgrund der Daten kann man postulieren, dass die Rekrutierung der Immunzellen in die infizierte Milz nicht durch BPI reguliert wird. Wahrscheinlich tragen die Immunzellen oder ein bestimmter Immunzelltypus durch den Verlust der BPI-Expression einen intrinsischen Defekt, der zu einer verschlechterten Kontrolle der Bakterien *in vivo* führt.

### 5.3. Untersuchung der Funktion einzelner Immunzellen *in vitro*

Mit den durchgeführten *in vitro* Experimenten sollte geklärt werden, welche Zellen für den Phänotyp der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse verantwortlich sind.

#### 5.3.1. Milzzellen

Zunächst wurden Milzzellen aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen *in vitro* mit UV-inaktivierten Listerien stimuliert. Da die Milz ein Zielorgan der Listerien ist und als sekundäres immunologisches Organ nahezu alle Immunzellen beinhaltet, konnte so ein Überblick gewonnen werden, ob sich auch *in vitro* Unterschiede in der Zytokinproduktion zeigen. Weder für den Kontrollstimulus LPS noch für die UV-inaktivierten Listerien zeigten sich Unterschiede in der IL-6 bzw. TNF Produktion (Abbildung 4-10). Das bedeutet, dass Immunzellen der nicht-infizierten Milz unabhängig von BPI auf eine *L.m.*-Stimulation reagieren. Dafür kann es verschiedene Ursachen geben. Zum einen wurden für die Stimulation UV-inaktivierte Bakterien verwendet, die nicht mehr zur aktiven Infektion fähig sind. Zum anderen handelt es sich um ein *ex vivo* isoliertes Organ, das möglicherweise in Zellkultur eingeschränkt funktional ist. Als letzter Aspekt muss beachtet werden, dass sich in der Milz uninfizierter Mäuse kaum nGr finden (<2,5%), so dass deren Funktion in diesem Versuchsaufbau nur unzureichend untersucht werden konnte (Coquery, Loo et al. 2012).

#### 5.3.2. Makrophagen und DCs

Als erste Abwehrzellen werden in Rahmen einer murinen Listerieninfektion gewebsständige Makrophagen, sowohl in Leber als auch Milz, infiziert (Vázquez-Boland, Kuhn et al. 2001). Makrophagen exprimieren allerdings kein BPI, weshalb von vornherein unwahrscheinlich war, dass dieser Zelltyp für die Unterschiede im *in vivo* Modell verantwortlich ist. Zur Bestätigung der These wurden Knochenmarks-generierte Makrophagen aus WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen mit lebenden Listerien infiziert und die Leistung der Zellen diese abzutöten untersucht. Um ein extrazellulär unkontrolliertes

Wachstum der Bakterien zu verhindern, wurde nach einstündiger Inkubation von Makrophagen und *L.m.* Gentamicin ins Medium gegeben, wobei bereits nachgewiesen wurde, dass diese Antibiotikazugabe keinen Einfluss auf die intrazellulären Bakterien nimmt (Portnoy, Jacks et al. 1988).

Es zeigte sich, dass sowohl Makrophagen aus dem Knochenmark von WT-Mäusen als auch von BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zu effektiver Phagozytose der Bakterien in der Lage sind. Zudem können die Zellen die Bakterien effektiv abtöten (Abbildung 4-11).

Es bleibt also festzuhalten, dass Makrophagen nicht für den ausgeprägteren Phänotyp der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse während einer Listeriose verantwortlich sind.

Ebenfalls entscheidend für die Abwehr der Listeriose sind DCs. Deren Hauptfunktion liegt darin, Antigene der Listerien an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren und eine dauerhafte Immunität gegen diese Infektion zu induzieren (Jung, Unutmaz et al. 2002, Zammit, Cauley et al. 2005). Aus Knochenmark von WT- und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen wurden DCs generiert und im selben Versuchsaufbau wie Makrophagen untersucht. Da für DCs eine BPI-Expression nachgewiesen ist (Eckert, Wittmann et al. 2006), konnte vermutet werden, dass Unterschiede in der Kontrolle der *L.m.* zwischen den beiden Genotypen messbar sind. Auch die DCs waren zu effektiver Phagozytose und dem Abtöten der intrazellulären Listerien in der Lage. Doch zeigte sich hierbei kein Unterschied zwischen Zellen aus WT oder BPI<sup>-/-</sup> Mäusen. Auch die TNF-Sekretion ist für beide Genotypen identisch (Abbildung 4-11).

Dennoch kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass DCs im *in vivo* Modell zu dem beobachteten Phänotyp beitragen. Bei den DCs, die in der Marginalzone der Milz für die Phagozytose der Bakterien verantwortlich sind, handelt es sich um CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> DCs (Neuenhahn, Kerksiek et al. 2006). Durch die Kultur der DCs aus Knochenmark mit GM-CSF lässt sich *in vitro* nicht genau dieser Zelltyp generieren. Somit lässt sich nicht abschließend beantworten, ob sich eventuell CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> DCs aus WT-Mäusen *in vivo* in ihrer Funktion von CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> DCs aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen unterscheiden. Allerdings deuten die *in vitro* Experimente mit infizierten Milzzellen, die die Marginalzonen DCs enthalten sollten, ebenfalls in die Richtung, dass DCs auch ohne BPI in gleichem Maße wie DCs aus WT-Mäusen *L.m.* abtöten und kontrollieren können.

