

**Untersuchungen zur funktionellen Konversion von
bakteriell re-programmierten humanen Monozyten**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dr. med. Maya Caroline André
aus Bremen

Tübingen 2012



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

Die vorliegende Doktorarbeit wurde unter der Leitung von

- Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanovic, Eberhard-Karls Universität Tübingen,

und der Betreuung von

- Frau Prof. Dr. K. Lauber, Ludwigs-Maximilian Universität München

in der Zeit vom Januar 2007 bis Februar 2012 an der Universitätskinderklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur funktionellen Konversion von bakteriell re-programmierten humanen Monozyten“ selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwandt habe.

(Dr. med. Maya Caroline André)

Tübingen, den 29.06.2012

Tag der mündl. Prüfung: 29.06.2012

Dekan: Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanovic

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Lauber, LMU München



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

DANKSAGUNG

In besonderer Weise möchte ich mich an dieser Stelle bei *Frau Prof. Dr. K. Lauber* bedanken, ohne deren wertvolle Vorschläge, ihr kritisches Hinterfragen aber auch ohne ihre stete Ermunterung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ich durfte viel Grundsätzliches von ihr lernen und hoffe, dass unsere Zusammenarbeit auch künftig bestehen bleiben wird.

Ich möchte *Herrn Prof. Dr. T. W. Orlikowsky* für die Überlassung des Themas danken. Die vielen langen, emotionalen und heiteren Diskussionen in den Nacht- und Wochenenddiensten auf unserer neonatologischen Intensivstation werden mir unvergessen bleiben. Unser gemeinsames, unüberhörbares Lachen hat das Leben schöner gemacht...

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. S. Stevanovic bedanken, der sich so bereitwillig erklärt hat, die Betreuung dieser Doktorarbeit von Seiten der biochemischen Fakultät zu übernehmen und den hier dargestellten Inhalt so rasch und sorgfältig zu prüfen.

Danken möchte ich auch *Frau MTA Barbara Goecke* und *Herrn cand. med. Philip Glemser*, welche mich bei unzähligen praktischen Dingen unterstützt haben und immer ein ermunterndes Wort fanden. Ohne ihre technische Hilfe wäre ein Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Die hier dargestellten Überlegungen und Analysen liegen in publizierter Form vor und stellen die gemeinsame geistige Leistung aller hieran beteiligten *Koautoren* dar. Ihnen allen danke ich für die bereits viele Jahre währende kollegiale Zusammenarbeit.

Ganz besonders danken möchte ich aber meinem Mann *Thomas* und *meinen Schwiegereltern Christine und Michael*, welche mich immer so selbstlos unterstützt und gefördert haben und ohne deren Hilfe mir meine wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie alle drei helfen mir jeden Tag aufs Neue, das Muttersein mit dem Ärztinnensein zu vereinbaren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

FINANZIERUNG

Die hier dargestellten *in vitro* Arbeiten wurden durch das Fortune Programm der Universität Tübingen, No. 1386-0-0 (gerichtet an Dr. Chr. Gille und Dr. K. Lauber) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 685 und SFB 914) gerichtet an Dr. K. Lauber finanziert.

Die Etablierung des *in vivo* Modells wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft KFO 183 / TP 4 gerichtet an die Verfasserin dieser Arbeit ermöglicht.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

LISTE DER VERWANDTEN ABKÜRZUNGEN

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Lösung
AK	Antikörper
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation)
CR	Komplementrezeptoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz aktivierte Durchflusszytometrie
FCS	fötale Kälberserum
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HIS Mäuse	human immune system Mäuse
huNSG	humanisierte NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>IL2rg</i> ^{tmWjl} /Sz Mäuse
i.v.	intravenös
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
Lox-1	lectin-like oxLDL receptor
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität (mean fluorescence intensity)
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOI	multiplicity of infection
mPBSCs	mobilized peripheral blood stem cells
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PRR	pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserin
RT-PCR	Echtzeit-PCR
SC	Stammzellen
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SR	Scavenger Rezeptoren



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

INHALTSVERZEICHNIS

FRAGESTELLUNG	9
EINLEITUNG	10
Grundlegendes zur menschlichen Sepsis	10
Immunologische Grundlagen zur Sepsis	10
Klinische Besonderheiten des CARS	11
Rolle der Monozyten während des CARS	11
Phänotypische und funktionelle Differenzierung des inflammatorischen Monozyten	12
Experimentelle Therapieansätze zur Modulation des CARS	13
Human-murin chimäres NOD SCID $\gamma c^{-/-}$ Mausmodell	13
MATERIAL UND METHODEN	14
<i>In vitro</i> Modell A: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten	14
Akquirierung der Spender	14
Puffer und Zellkulturreagenzien	14
Durchflusszytometrische Analyse (FACS Analyse)	15
Bakterienkultur	16
Phagozytose Untersuchungen	16
Stimulation des Toll-like Receptor 4 (TLR4)	18
Phagozytose von apoptotischen Zellen	18
Zytokin "Capture Assay" und Bestimmung der T Zell Proliferation	18
Charakterisierung des monozytären Zytokin Profils	19
Multiplex bead assay	20
Monozytenaufreinigung und Durchführung der quantitativen RT-PCR	20
<i>In vivo</i> Modell B: Stammzelltransplantation von NSG Mäusen zur Generierung „humaner“ Surrogatmonozyten	21
Personelle Voraussetzungen zur Durchführung der Tierexperimente	21
Mäuse	21
Mobilisation, Gewinnung und Isolation peripherer Stammzellen	21
Humanisierung der NSG Mäuse (huNSG Mäuse)	22
Retrobulbäre Blutentnahme und Präparation der Lymphozyten	22
Engraftment Analysen in huNSG Mäusen	22
Untersuchungen zur T Zell Proliferation in huNSG Mäusen	23



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Phagozytose Untersuchungen in huNSG Mäusen	24
<i>In vivo</i> Gabe von <i>E. coli</i> LPS	24
Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	24
Statistische Auswertung	25
ERGEBNISSE.....	26
Ergebnisse „ <i>In vitro</i> Modell A“: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten ..	26
Der Erstkontakt mit <i>E. coli</i> Bakterien reduziert die nachfolgende Phagozytoseleistung von kultivierten Monozyten.	26
Die Inhibition der Phagozytoseleistung setzt die Exposition gegenüber intakten Bakterien voraus und lässt sich nicht durch die Zugabe autologer apoptotischer PBMCs, LPS Vorbehandlung oder durch Exposition gegenüber isolierten Zytokinen hervorrufen.	30
Bakteriell vor-stimulierte Monozyten weisen eine intakte Phagozytoseleistung für apoptotische Zellen auf.....	35
Die bakterielle Vorstimulation induziert eine FcγR und Scavenger Receptor (SR) Herunterregulation in CD14 ⁺ Monozyten.....	36
Die Herunterregulation von Fcγ und Scavenger Rezeptoren trägt funktionell zur Phagozytosehemmung von re-programmierten Monozyten bei.	38
Re-programmierte Monozyten zeigen einen charakteristischen Phänotyp mit intakter Fähigkeit zur T Zell Stimulation und einem charakteristischem IL6 ^{hi} IL10 ^{lo} IL12/23p40 ^{lo} TGF-β ^{int} Zytokinprofil.....	41
Ergebnisse „ <i>In vivo</i> Modell B“: Stammzelltransplantation von NSG Mäusen zur Generierung „humaner“ Surrogatmonozyten	46
Die Transplantation adulter huNSG Mäuse erlaubt die Generierung myelomonozytärer Zellen.	46
huNSG-generierte Monozyten zeigen ein phänotypisch vergleichbares Rezeptorexpressionsprofil zu adulten Kontrollmonozyten.....	47
huNSG-generierte CD14 ⁺ Monozyten zeigen eine verminderte T Zell stimulierende Kapazität bei erhaltener Phagozytoseleistung.	49
huNSG-generierte CD14 ⁺ Monozyten zeigen nach <i>in vivo</i> Gabe von moderaten LPS Dosen eine unzureichende pro-inflammatorische Zytokinantwort.	52
DISKUSSION.....	54
„ <i>In vitro</i> Modell A“: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten	54
„ <i>In vivo</i> Modell B“: Stammzelltransplantation von immun-permissiven NSG Mäusen zur Generierung „humaner“ Surrogatmonozyten	58
LITERATUR	63
ANHANG	69



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

FRAGESTELLUNG

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche phänotypischen und funktionellen Veränderungen humane Monozyten nach einem bakteriellen Erstkontakt aufweisen.

In der Literatur ist beschrieben, dass sich Monozyten im Rahmen einer Sepsis von pro-inflammatorisch wirksamen zu anti-inflammatorischen Zellen wandeln können. In dieser 2. anti-inflammatorischen Phase einer Sepsis sind die Patienten hochgradig gefährdet, an krankenhauserworbenen (nosokomialen) Infektion zu erkranken. Wir haben daher ein *in vitro* Modell entwickelt, um anti-inflammatorische Monozyten funktionell näher charakterisieren zu können. In einem zweiten, tierexperimentellen Schritt haben wir die Grundlage dazu gelegt, die Monozytenfunktionen in einem humanisierten Mausmodell *in vivo* näher untersuchen zu können.

Letztlich möchten wir mit diesen Arbeiten dazu beitragen, dass die Funktionalität anti-inflammatorischer Monozyten näher verstanden und möglicherweise auch moduliert werden kann.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

EINLEITUNG

Grundlegendes zur menschlichen Sepsis

Bei einer Sepsis handelt es sich um eine vermutete oder nachgewiesene bakterielle Infektion, welche typischerweise mit Zeichen eines systemischen Inflammationssyndroms einhergeht und eine Letalität von 40-70% besitzt (1). Besonders betroffen sind Frühgeborene und immun-supprimierte Kinder bzw. Erwachsene, allerdings können auch gesunde, immun-kompetente Individuen an einer fulminanten Sepsis erkranken. Pathophysiologisch liegt der Sepsis eine komplexe Interaktion des infizierenden Organismus mit dem menschlichen angeborenen und adaptiven Immunsystem zugrunde. Das Zusammenspiel immunologischer, inflammatorischer und koagulatorischer Antworten kann in einer pathophysiologischen Kaskade zu einer Ischämie und Hypoxie verschiedener Organe führen, deren Ausmass letztlich bestimmend für die Organschädigungen und das Schicksal der Patienten sind.