## 5.4. Die Rolle von nGr

Die Rolle von nGr während einer Listerieninfektion war über mehrere Jahrzehnte falsch bewertet worden, da die Ergebnisse aus verschiedenen Depletionsstudien auf dem Antikörper RB6-8C5 beruhten, von dem erst im Nachhinein bekannt wurde, dass er nicht nur nGr sondern auch inflammatorische Monozyten und teils T-Zellen depletiert (Nagendra and Schlueter 2004). Die mit einem spezifischen Ak ( $\alpha$ -Ly6G) durchgeführten neueren Studien brachten folgende Erkenntnisse: nGr vermitteln Protektion bei Infektionen mit hohen Dosen von *L.m.*, nicht aber bei geringen Infektionsdosen. nGr spielen eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung der Bakterien in der Leber (Edelson 2012), sind aber nicht notwendig für die Produktion von IFN $\gamma$  während der Infektion, wohl aber für TNF. Ebenso wenig konnten Carr et al. nachweisen, dass die T-Zell Antwort durch die Depletion der nGr beeinflusst wird (Carr, Sieve et al. 2011).

Auch Shi et al. konnten zeigen, dass bei einer Listerieninfektion inflammatorische Monozyten und nicht nGr essentiell für die Abwehr der Infektion sind (Shi, Hohl et al. 2011). Andererseits wiesen Experimente mit Mäusen, denen zwei Formylpeptidrezeptoren auf nGr fehlten (Fpr1 $^{-/-}$ , Fpr2 $^{-/-}$ ), eine deutlich höhere Suszeptibilität gegenüber einer Listerieninfektion auf (Liu, Chen et al. 2012). So besteht weiterhin Klärungsbedarf was die genaue Funktion der nGr während einer Listerieninfektion betrifft. Im Rahmen dieser Arbeit war die Untersuchung der nGr Funktion besonders interessant, da besonders nGr BPI exprimieren.

### 5.4.1. nGr Stimulation mit UV-inaktivierten Listerien

Zunächst wurden nGr aus dem Knochenmark von WT bzw. BPI $^{-/-}$  Mäusen aufgereinigt und sowohl histologisch als auch durchflusszytometrisch untersucht. Die Analyse der Ausgangsmenge an nGr im Knochenmark zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen. Genauso konnte im histologischen Bild kein Unterschied was Größe, Zell-, Kernform oder Menge des Zytoplasmas betraf, ausgemacht werden. Die Aufreinigungseffizienz war ebenfalls gleich (Abbildung 4-12). Theoretisch wäre denkbar gewesen, dass durch die BPI-Defizienz ein Unterschied bei der Hämatopoese, bezüglich Zellzahl oder Morphologie auftritt. Allerdings ist BPI nur eines von vielen Proteinen in den Granula nGr (Lominadze, Powell et al. 2005).

Ein wichtiger Kontrollmechanismus nGr gegenüber aufgenommener Bakterien, hier im besonderen *L.m.* ist der „oxidative burst“. Dabei werden sogenannte „reactive oxygen

species“ (ROS) produziert, die einen direkten mikrobiziden Effekt ausüben. Die Generierung von ROS ist ein NADPH-Oxygenase abhängiger Mechanismus, um phagozytierte Bakterien abzutöten (Kolaczowska and Kubes 2013). Bei Stimulation mit UV-inaktivierten *L.m.* zeigte sich in nGr aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen eine doppelt so hohe Anzahl an ROS positiven Zellen verglichen mit nGr aus WT-Mäusen, wobei die Anzahl der mit PMA stimulierten Zellen keine Unterschiede zwischen den Genotypen aufwies (Abbildung 4-13). Es handelt sich also nicht um eine generelle Hyperresponsivität der BPI<sup>-/-</sup> Zellen.

Die Hyperresponsivität der nGr aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber *L.m.* konnte auch anhand der Produktion von TNF nachgewiesen werden. Dabei konnte ein genereller Defekt der nGr bezüglich ihrer Aktivierung ausgeschlossen werden, da sowohl die verstärkte ROS-Aktivität als auch die erhöhte TNF-Produktion spezifisch für die *L.m.*-Stimulation waren.

*L.m.* wird von nGr phagozytiert und dabei bakterielle Bestandteile als PAMPs von verschiedenen Rezeptoren erkannt. Bereits an diesem Punkt könnte BPI mit den Bakterien interagieren. Denn Vesikel, die antimikrobielle Substanzen enthalten, werden nach Aktivierung der Zellen sowohl per Exozytose aus der Zelle ausgeschleust, aber auch ins Phagolysosom entleert (Kolaczowska and Kubes 2013).

Bereits 1992 konnte für *E. coli* und humane Zellen gezeigt werden, dass freies BPI *E. coli* neutralisiert und somit zur Inhibition der TNF-Produktion führt (Weiss, Elsbach et al. 1992). Durch die Bindung von BPI an *L.m.* wie in Abbildung 4-3 gezeigt, wäre eine Neutralisation von *L.m.* denkbar. Dies würde die Hyperresponsivität der BPI<sup>-/-</sup> nGr gegenüber *L.m.* erklären.

#### 5.4.2. nGr Infektion mit lebenden Listerien

Ob nGr ohne die Expression von BPI schlechter das Wachstum von *L.m.* kontrollieren können, wurde *in vitro* mit *L.m.*-infizierten nGr untersucht. Um die Phagozytoseleistung der Zellen zu analysieren, wurden CFSE-markierte Listerien verwendet und die Bakterienzahl in den nGr mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

Das bedeutet, dass nGr aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen genauso effizient *L.m.* phagozytieren können wie WT-Mäuse.