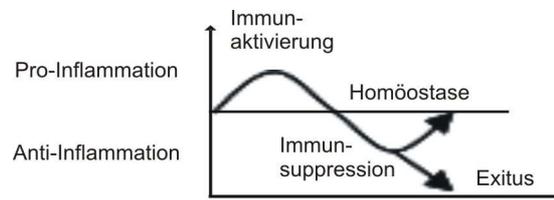
Immunologische Grundlagen zur Sepsis

Im Rahmen der initialen Interaktion von bakteriellen Polysaccharidbestandteilen (z.B. Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Erreger) mit bestimmten pattern-recognition receptors (PRR) auf Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf Monozyten) wird die initiale pro-inflammatorische Immunantwort (SIRS = systemic inflammatory response syndrome) induziert und eine massive Apoptose-induzierte Depletion von Lymphozyten ausgelöst. Es werden charakteristische pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL1 und IL6 freigesetzt, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen u.a. auf Monozyten und Endothelzellen induzieren und dadurch eine verstärkte antimikrobielle Aktivität aber auch eine erhöhte Gefässpermeabilität auslösen können. Parallel hierzu wird eine mehr oder weniger stark ausgeprägte anti-inflammatorische Immunantwort eingeleitet (CARS = compensatory anti-inflammatory response syndrome), welche wesentlich durch die Zytokine IL4, IL10 und TGF- β gesteuert wird und die pro-inflammatorische Antwort letztlich kontrollieren und begrenzen soll. Beide Kaskaden induzieren und modulieren die adaptive Immunantwort, so wird die Antikörperbildung von B Zellen induziert und spezifische CD4⁺ T Zellen zur Zytokinsekretion und Proliferation



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

angeregt. Letztlich bestimmt die Balance pro- und anti-inflammatorischer Reaktionen, ob es zu einer Gesundung des Patienten oder zu einem Exitus letalis kommt (Skizze 1).



Skizze 1. Zeitliche Kinetik immunologischer Reaktionen im Rahmen einer Sepsis.
Adaptiert nach (3).

Klinische Besonderheiten des CARS

Klinisch zeigen Patienten in der 2. Phase einer septischen Erkrankung eine erhöhte Neigung zu meist Prognose-bestimmenden, Krankenhaus-erworbenen (nosokomialen) Zweitinfektionen. Allerdings ist wenig zu den hierzu führenden immunologischen Abläufen bekannt. Bekannt ist, dass die Immunsuppression an einer T Zell Anergie gegenüber klassischen Hauttestantigenen, einer verminderten *in vitro* Proliferation von Lymphozyten und einer reduzierten MHC Klasse II Expression (HLA-DR) auf Monozyten erkennbar (Übersicht bei (2)).

Rolle der Monozyten während des CARS

Die funktionellen Veränderungen von Monozyten während eines CARS sind noch unzureichend charakterisiert, aber umso bedeutsamer als septische Patienten mit einer sekundär auftretenden, verringerten Monozytenfunktionalität eine besonders schlechte Prognose aufweisen (4). Es ist bislang bekannt, dass Monozyten während des CARS eine Reaktionsträgheit im Sinne einer „Hyporesponsivität“ zeigen, welche früher global als „Immunparalyse“ bezeichnet wurde. Experimentell versuchte man die Situation eines CARS durch LPS Gabe zu imitieren und bezeichnete die zu beobachtenden funktionellen Veränderungen der Monozyten als eine „Endotoxin-Toleranz“ (5). Es wurde beschrieben, dass „Endotoxin-tolerante“ Monozyten nach erneuter LPS Gabe eine deutlich reduzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zeigen (6), (7), dass sie eine reduzierte Fähigkeit zur Induktion einer T Zell Proliferation aufweisen (8), dass sie aber gleichviel oder mehr



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

CD14 Rezeptor als Kontrollmonozyten exprimieren (9) und unter gewissen Bedingungen eine gesteigerte Phagozytoseleistung zeigen können (10). Allerdings hat sich im Laufe der letzten Jahre gezeigt, dass Untersuchungen zur Funktionalität von Monozyten nach LPS Gabe zwar sinnvoll zur Standardisierung der experimentellen Bedingungen sind, dass die Exposition des Monozyten gegenüber lebenden Bakterien der Realität aber sehr viel näher kommt und damit aussagekräftiger ist. So zeigte sich bei Monozyten septischer Patienten zwar auch eine deutliche Verminderung der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion nach *in vitro* LPS Gabe (11) und eine niedrigere HLA Molekül Klasse II (z.B. HLA-DR) Expression als in Kontrollmonozyten (8), (12), allerdings war der CD14⁺ Rezeptor deutlich herunterreguliert (11) und die Phagozytoseleistung eher verringert (eigene Vorarbeiten, siehe unten). Letztlich mehren sich die Daten, dass beim CARS keine eigentliche „Immunparalyse“ im engeren Sinne vorliegt, sondern dass der bakterielle Erstkontakt zu einer differenzierten und potentiell wertvollen Adaptation des Monozyten führt, welche eher mit dem Terminus „Re-Programmierung“ (13) bezeichnet werden sollte. Auch in dieser Arbeit wird im Folgenden nur mehr von dem „re-programmierten“ Monozyten gesprochen und hierunter der Monozyt nach einem erfolgten Erstkontakt mit Bakterien verstanden.

Phänotypische und funktionelle Differenzierung des inflammatorischen Monozyten

Knochenmarks-ständige Progenitorzellen differenzieren unter dem Einfluss hämatopoetischer Wachstumshormone wie Stammzellofaktor (SCF), IL-3, Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Makrophagen-stimulierender Faktor (M-CSF) von myeloiden Vorstufen zu differenzierten, naiven Monozyten. Es lassen sich CX3CR1^{lo} CCR2⁺ CD62L⁺ inflammatorische Monozyten von gewebeständigen CX3CR1^{hi} CCR2⁻ CD62L⁻ Monozyten unterscheiden, welche einen Pool an differenzierungsfähigen Reservemonozyten darstellen. Im Rahmen der Inflammation differenzieren zunächst IFN- γ induzierbare M1-Makrophagen mit einem IL12^{hi}IL23^{hi}IL10^{lo} Phänotyp, in der anti-inflammatorischen Phase dann IL4 und IL10 induzierbare M2-Makrophagen mit einem IL12^{lo}IL23^{lo}IL10^{hi} Phänotyp (14). Monozyten exprimieren eine Reihe von Phagozytoserezeptoren, welche einerseits selektiv die Phagozytose inflammatorischer oder apoptotischer Zellen bzw. Zellbestandteilen vermitteln können, welche aber andererseits funktionell sehr redundante Aufgabe an der phagozytotischen Synapse wahrnehmen (15). Nach erfolgter Internalisierung inflammatorischer Partikel werden Peptidbestandteile von Monozyten auf Major Histokompatibilität (MHC) Klasse II Molekülen gegenüber T Zellen



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

präsentiert und diese zur Zytokinsekretion, T Helfer Zell Differenzierung und Proliferation angeregt. Durch diese Antigen-Präsentation wird Monozyten-vermittelt die adaptive Immunantwort des menschlichen Organismus gegenüber den Bakterien eingeleitet.

Experimentelle Therapieansätze zur Modulation des CARS

Das Versagen von mehr als 20 klinischen Studien zur Modulation der pro-inflammatorischen Phase einer Sepsis hat ein Umdenken mit sich gebracht. Es wird nun davon ausgegangen, dass die meisten der septisch erkrankten Patienten nicht an der ekzessiven Pro-Inflammation, sondern an der nachfolgenden Immunsuppression versterben. Neuere Ansätze zielen daher daraufhin, die ausgeprägte Apoptoseneigung von Lymphozyten zu blockieren, der negativen Regulation von T Zell ko-stimulierenden Molekülen (z.B. CD80, CD86) auf Monozyten entgegen zu wirken, den Spiegel an anti-inflammatorisch wirksamen Zytokinen (z.B. IL10) zu senken und anergische CD4⁺ T Zellen zu reaktivieren (Übersicht bei (16)). Viele der grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse haben daher direkte Implikationen für die klinische Therapie. Letztlich soll dieses Projekt einen Bestandteil dazu leisten, dass eine „bench-to-bedside“ Translation hin zur Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte stattfinden kann.

Human-murin chimäres NOD SCID γ c^{-/-} Mausmodell

Der 2005 erstmalig beschriebene NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWjl}/Sz (NSG) Mausstamm, welcher aufgrund eines Defektes der gemeinsamen γ Signaltransduktions-Kette keine eigenen T, B und NK Zellen besitzt, eignet sich in besonderer Weise dazu, mit menschlichen hämatopoetischen Stammzellen (SC) transplantiert und „humanisiert“ zu werden (17). Im Folgenden sollen derartig humanisierte NSG Mäuse als huNSG Mäuse bezeichnet werden. Zur Humanisierung werden die Mäuse sublethal bestrahlt und anschliessend intravenös mit menschlichen CD34⁺ Stammzellen (SC) transplantiert. Obwohl nicht formal bewiesen, wird angenommen, dass die sublethale Bestrahlung der Schaffung von Knochenmarksnischen und der Induktion pro-inflammatorischer muriner Zytokine dient, welche kreuzreaktiv auf menschliche Zellen wirken können. Hierdurch lässt sich das Anwachsen der menschlichen SC deutlich verbessern. Differenzierte Analysen zum Engraftment der myeloiden Reihen in derartig humanisierten Mäusen fehlen bislang.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

MATERIAL UND METHODEN

***In vitro* Modell A: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten**

Akquirierung der Spender

Zufällig ausgewählte, gesunde Erwachsene wurden als Spender für periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) ausgewählt. Das Studienprotokoll wurde durch das Ethikkomitee der Universität Tübingen genehmigt. Die PBMCs wurden aus Vollblut mittels einer Ficoll-Paque (Biochrom, Berlin, Germany) Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert.

Puffer und Zellkulturreagenzien

ACK Puffer

150 mM NH₄CL, Endotoxin-frei

10 mM KHCO₃

0,1 mM EDTA

Einstellung des pH Wertes auf 7,3.

FACS Puffer

2 % FCS

2 mM EDTA

0.02 % NaN₃ in PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)

Zellkultur Medium

100 ml RPMI

10 % FCS

2 mM Glutamin

+/- 2ug/ml Gentamycin (je nach Experiment)

Die Kultivierung erfolgte in einer 12 Loch Zellkulturplatte bzw. einer 25 ml Zellkulturflasche (Costar, Bodenheim, Germany) mit einer Zellzahl von 2×10^6 / ml bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Durchflusszytometrische Analyse (FACS Analyse)

Die zur Durchflusszytometrie verwandten Antikörper sind in **Tab. 1** zusammengefasst. Da sich häufig spektrale Überlappungen in den Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome zeigen, wurden zunächst Einzelfärbungen analysiert und die entsprechenden Emissionen kompensiert. Zur Färbung der PBMCs wurden die Zellen einmalig FACS Puffer gewaschen und mit den verdünnten, unten stehenden Antikörpern in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen gegeben. Die Konzentration der einzelnen Antikörper wurden jeweilig titriert, im Allgemeinen waren Verdünnungen von 1:20-1:100 zur Färbung ausreichend. Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden in der gleichen Konzentration wie die spezifischen Antikörper eingesetzt. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Zellen dreimalig mit FACS Puffer gewaschen (jeweils 1600 rpm, 3 Minuten, 4°C) und anschliessend an einem FACSCalibur® Gerät bzw. einem LSR II Gerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, durchgeführt.