Um zu klären, ob es Unterschiede in der Effizienz des Abtötens von *L.m.* zwischen den Genotypen gibt, wurden nGr aus dem Peritoneum verwendet, da diese bereits durch

die Injektion von Thioglykolat eine Voraktivierung erfahren haben. Diese Zellen werden über das Blut durch verschiedene Chemokine ins Peritoneum rekrutiert (Call, Nemzek et al. 2001). Auch bei diesem Ansatz konnte die gleiche Phagozytoseleistung der pGr festgestellt werden, was den Befund aus den vorhergehenden Versuchen bestätigte. Nach 24 h zeigte sich, dass pGr beider Genotypen *L.m.* abtöten können. Allerdings war die verbleibende Bakterienlast in den pGr von BPI<sup>-/-</sup> Mäusen um das Dreifache erhöht. Dass dieser Unterschied nicht in einer unterschiedlichen Apoptoserate der infizierten Zellen begründet liegt, wurde mittels durchflusszytometrischer Messung der AnnexinV-Expression sichergestellt.

Das heißt, die BPI-Defizienz nimmt Einfluss auf die Funktionalität der pGr die Bakterien abzutöten. Denkbar ist folgende Hypothese: Die Listerien werden bereits extrazellulär detektiert, gelangen durch Phagozytose ins Phagosom der Zelle, werden auch dort erneut durch PRR registriert und führen so zur Sekretion von BPI ins Phagosom. Dort entfaltet das Protein seine antimikrobielle Wirkung und tötet die Bakterien ab. In den BPI<sup>-/-</sup> Zellen kann die Funktion von BPI offensichtlich nicht von anderen antimikrobiellen Proteinen kompensiert werden, so dass *L.m.* bessere Überlebenschancen in den Zellen besitzt.

### 5.5. Übertragung der *in vitro* Daten auf das *in vivo* Modell

Anhand der generierten *in vitro* Daten kann für die *in vivo* Infektion folgendes Modell konstruiert werden:

*L.m.* gelangt nach Infektion der Tiere in Epithelzellen (i.g.-Infektion), Hepatozyten und Immunzellen wie Makrophagen, DCs und nGr. Makrophagen und DCs in WT bzw. BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen keine Unterschiede bei der Abwehr der Bakterien. In nGr jedoch kommt es in BPI<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Anreicherung der Bakterien verglichen mit WT-Zellen. Zusätzlich kann durch das Fehlen des BPI die Oberfläche von *L.m.* nicht neutralisiert werden, wodurch die nGr hyperresponsiv sind. Sowohl die erhöhte Bakterienlast in den Organen, die einen stärkeren Organschaden auslöst, als auch die hyperresponsiven nGr, führen zum deutlicher ausgeprägten Krankheitsbild der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse. Jedoch werden diese Effekte im Lauf der Infektion von anderen Immunzellen kompensiert, so dass auch BPI<sup>-/-</sup> Mäuse letztlich zur Kontrolle der Infektion in der Lage sind.

## 5.6. Ausblick

Durch die bisher durchgeführten Experimente zeigt sich, dass BPI, welches von nGr gebildet wird, bei der schnellen Kontrolle der Listerien während einer Infektion wichtig ist. Dies ist deswegen erstaunlich, da die BPI-defizienten nGr weiterhin das komplette Arsenal ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit entfalten können. Allerdings beruht diese Schlussfolgerung in erster Linie auf den durchgeführten *in vitro* Experimenten. Um die Rolle des BPI in nGr auch *in vivo* zu klarifizieren, müsste ein Depletionsexperiment durchgeführt werden, bei dem spezifisch BPI in nGr eliminiert wird. Dies wäre über ein Mausmodell möglich, bei dem BPI als gefloxtes Gen vorliegt. Diese Maus könnte man mit einer LysMCre-transgenen „Deleter“-Maus kreuzen, was dazu führen würde, dass BPI weder in Makrophagen noch in Granulozyten exprimiert wird. Da Makrophagen kein BPI exprimieren, resultiert dieser Ansatz in der spezifischen Depletion von BPI in nGr. Durch diesen Ansatz könnte exakt der Beitrag von BPI in nGr während der Listerieninfektion geklärt werden.

Auch *in vitro* könnte die Funktion der nGr noch auf andere klassische Parameter der nGr Aktivierung hin untersucht werden. Beispielsweise die Aktivierung der Myeloperoxidase oder Laktat-Dehydrogenase geben Aufschluss über die Funktionalität der Zellen. Um das intrazelluläre Schicksal der Listerien in nGr in Abhängigkeit von BPI zu untersuchen, kann die konfokale Lebendmikroskopie angewendet werden. Dabei kann sowohl der Weg der Bakterien in der Zelle vom Phagosom zum Zytosol analysiert werden als auch die Interaktion der Bakterien mit BPI.

Da besonders CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort gegen Listerien, die dann letztlich die Listerien aus dem Wirt eliminieren, wichtig sind, könnten diese Zellen zukünftig genauer untersucht werden. Nachdem diese Zellen aus der Milz isoliert wurden, kann die Funktionalität der CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs in Abhängigkeit von BPI im ruhenden Zustand als auch nach Infektion studiert werden.

Weiterhin bleibt zu klären, ob BPI die Stimulation von Zellen durch Listerien neutralisieren kann und welche Zielstruktur der Bakterien dabei erkannt wird. Dazu kann zuerst die Zellwand der Bakterien präpariert werden und die inhibitorischen Eigenschaften von BPI auf eine Zellstimulation untersucht werden.

Um die Immunantwort der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse vollständig zu untersuchen, wären zudem Experimente interessant, die die adaptive Immunantwort genauer beleuchten.

## 6. Zusammenfassung

Die antimikrobielle Wirkung von Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), einem Protein aus den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten (nGr), gegen gramnegative Bakterien ist seit Jahrzehnten bekannt. Dabei kann es sowohl LPS neutralisieren, als auch Bakterien opsonisieren und damit deren Phagozytose verstärken.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals eine Funktion von BPI gegenüber grampositiven Bakterien, im speziellen *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) nachgewiesen werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass humane nGr auf Stimulation mit Listerien mit einer BPI-Sekretion reagierten, zum anderen, dass BPI an die Bakterien binden konnte. Diese Bindung resultierte in einer direkten antimikrobiellen Wirkung gegen *L.m.*.