Tab. 1. Liste der verwandten humanen Antikörper

Antigen	Fluorophor	Klon	Firma
CD3	PerCP	SK7	BD
CD4	APC	RPA-T4	BD
CD8	APC	PRA-T8	BD
CD11b	FITC	ICRF44	BD
CD14	APC	M5E2	BD
CD14	PE	M5E2	BD
CD15	FITC	HI98	BD
CD16	PE	3G8	BD
CD18	FITC	6.7	BD
CD33	PE	P67.6	BD
CD45	PeCy7	HI30	BD
CD36	PE	CB38	BD
CD64	FITC	10.1	BD
CD80	PE	L307.4	BD
CD86	FITC	2331(FUN.1)	BD
CD206	FITC	19.2	BD
LOX-1	FITC	23C11	Hycult Biotechnology
HLA-DR	PE	L243	BD



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Bakterienkultur

In diesen Versuchsreihen kamen zwei verschiedene *E. coli* Stämme zum Einsatz. Die Vorstimulation der PBMCs am Tag 0 (d0) erfolgte durch Exposition der PBMCs mit *E. coli* K-12 DH5 α Bakterien. Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität an Tag 2 (d2) wurden die PBMCs mit einem pCD353 transformierten *E. coli* DH5 α Stamm versetzt, welcher eine Variante eines prokaryotischen gfp (gfp-mut2) Plasmids unter der Kontrolle eines lac Promotors exprimiert. Einzelkolonien des *E. coli* K-12 DH5 α wurden in Lennox L Nährmedium (Invitrogen, Karlsruhe) bis zur frühen logarithmischen Phase ($OD_{600} = 0.55-0.8$) vermehrt. Zur Induktion der gfp-Expression wurden gfp-*E. coli* K-12 DH5 α Bakterien in einem Medium, welches mit 50 μ g/ml Kanamycin und 1 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) versetzt worden war, kultiviert.

Phagozytose Untersuchungen

PBMCs wurde für 1 Stunde (1 hr) mit *E. coli* K-12 DH5 α , wenn nicht anders angegeben, in einem Verhältnis PBMCs zu Bakterien von 1:10 (MOI = multiplicity of infection) inkubiert. In einzelnen Versuchen wurde, wie dort angegeben, zunächst die Frequenz an CD14⁺ Monozyten errechnet und nachfolgend die Ratio in Bezug auf Monozyten:Bakterien errechnet. Nach Bakterienexposition wurden die PBMCs gewaschen und über ein FCS Kissen zentrifugiert, um anschliessend in RPMI Medium mit 10% FCS und Gentamycin (2 μ g/ml) für 2 Tage kultiviert zu werden. Am d2 wurden die Zellen gewaschen und in einem Medium mit FCS aber ohne zusätzliche Antibiotika resuspendiert. Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurden die Zellen mit gfp-*E. coli* mit einer MOI von 1:50 für 1 hr kultiviert. Anschliessend wurden die Zellen gewaschen, über ein FCS Kissen zentrifugiert und für die nachfolgende FACS Analyse gefärbt (siehe unten). Die phagozytotische Aktivität wurde bestimmt, in dem das Verhältnis gfp⁺ CD14⁺ Monozyten zu der Gesamtzahl an CD14⁺ Monozyten errechnet und in % ausgedrückt wurde. Bei der Phagozytose apoptotischer Zellen (siehe unten) wurde das Verhältnis PKH26⁺ CD14⁺ Monozyten in Bezug auf die Gesamtmonozytenzahl errechnet und in % ausgedrückt.

Hitzedenaturierung der Bakterien: In einzelnen Experimenten wurden hitze-denaturierte Bakterien verwendet, welche für 2 Stunden bei 50°C inaktiviert worden waren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Experimente mit Zellkulturüberständen: Die Überstände von d2 vorstimulierten PBMCs wurden bei -20° eingefroren. Zum Zeitpunkt des Experimentes wurden frisch isolierte, autologe PBMCs gewonnen und für 2 Tage in Anwesenheit variabler Konzentrationen der oben gewonnenen Überstände kultiviert, bevor sie 2 Tage später mit *gfp-E. coli* versetzt wurden (MOI 1:50). In einzelnen Experimenten wurden PBMCs in Gegenwart von Überständen (Verhältnis Überstand zu frischem Medium 1:1) entweder zusammen mit IL1 α (Kineret®, 10 μ g/ml, Amgen, München) oder funktionell aufgereinigtem Anti-IL10 Antikörper (2.5 μ g/ml, Klon JES3-9D7, eBioscience, Frankfurt) kultiviert. Am d2 wurde das Medium gewechselt und ein Phagozytoseassay - wie oben beschrieben - in frischem, FCS-haltigen Medium durchgeführt.

Kokulturen mit apoptotischen PBMCs: Zur Induktion einer Apoptose wurden PBMCs mit 10mJ/cm² UV-C bestrahlt (d-1), anschliessend kultiviert und 24 Std. später der Gehalt apoptotischer Zellen mittels Annexin V Färbung bestimmt. Der Gehalt Annexin⁺ PI⁻ Zellen lag hierbei um 70%. An d0 wurden frische autologe PBMCs gewonnen und mit apoptotischen PBMCs in den angegebenen Zellzahlen für 2 weitere Tage ko-kultiviert. Am d2 wurde die Phagozytoseaktivität dieser Kokulturen und unstimulierter Kontroll-PBMC Kulturen bestimmt.

FCS Modifikationen: Bei diesen Experimenten erfolgte die Bestimmung der Phagozytoserate an d2 in RPMI Medien, welche entweder kein FCS, 10% Hitze-inaktiviertes FCS oder IgG-depletiertes FCS enthielten. Zur Hitze-Inaktivierung wurde das FCS für 20 Minuten auf 56°C erhitzt. Die IgG-Depletion wurde mittels einer Protein G Sepharose Säule (GE Healthcare, Freiburg, Germany) durchgeführt. Das Entfernen des IgG wurde mittels SDS-PAGE Analyse und Coomassie Färbung bestätigt. Die IgG Depletion wurde durch Frau MTA Hildegard Keppeler, Abt. Innere Medizin I, Universität Tübingen, durchgeführt.

Zytokin Supplementation: PBMC Kulturen wurden mit 100 ng/ml rekombinantem hIL10 bzw. 100 ng/ml rekombinantem hIL1 α (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) an d0 und d1 versetzt. An d2 wurden die Zellen in RPMI Medium mit 10% FCS resuspendiert und die Bestimmung der Phagozytoseaktivität durchgeführt.

Scavenger Rezeptor blockierende Experimente: Vorstimulierte oder nicht stimulierte Kontroll-PBMC Kulturen wurden in FCS-freiem RPMI Medium an d2 resuspendiert. Unmittelbar anschliessend wurden oxidierte niedrig-molekulare Lipoprotein Partikel (oxLDL) (Kalen Biomedicals, Montgomery Village, MD, USA) in einer Konzentration von 100 μ g/ml hinzugefügt. 30 Minuten später wurden *gfp-E. coli* mit einer MOI von 1:50 hinzugefügt, um die Phagozytosefähigkeit zu bestimmen.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Stimulation des Toll-like Receptor 4 (TLR4)

In bestimmten Experimenten wurden PBMCs an d0 mit 100ng/ml LPS (*E. coli* 055:B5, L6529, Sigma Aldrich) für 1 Std. vorstimuliert, anschliessend gewaschen und nachfolgend in RPMI Medium mit 10% FCS kultiviert. An d2 wurden derartig vor-stimulierte bzw. nicht stimulierte Kontroll-PBMC Kulturen mit *gfp*-*E. coli* (MOI 1:50), wie oben beschrieben, kultiviert und nach 1 hr die Phagozytoseaktivität durchflusszytometrisch bestimmt.

Phagozytose von apoptotischen Zellen

Allogene neutrophile Granulozyten bzw. Jurkat Zellen (immortalisierte T Zell leukämische Zelllinie) wurden mit PKH26 (Sigma Aldrich) gefärbt und nachfolgend zur Induktion einer Apoptose mit 10 mJ/cm² UV-C bestrahlt. Diese Markierung und Bestrahlung erfolgte durch Frau MTA H. Keppeler bzw. Dr. K. Lauber, Innere Medizin I, Universität Tübingen. Die Phagozytose derartiger apoptotischer Zellen wurde nach 24 (Granulozyten) bzw. nach 4 h (Jurkat Zellen) durchgeführt. Vor-stimulierte und unstimulierte Kontroll-PBMC Kulturen wurden an d2 gewaschen und in Serum-freiem RPMI Medium resuspendiert. Anschliessend erfolgte die Ko-Kultur mit PKH26-markierten apoptotischen Zellen mit einem Monozyten:Zielzell Verhältnis von 1:10. 1 hr später wurden die Zellen gewaschen und zur durchflusszytometrischen Messung gefärbt.

Zytokin "Capture Assay" und Bestimmung der T Zell Proliferation

Die Stimulation der PBMCs mit *E. coli* Bakterien an d0 (MOI 1:10) und d2 (MOI 1:50) erfolgte wie oben beschrieben. An d2 wurde der % Satz an CD14⁺ Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Nach erneuter Isolation autologer PBMCs an d2 wurden aus dieser Zellpopulation die CD14⁺ Monozyten mittels magnetischer Zellseparation (s.u.) mit CD14 Microbeads (Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach) entfernt und der Gehalt an T Zellen im Eluat quantifiziert. Diese CD14⁻-PBMCs wurden dann zu vorstimulierten bzw. nicht stimulierten Kontroll-PBMC Kulturen hinzugefügt (Verhältnis CD14 : CD3 Zellen 1:10). 18 bzw. 40 h später wurden die Überstände dieser Ko-Kulturen gesammelt und für die spätere Bestimmung der Zytokinkonzentrationen bei -80° eingefroren. Die Bestimmung der Zytokin Konzentrationen erfolgte mittels des humanen T_H1/T_H2/T_H17 CBA Kits (BD Biosciences)



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

nach Angaben des Herstellers. Diese Untersuchungen wurden durch Dr. K. Lauber, Innere Medizin I, Universität Tübingen, durchgeführt.