Eine intragastrale Infektion von Wildtyp (WT)- Mäusen führte zur gesteigerten Expression der BPI-mRNA im Dünndarm, was einen ersten Hinweis auf die Funktion von BPI während einer Listeriose gab. BPI-defiziente (BPI<sup>-/-</sup>) Mäuse waren im Modell der murinen Listeriose unabhängig von der Applikationsroute suszeptibler gegenüber den Bakterien. Dies zeigte sich durch erhöhte Bakterienlasten in den infizierten Organen und eine verstärkte systemische Entzündung; wobei auch BPI<sup>-/-</sup> Mäuse letztlich in der Lage waren, die Bakterien zu kontrollieren.

Um zu untersuchen welche Zellen für die erhöhte Suszeptibilität der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse verantwortlich sind, wurden Analysen mit Makrophagen, DCs und nGr durchgeführt, die die erste Abwehrlinie bei einer Listeriose bilden. Weder isolierte Makrophagen noch DCs aus BPI<sup>-/-</sup> Mäusen konnten den *in vivo* Phänotyp der Mäuse rekapitulieren.

Allerdings zeigten sich nach Stimulation von nGr aus WT und BPI<sup>-/-</sup> Mäusen mit UV-inaktivierten Listerien signifikante Unterschiede in der TNF- und ROS-Produktion der Zellen. BPI<sup>-/-</sup> nGr reagierten deutlich stärker auf die Stimulation. Die nGr beider Genotypen wiesen vergleichbare Effizienz bei der Phagozytose lebender Bakterien auf, aber unterschieden sich deutlich in ihrer Fähigkeit die Listerien nach 24 h abzutöten. In BPI<sup>-/-</sup> nGr fand sich nach 24 h eine dreifach höhere Bakterienlast.

Aus den *in vitro* Daten kann auf das *in vivo* Modell die Hypothese übertragen werden, dass vermutlich nGr im Lauf einer Listeriose für die erhöhte Suszeptibilität der BPI<sup>-/-</sup> Mäuse verantwortlich sind. Da sich die BPI<sup>-/-</sup> Mäuse von der Infektion erholen, ist dabei davon auszugehen, dass auch in den BPI<sup>-/-</sup> Mäusen eine protektive adaptive Immunantwort ausgebildet werden kann.

## 7. Summary

The antimicrobial action of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) against gramnegative bacteria is known for decades. BPI is mainly expressed in azurophilic granules of neutrophil granulocytes (nGr). It is able to neutralize LPS as well as to opsonize bacteria leading to enhanced phagocytosis of the bound bacteria.

During this work we provided first evidence that BPI has also antimicrobial function against grampositive bacteria, especially *Listeria monocytogenes* (*L.m.*). On the one hand we could show that human nGr secrete BPI after stimulation with listeria, on the other hand that BPI binds to the bacteria. This binding leads to an antimicrobial action of BPI against *L.m.*.

Intragastral infection of wild type (WT) mice led to an increased expression of BPI-mRNA in the small intestine, suggesting a role for BPI during listeriosis. Independent on the application route BPI deficient (BPI<sup>-/-</sup>) mice were more susceptible against an infection with *L.m.*. This was signified by an enhanced bacterial burden in the infected tissue as well as heightened systemic inflammation. Nevertheless, BPI mice finally were able to control the infection.

To clarify, which cells are responsible for the stronger susceptibility of BPI<sup>-/-</sup> mice *ex vivo* generated immune cells belonging to the first line of defense were analysed. Neither isolated macrophages nor DCs derived from BPI<sup>-/-</sup> mice were able to recapitulate the *in vivo* phenotype of the mice.

However the stimulation of nGr of WT- and BPI<sup>-/-</sup> mice with UV-inactivated listeria displayed significant differences for TNF- and ROS-production. BPI<sup>-/-</sup> nGr were hyperresonsive towards the stimulation with *L.m.*. The phagocytosis effectivity of living bacteria via nGr of both genotypes was comparable, but clear differences for their ability to kill the bacteria after 24 h were observed. The BPI<sup>-/-</sup> nGr harbored a threefold higher bacterial load compared to WT-nGr after 24 h.

These *in vitro* data lead us to conclude, that nGr seem to be responsible for the increased susceptibility of the BPI<sup>-/-</sup> mice during a listeriosis. Since BPI<sup>-/-</sup> mice are able to combat the listeria-infection effectively one can assume that a protective adaptive immune response is independent on the expression of BPI.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	antimikrobielles Protein
AS	Aminosäure
BI 6	Black 6
BPI	bactericidal/permeability-increasing Protein
BPI-/-	BPI-defizient
BSA	Bovines Serum Albumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CFU	Colony forming unit
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
mDC	Myeloide dendritische Zelle
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszens-activated Cell Sorting Durchflusszytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
fw	forward
g	Gramm
hBPI	humanes BPI
HGF	Hepatocyte growth factor
I	Ionomycin
IFN	Interferon
IRF	Interferon-regulatory factor
Ig	Immunglobulin
i.g.	intrastral
InIA	Internalin A
InIB	Internalin B
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
L	Liter
LB	Lysogeny broth

LBP	Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
<i>L.m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lipidtransferprotein
m	milli
M	Molar
MACS	Magnetische Zellseparation
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mk	monoklonal
mL	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
n	nano
nGr	neutrophile Granulozyten
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NET	Neutrophil extracellular traps
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NK-Zellen	Natürliche-Killer Zellen
NLR	NOD-like Receptor
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen-associated-molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglykan
pGr	peritoneale Granulozyten
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
rev	rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	Toll-like Rezeptor
üN	über Nacht
WT	Wildtyp