Zur Bestimmung der T Zell Proliferation wurden CD14⁻-PBMCs mit 5-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (2 μ M CFSE) (Molecular Probes, OR, USA) nach Angaben des Herstellers markiert und nachfolgend zu autologen vorstimulierten bzw. nicht stimulierten Kontroll-PBMC Kulturen (CD14 : CD3 Verhältnis von 1:10) hinzugegeben. 5d später wurden die Zellen mit Anti-CD3 gegengefärbt und die Proliferation der T Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Analyse der T Zell Proliferation erfolgte mittels des Histogrammbildes, indem die Fläche unter der Kurve mit reduzierter CFSE-Fluoreszenz (M1) als Tochtergenerationen gewertet wurde.

Charakterisierung des monozytären Zytokin Profils

Die Stimulation der PBMCs mit *E. coli* Bakterien an d0 (MOI 1:10) und d2 (MOI 1:50) erfolgte wie oben beschrieben. Unmittelbar nach der Stimulation an d2 wurden die CD14⁺ Monozyten mittels magnetischer Zellseparation anhand des humanen "Monocyte isolation kit II" (Miltenyi Biotec) isoliert und nachfolgend in einem Gentamycin-haltigen Medium für 24 h kultiviert. Die Überstände dieser isolierten Monozyten wurden dann bei -80° für spätere Analysen eingefroren. Als Kontrolle wurden prototypische M1 und M2 Makrophagen generiert (14). Hierzu wurden isolierte Monozyten für 7 Tage in Anwesenheit von 1000 U/mL GM-CSF (M1) oder 10 ng/mL M-CSF (M2) (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) bzw. ohne den Zusatz von exogenen Zytokinen (M0) kultiviert. Die Zytokine wurden jeden 2. Tag hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Am 7. Tag wurden die Zellen einmal gewaschen und mit frischem Medium versehen, 24 Std. später wurden die Überstände dieser Kulturen gewonnen und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurde eine FACS-basierte Untersuchung mittels des CBA-Flex Sets (BD Biosciences) durch Fr. Dr. K. Lauber, Innere Medizin, durchgeführt. Mittels einer 4 Parameter „fitting curve“ wurden hierbei die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) in korrespondierende Konzentrationswerte umgerechnet. Zur Bestimmung des Oberflächen Phänotyps wurden die M1 und M2 Makrophagen mit den angegebenen Antikörper gefärbt und die Rezeptorexpression durchflusszytometrisch quantifiziert.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Multiplex bead assay

Hierbei wurden d0 vor-stimulierte und Kontroll-PBMC Kulturen für 2 Tage in einem RPMI Medium mit 10% FCS und Gentamycin kultiviert. An Tag 2 wurden die Zellen in frischem RPMI Medium mit 10% FCS resuspendiert und für 1 hr mit gfp-*E. coli* kultiviert (MOI 1:50). Unmittelbar nach der Phagozytose wurden die Überstände bei -80°C bis zum späteren Gebrauch eingefroren. Die Multiplex Bead-basierten Untersuchungen wurden durch Dr. H.-Y. Hsu, NMI Reutlingen, an einem Luminex100[®] Analyzer (Luminex Corp., TX, USA) durchgeführt (18, 19). Hierbei wurde eine 5 Parameter "fitting curve" genutzt, um MFIs in Konzentrationen umzurechnen.

Monozytenaufreinigung und Durchführung der quantitativen RT-PCR

d0 vor-stimulierte und Kontroll-PBMC Kulturen wurden an d2 für 1 Stunde mit *E. coli* Bakterien (MOI 1:50) ko-inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und die CD14⁺ Monozyten mittels des „Monocyte isolation kit II“ (Miltenyi Biotec) aufgereinigt. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug > 92%. Unmittelbar nach der Aufreinigung wurden die Zellen bei -80° C zum späteren Gebrauch eingefroren. Zur Durchführung der quantitativen real-time (RT) PCR wurde die Gesamt RNA extrahiert und cDNA, wie zuvor beschrieben, synthetisiert (20). 100 ng dieser cDNA wurde zur nachfolgenden RT-PCR Analyse mittels eine ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) und dem qPCR Mastermix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgium) (20 µl Endvolumen) mit 300 nM Exon-Exon umspannenden Primern eingesetzt. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels der Standard Kurven Methode. Die Resultate wurden anschliessend auf 18S rRNA Konzentrationen normalisiert. Der Mittelwert von unbehandelten Kontrollproben wurde als Kalibrator eingesetzt. Die RT-PCR Messungen wurden durch Frau MTA Hildegard Keppeler, Abt. Innere Medizin I, Universität Tübingen, durchgeführt.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

In vivo Modell B: Stammzelltransplantation von NSG Mäusen zur Generierung „humaner“ Surrogatmonozyten

Personelle Voraussetzungen zur Durchführung der Tierexperimente

Die personellen Voraussetzungen zur Durchführung der Tierexperimente waren insofern gegeben, als die Verfasserin dieser Doktorarbeit die Berechtigung zur Leitung von Tierversuchen besitzt. Ein entsprechender Tierschutzantrag wurde unter der Verwaltungsnummer K2/07 durch das Regierungspräsidium Tübingen bewilligt.

Mäuse

NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWjl}/Sz Mäuse (auch NOD/SCID/IL2Rγ^{null} genannt, im Folgenden als NSG Mäuse bezeichnet) wurden bei „The Jackson Laboratory“, USA, bestellt und selber gezüchtet. Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen in dem Tierstall der Universitätskinderklinik Tübingen. Ein Teil der Tierexperimente wurde durch die MTA Frau Barbara Goecke durchgeführt.