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktur und Funktion von BPI (modifiziert nach Schultz and Weiss 2007) .....	2
Abbildung 1-2: Aufbau der Bakterienzellwand (modifiziert nach Hajipour et al. 2012).....	3
Abbildung 1-3: Intrazellulärer Infektionszyklus von <i>L.m.</i> (Pizarro-Cerda et al., 2012).....	6
Abbildung 1-4: Überquerung der intestinalen Barriere durch <i>L.m.</i> (Pizarro-Cerda et al., 2012).....	8
Abbildung 1-5: Modell einer Inflammasom-Aktivierung durch <i>L.m.</i> (Eitel, Suttrop et al. 2010) .....	10
Abbildung 4-1: humane nGr reagieren mit verstärkter BPI-Expression auf Stimulation mit <i>L.m.</i> .....	38
Abbildung 4-2: CFSE Färbung von <i>L.m.</i> .....	39
Abbildung 4-3 Fluoreszenzmikroskopie <i>L.m.</i> und hBPI .....	40
Abbildung 4-4: humanes BPI-Peptid hat antimikrobielle Wirkung gegenüber klinischen Listerienisolaten und gegenüber <i>L.m.</i> Stamm EGD .....	41
Abbildung 4-5: Erhöhte mBPI Expression im Dünndarm nach Listerieninfektion.....	42
Abbildung 4-6: Verlauf einer Listerieninfektion in WT und BPI-/- Mäusen .....	44
Abbildung 4-7: BPI-/- Mäuse zeigen im Vergleich zu WT-Mäusen nach intravenöser Infektion mit Listerien höhere Bakterienlast in Milz und Leber.....	46
Abbildung 4-8: TNF- und IL-6 Konzentration im Serum infizierter Mäuse.....	47
Abbildung 4-9: Milzzellpopulationen von WT und BPI-/- Mäusen im Verlauf einer Listeriose .....	49
Abbildung 4-10: Milzzellstimulation mit LPS und <i>L.m.</i> .....	51
Abbildung 4-11: Makrophagen und DCs aus WT und BPI-/- Mäusen sind in der Lage Listerien abzutöten.....	53
Abbildung 4-12: Vergleich von WT und BPI-/- nGr .....	55
Abbildung 4-13: DCFH-DA Assay mit nGr aus WT und BPI-/- Mäusen .....	57
Abbildung 4-14: BPI-/- nGr zeigen im Vergleich zu WT nGr gesteigerte TNF Produktion nach Stimulation mit <i>L.m.</i> .....	58
Abbildung 4-15: <i>in vitro</i> Infektion von WT und BPI-/- nGr mit <i>L.m.</i> .....	60
Abbildung 4-16: WT pGr töten effektiver <i>L.m.</i> als BPI-/- pGr .....	61

## 10. Literaturverzeichnis

Abreu, M. T., M. Fukata and M. Arditi (2005). "TLR signaling in the gut in health and disease." J Immunol **174**(8): 4453-4460.

Aichele, D., M. Schnare, M. Saake, M. Röllinghoff and A. Gessner (2006). "Expression and antimicrobial function of bactericidal permeability-increasing protein in cystic fibrosis patients." Infect Immun **74**(8): 4708-4714.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Auerbuch, V., D. G. Brockstedt, N. Meyer-Morse, M. O'Riordan and D. A. Portnoy (2004). "Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*." J Exp Med **200**(4): 527-533.

Beamer, L. J., S. F. Carroll and D. Eisenberg (1997). "Crystal Structure of Human BPI and Two Bound Phospholipids at 2.4 Angstrom Resolution." Science **276**(5320): 1861-1864.

Beveridge, T. J. (1999). "Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles." J Bacteriol **181**(16): 4725-4733.

Birmpa, A., V. Sfika and A. Vantarakis (2013). "Ultraviolet light and Ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods." Int J Food Microbiol.

Bonazzi, M. and P. Cossart (2006). "Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery." FEBS Lett **580**(12): 2962-2967.

Braun, L., F. Nato, B. Payrastre, J. C. Mazié and P. Cossart (1999). "The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling." Mol Microbiol **34**(1): 10-23.

Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-250.

Busch, D. H., K. Kerksiek and E. G. Pamer (1999). "Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the in vivo T-cell response to bacterial infection." Immunol Rev **172**: 163-169.

Calafat, J., H. Janssen, E. F. Knol, J. Malm and A. Egesten (2000). "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular activation." APMIS **108**(3): 201-208.

Call, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. L. Bolgos, D. E. Newcomb and D. G. Remick (2001). "Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment." Am J Pathol **158**(2): 715-721.

Canny, G., E. Cario, A. Lennartsson, U. Gullberg, C. Brennan, O. Levy and S. P. Colgan (2006). "Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal/permeability-increasing protein." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(3): G557-567.

Canny, G., O. Levy, G. T. Furuta, S. Narravula-Alipati, R. B. Sisson, C. N. Serhan and S. P. Colgan (2002). "Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3902-3907.

Cario, E. (2005). "Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2." Gut **54**(8): 1182-1193.

Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7017.

Carr, K. D., A. N. Sieve, M. Indramohan, T. J. Break, S. Lee and R. E. Berg (2011). "Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection." Eur J Immunol **41**(9): 2666-2676.

Coquery, C. M., W. Loo, M. Buszko, J. Lannigan and L. D. Erickson (2012). "Optimized protocol for the isolation of spleen-resident murine neutrophils." Cytometry A **81**(9): 806-814.

Corr, S., C. Hill and C. G. Gahan (2006). "An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells." Microb Pathog **41**(6): 241-250.

Cousens, L. P. and E. J. Wing (2000). "Innate defenses in the liver during *Listeria* infection." Immunol Rev **174**: 150-159.

Creagh, E. M. and L. A. O'Neill (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." Trends Immunol **27**(8): 352-357.

Dunn, P. L. and R. J. North (1991). "Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis." Infect Immun **59**(9): 2892-2900.

Eckert, M., I. Wittmann, M. Röllinghoff, A. Gessner and M. Schnare (2006). "Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta-dependent pathways." J Immunol **176**(1): 522-528.

- Edelson, B. T. (2012). "Dendritic cells in *Listeria monocytogenes* infection." Adv Immunol **113**: 33-49.
- Eitel, J., N. Suttorp and B. Opitz (2010). "Innate immune recognition and inflammasome activation in *Listeria monocytogenes* infection." Front Microbiol **1**: 149.
- Elbim, C. and G. Lizard (2009). "Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations." Cytometry A **75**(6): 475-481.
- Elsbach, P. (1994). "Bactericidal permeability-increasing protein in host defence against gram-negative bacteria and endotoxin." Ciba Found Symp **186**: 176-187; discussion 187-179.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.
- Gandhi, M. and M. L. Chikindas (2007). "*Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive." Int J Food Microbiol **113**(1): 1-15.
- Gullberg, U., E. Andersson, D. Garwicz, A. Lindmark and I. Olsson (1997). "Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development." Eur J Haematol **58**(3): 137-153.
- Hajipour, M. J., K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I. R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak and M. Mahmoudi (2012). "Antibacterial properties of nanoparticles." Trends Biotechnol **30**(10): 499-511.
- Havell, E. A. (1989). "Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance." The Journal of Immunology **143**(9): 2894-2899.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-1103.
- Hoge, J., I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John and H.-W. Mittrücker (2013). "IL-6 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes* via Classical IL-6 Signaling." The Journal of Immunology **190**(2): 703-711.
- Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark and A. Richter-Dahlfors (2002). "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells." J Exp Med **195**(5): 559-570.
- Iovine, N. M., P. Elsbach and J. Weiss (1997). "An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10973-10978.

Jahrbuch RKI, Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2012, Berlin, 2013, S. 136-140

Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman and R. A. Lang (2002). "In vivo , depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity **17**(2): 211-220.

Kapadia, D., A. Sadikovic, Y. Vanloubbeeck, D. Brockstedt and L. Fong (2011). "Interplay between CD8 $\alpha$ + dendritic cells and monocytes in response to *Listeria monocytogenes* infection attenuates T cell responses." PLoS One **6**(4): e19376.

Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.

Khan, A. A., L. H. Lambert, J. S. Remington and F. G. Araujo (1999). "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) in combination with sulfadiazine is active against *Toxoplasma gondii*." Antimicrob Agents Chemother **43**(4): 758-762.

Khelef, N., M. Lecuit, H. Bierne and P. Cossart (2006). "Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InIB protein." Cell Microbiol **8**(3): 457-470.

Kolaczkowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol **13**(3): 159-175.

Ladel, C. H., I. E. Flesch, J. Arnoldi and S. H. Kaufmann (1994). "Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **153**(7): 3116-3122.

Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner and P. Cossart (1999). "A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*." EMBO J **18**(14): 3956-3963.

Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet and P. Cossart (2001). "A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier." Science **292**(5522): 1722-1725.

Lennartsson, A., K. Pieters, T. Ullmark, K. Vidovic and U. Gullberg (2003). "AML-1, PU.1, and Sp3 regulate expression of human bactericidal/permeability-increasing protein." Biochem Biophys Res Commun **311**(4): 853-863.

Liu, M., K. Chen, T. Yoshimura, Y. Liu, W. Gong, A. Wang, J. L. Gao, P. M. Murphy and J. M. Wang (2012). "Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*." Sci Rep **2**: 786.

Lominadze, G., D. W. Powell, G. C. Luerman, A. J. Link, R. A. Ward and K. R. McLeish (2005). "Proteomic analysis of human neutrophil granules." Mol Cell Proteomics **4**(10): 1503-1521.

Machata, S., S. Tchatalbachev, W. Mohamed, L. Jänsch, T. Hain and T. Chakraborty (2008). "Lipoproteins of *Listeria monocytogenes* are critical for virulence and TLR2-mediated immune activation." J Immunol **181**(3): 2028-2035.

Macpherson, A. J., M. B. Geuking and K. D. McCoy (2005). "Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria." Immunology **115**(2): 153-162.

Mannion, B. A., J. Weiss and P. Elsbach (1990). "Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*." J Clin Invest **85**(3): 853-860.

Marra, M. N., C. G. Wilde, J. E. Griffith, J. L. Snable and R. W. Scott (1990). "Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity." J Immunol **144**(2): 662-666.

McCaffrey, R. L., P. Fawcett, M. O'Riordan, K. D. Lee, E. A. Havell, P. O. Brown and D. A. Portnoy (2004). "A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11386-11391.

Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, Mege R-M and P. Cossart (1996). "E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells." Cell **84**(6): 923-932.

Munford, R. S. (2005). "Invited review: Detoxifying endotoxin: time, place and person." Journal of Endotoxin Research **11**(2): 69-84.

Nagendra, S. and A. J. Schlueter (2004). "Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G." Cytometry A **58**(2): 195-200.

Neuenhahn, M., K. M. Kerksiek, M. Nauerth, M. H. Suhre, M. Schiemann, F. E. Gebhardt, C. Stemberger, K. Panthel, S. Schröder, T. Chakraborty, S. Jung, H. Hochrein, H. Rüssmann, T. Brocker and D. H. Busch (2006). "CD8alpha+ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen." Immunity **25**(4): 619-630.

Nikitas, G., C. Deschamps, O. Disson, T. Niault, P. Cossart and M. Lecuit (2011). "Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin." J Exp Med **208**(11): 2263-2277.

Nishimura, H., A. Gogami, Y. Miyagawa, A. Nanbo, Y. Murakami, T. Baba and S. Nagasawa (2001). "Bactericidal/permeability-increasing protein promotes complement activation for neutrophil-mediated phagocytosis on bacterial surface." Immunology **103**(4): 519-525.

Ofek, I. and N. Sharon (1988). "Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria." Infect Immun **56**(3): 539-547.

- Ooi, C. E., J. Weiss, M. E. Doerfler and P. Elsbach (1991). "Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils." The Journal of Experimental Medicine **174**(3): 649-655.
- Peschel, A. and L. V. Collins (2001). "Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin." Peptides **22**(10): 1651-1659.
- Pizarro-Cerdá, J., A. Kühbacher and P. Cossart (2012). "Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.
- Portnoy, D. A., P. S. Jacks and D. J. Hinrichs (1988). "Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*." J Exp Med **167**(4): 1459-1471.
- Proell, M., S. J. Riedl, J. H. Fritz, A. M. Rojas and R. Schwarzenbacher (2008). "The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences." PLoS One **3**(4): e2119.
- Robinson, J. M. (2009). "Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species." Histochem Cell Biol **131**(4): 465-469.
- Rocourt, J., C. Jacquet and A. Reilly (2000). "Epidemiology of human listeriosis and seafoods." Int J Food Microbiol **62**(3): 197-209.
- Saito, T., H. Takahashi, H. Doken, H. Koyama and Y. Aratani (2005). "Phorbol myristate acetate induces neutrophil death through activation of p38 mitogen-activated protein kinase that requires endogenous reactive oxygen species other than HOCl." Biosci Biotechnol Biochem **69**(11): 2207-2212.
- Schultz, H. and J. P. Weiss (2007). "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease." Clin Chim Acta **384**(1-2): 12-23.
- Schuppler, M. and M. J. Loessner (2010). "The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System." Int J Inflam **2010**: 704321.
- Seki, E., H. Tsutsui, N. M. Tsuji, N. Hayashi, K. Adachi, H. Nakano, S. Futatsugi-Yumikura, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, J. Fujimoto and K. Nakanishi (2002). "Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice." J Immunol **169**(7): 3863-3868.

Serbina, N. V., C. Shi and E. G. Pamer (2012). "Monocyte-mediated immune defense against murine *Listeria monocytogenes* infection." Adv Immunol **113**: 119-134.

Shen, Y., M. Naujokas, M. Park and K. Ireton (2000). "InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase." Cell **103**(3): 501-510.

Shi, C., T. M. Hohl, I. Leiner, M. J. Equinda, X. Fan and E. G. Pamer (2011). "Ly6G<sup>+</sup> neutrophils are dispensable for defense against systemic *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **187**(10): 5293-5298.

Srivastava, A., H. Casey, N. Johnson, O. Levy and R. Malley (2007). "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein rBPI21 protects against pneumococcal disease." Infect Immun **75**(1): 342-349.

Tripp, C. S., S. F. Wolf and E. R. Unanue (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3725-3729.

Tuominen-Gustafsson, H., M. Penttinen, J. Hytönen and M. K. Viljanen (2006). "Use of CFSE staining of borreliae in studies on the interaction between borreliae and human neutrophils." BMC Microbiol **6**: 92.

van der Schaft, D. W. J., E. A. H. Toebes, J. R. Haseman, K. H. Mayo and A. W. Griffioen (2000). "Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells." Blood **96**(1): 176-181.

Verschoor, A., M. Neuenhahn, A. A. Navarini, P. Graef, A. Plaumann, A. Seidlmeier, B. Nieswandt, S. Massberg, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner and D. H. Busch (2011). "A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3." Nat Immunol **12**(12): 1194-1201.

Viegas, N., L. Andzinski, C. F. Wu, R. M. Komoll, N. Gekara, K. E. Dittmar, S. Weiss and J. Jablonska (2013). "IFN- $\gamma$  production by CD27(+) NK cells exacerbates *Listeria monocytogenes* infection in mice by inhibiting granulocyte mobilization." Eur J Immunol.

Vázquez-Boland, J. A., G. Domínguez-Bernal, B. González-Zorn, J. Kreft and W. Goebel (2001). "Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*." Microbes Infect **3**(7): 571-584.

Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland and J. Kreft (2001). "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants." Clin Microbiol Rev **14**(3): 584-640.

- Waite, J. C., I. Leiner, P. Lauer, C. S. Rae, G. Barbet, H. Zheng, D. A. Portnoy, E. G. Pamer and M. L. Dustin (2011). "Dynamic imaging of the effector immune response to listeria infection in vivo." PLoS Pathog **7**(3): e1001326.
- Walley, K. R., N. W. Lukacs, T. J. Standiford, R. M. Strieter and S. L. Kunkel (1996). "Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis." Infect Immun **64**(11): 4733-4738.
- Weber, J. R., D. Freyer, C. Alexander, N. W. Schröder, A. Reiss, C. Küster, D. Pfeil, E. I. Tuomanen and R. R. Schumann (2003). "Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein." Immunity **19**(2): 269-279.
- Weiss, J. (2003). "Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria." Biochem Soc Trans **31**(Pt 4): 785-790.
- Weiss, J., P. Elsbach, I. Olsson and H. Odeberg (1978). "Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes." J Biol Chem **253**(8): 2664-2672.
- Weiss, J., P. Elsbach, C. Shu, J. Castillo, L. Grinna, A. Horwitz and G. Theofan (1992). "Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH<sub>2</sub>-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria." J Clin Invest **90**(3): 1122-1130.
- Weston, S. A. and C. R. Parish (1990). "New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy." J Immunol Methods **133**(1): 87-97.
- Wiese, A., K. Brandenburg, S. F. Carroll, E. T. Rietschel and U. Seydel (1997). "Mechanisms of action of bactericidal/permeability-increasing protein BPI on reconstituted outer membranes of gram-negative bacteria." Biochemistry **36**(33): 10311-10319.
- Wilde, C. G., J. J. Seilhamer, M. McGrogan, N. Ashton, J. L. Snable, J. C. Lane, S. R. Leong, M. B. Thornton, K. L. Miller and R. W. Scott (1994). "Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation." Journal of Biological Chemistry **269**(26): 17411-17416.
- Williams, M. A., R. L. Schmidt and L. L. Lenz (2012). "Early events regulating immunity and pathogenesis during *Listeria monocytogenes* infection." Trends Immunol **33**(10): 488-495.
- Wittmann, I., M. Schönefeld, D. Aichele, G. Groer, A. Gessner and M. Schnare (2008). "Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gram-negative bacteria." J Immunol **180**(11): 7546-7552.

Wollert, T., B. Pasche, M. Rochon, S. Deppenmeier, J. van den Heuvel, A. D. Gruber, D. W. Heinz, A. Lengeling and W. D. Schubert (2007). "Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design." Cell **129**(5): 891-902.

Zal, T., A. Volkmann and B. Stockinger (1994). "Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen." J Exp Med **180**(6): 2089-2099.

Zammit, D. J., L. S. Cauley, Q. M. Pham and L. Lefrançois (2005). "Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection." Immunity **22**(5): 561-570.

## 11. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden auf der „Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI) 2013“ in Mainz als Poster präsentiert und als Abstract veröffentlicht:

„A novel function for BPI: BPI influences the course of murine listeriosis“

E.-M. Wittmann (Marburg), Maria Stromiedel (Marburg), Ulrich Steinhoff (Marburg),  
André Gessner (Regensburg), Markus Schnare (Marburg)

## 12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Eva-Maria Wittmann, geborene Herold, geboren am 31.03.1983 in Fürth, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Wirkung von Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) auf *Listeria monocytogenes* und seine Funktion im Rahmen einer Listerieninfektion“ im Institut für Immunologie unter Leitung von Prof. Dr. Stefan Bauer mit Unterstützung durch Prof. Dr. Markus Schnare ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

### **13. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Bauer S., Bauer U., Becker, Bette, Brehm, Bröring, Daut, Del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Garten, Glorius, Gudermann, Hasilik, Hassel, Hertl, Huber, Jacob, Kirchner, Klenk, Knöller, Krebber, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Matrosovich, Moll, Mühlberger, Müller, Müller-Brüsselbach, Renz, Roeper, Röhm, Schäfer, Schnare, Schütz, Schwarz, Steinhoff, Suske, Weihe, Westermann.

## 14. Danksagung

Mein allererster und allergrößter Dank gilt Prof. Markus Schnare für die Bereitstellung des Themas, seine stets offene Tür und seine nahezu unermüdliche Hilfsbereitschaft-unabhängig ob es um die Diskussion wissenschaftlicher Fragen oder praktische Hilfe im Labor ging.

Als zweites möchte ich Maria Stromiedel und Jenny Großmann danken. Die beiden sind nicht nur die besten Arbeitskolleginnen der Welt, sondern auch die besten Freundinnen, die man sich wünschen kann. Ohne Eure Hilfe und stete Bereitschaft bei Not am Mann einzuspringen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt Euer beider Blick fürs Detail ist unbezahlbar. Ihr wart der Grund warum ich jeden Tag gerne zur Arbeit ging...

Dann möchte ich herzlich Herrn Prof. Steinhoff für die Unterstützung bei den *in vivo* Experimenten danken und Herrn Prof. Bauer für wissenschaftlichen Input, kleine Small-Talk Battles auf dem Flur und die zur Verfügungstellung des Equipments-wobei noch eine PCR Maschine wirklich von Nöten wäre ;)

Auch der gesamten Arbeitsgruppe Schnare möchte ich danken. Torben, Sandra und Olaf haben ein reibungsloses Arbeiten im Labor ermöglicht, haben in vielen ausweglosen Situationen (... ist leer!) doch noch eine Lösung gefunden und ich konnte Euch immer wieder mit wundervollen FACS-Bildern erfreuen.

Insbesondere für die Hilfe bei *in vivo* Experimenten mit unzähligen LB-Platten möchte ich allen beteiligten Helfern danken. Auch dem ganzen Institut für Mikrobiologie, die ihre Arbeitsplätze zur Verfügung gestellt haben, mal nebenbei ein Bakterium identifiziert und ohne deren Photometer hätten wir gar nicht anfangen brauchen.

Zuletzt danke ich dem ganzen Institut, ganz besonders Henriette, Lisa, Sonja, Marion, Gundi für all die Aufgaben, die im Hintergrund laufen, das gute Arbeitsklima und dem „Statistenzimmer“ als Anlaufpunkt für alle Sorgen und Nöte!

...und Danke Frida, dass ich Dich kennenlernen durfte....

Natürlich nicht zu vergessen die Marburger Mädelsrunde: nochmal Jenny, Svenja, Maïke und Yvonne, die nicht nur mit „Wednesday is Friendsday“ den Alltag verschönert haben...manchmal wurden auch wissenschaftliche Gespräche geführt-manchmal...

Dank an die ganze Familie für jegliche Unterstützung seit Beginn des Studiums.

Am Schluss Danke an Flo, für den BPI nunmal der „Bundesverband der pharmazeutischen Industrie“ geblieben ist und das ist auch völlig ok so! Danke für die schöne Zeit, die wir in Marburg miteinander verbringen konnten! Ich bin gespannt auf die Zukunft...