Mobilisation, Gewinnung und Isolation peripherer Stammzellen

Mobilisierte, periphere Blutstammzellen (mPBSCs) wurden von Eltern gewonnen, welche für ihr an Leukämie erkranktes Kind Stammzellen spendeten. 5 Tage vor der Gewinnung des Leukapherisats wurde dem spendenden Elternteil 10 µg/kg/d G-CSF (Neupogen®; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) subkutan verabreicht und das Leukapherisat an d5 und d6 nach Beginn dieser Stammzellmobilisation gewonnen. Ein entsprechendes Ethikvotum zur Verwendung eines kleinen Teils der Stammzellen (<5%) wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen bewilligt und lag ebenso wie die schriftliche Einwilligung der Eltern vor. CD34⁺ Stammzellen wurden durch magnetische Zellseparation unter Verwendung von CD34 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Die Aufreinigung der mPBSCs erfolgte durch Mitarbeiter des KMT Labors der Universitätskinderklinik Tübingen unter GMP-Bedingungen. Die Reinheit der Zellfraktion wurde durchflusszytometrisch validiert und betrug > 92%. Insbesondere war der



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

kontaminierende CD3⁺ T Zell Gehalt $< 0.14 \pm 0.1\%$, so dass das Auftreten einer Graft versus Host Reaktion ausgeschlossen werden konnte.

Humanisierung der NSG Mäuse (huNSG Mäuse)

Zur Humanisierung der Mäuse wurden 8-12 Wochen alte NSG Mäuse sublethal mittels eines ¹³⁷Cs Bestrahlungsgeräts (Gammacell[®] 1000 Elite, MDS Nordion, Fleurus, Belgium) bestrahlt. Hierbei wurde für weibliche Rezipienten eine Dosis von 200 cGy, für männliche Rezipienten eine Dosis von 250 cGy gewählt. 4 hr später wurden 1×10^6 Stammzellen intravenös in eine Schwanzvene der bestrahlten Mäuse injiziert. Derartig rekonstituierte Mäuse wurden wöchentlich mit einer intravenösen Gabe von 20 µg Fc-IL7 Fusionsprotein behandelt, welches uns durch die Firma Merck KGaA (Darmstadt, Germany) zur Verfügung gestellt worden war. Sämtliche transplantierten Tiere erhielten zur Prophylaxe von Infektionen mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol (CotrimK[®], Ratiopharm, Ulm, Germany) angereichertes Trinkwasser und wurden unter keimfreien Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen (IVCs) gehalten.

Retrobulbäre Blutentnahme und Präparation der Lymphozyten

Zur repetitiven Entnahme peripheren Blutes wurde den Mäusen nach einer kurzen Kohlendioxidnarkose retrobulbär 0,2 ml Blut entnommen und unmittelbar in ein Heparin beschichtetes Röhrchen geleitet, welches nach kurzem Schütteln sofort auf Eis gelagert wurde. Das Vollblut wurde zur Erythrozytolyse in Polystyren-Röhrchen überführt, mit 5 ml ACK (Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Lösung) (s.o.) versetzt und bei Raumtemperatur 7 Minuten gelagert. Hiernach wurde das Polystyren-Röhrchen mit PBS aufgefüllt und zweimalig gewaschen. Die so gewonnenen peripheren Blutzellen wurden auf 96 well U-Boden Platten transferiert und zur anschließenden FACS-Analyse gefärbt.

Engraftment Analysen in huNSG Mäusen

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde peripheres Blut, Milz und Knochenmark entnommen und mittels der oben genannten Anti-humanen Antikörper bzw. den passenden



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Isotypen gefärbt. Nach Darstellung des forward (FSC) und side scatter (SSC) Bildes wurde die PBMC Population dargestellt und nachfolgend die Menge an humanen CD45⁺ Zellen bestimmt. In diesem CD45⁺ Gate wurde dann die Frequenz an humanen CD14⁺ Monozyten errechnet und die respektive Rezeptorexpression bestimmter Oberflächenmoleküle dargestellt. In einzelnen Experimenten wurden die Knochenmarkszellen mit rekombinantem humanen Interferon-gamma (IFN- γ , 500 IE/ml) (R&D Systems, Minneapolis, USA) für 24 hr vor-inkubiert, um die Expression von ko-stimulierenden Molekülen zu induzieren. Dieser Teil der Experimente wurde durch Dr. Chr. Gille, Abt. Neonatologie, Universitätskinderklinik Tübingen, durchgeführt.

Untersuchungen zur T Zell Proliferation in huNSG Mäusen

Isolierte Milzzellen von huNSG Mäusen wurde zusammen mit humanen PBMC Kontrollproben mit 5-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) (Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) nach Angaben des Herstellers gefärbt (Konzentration CFSE 2 μ M). Die Zellsuspensionen wurden nachfolgend in 24-well Platten mit einer Zellkonzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI Medium mit 10% FCS kultiviert. Zur Induktion der T Zell Proliferation wurde der Anti-CD3 Antikörper OKT3 (Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, USA) in einer finalen Konzentration von 5 μ g/ml zu den Zellsuspensionen hinzugefügt. Hierbei dienen CFSE gefärbte, unstimulierte PBMC Kulturen als interne Kontrollproben. 96 hr später wurden die Zellen mit Anti-humanen CD4 und CD8 Antikörpern (siehe oben) gefärbt und das Ausmass der T Zell Blastenformation durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Quantifizierung der Blastenformation wurde zunächst auf unstimulierte CD3⁺ T Zellen gated (R1) und ein zweites Gate auf die entstehenden, grösseren und etwas granuläreren T Zell Blasten gelegt (R2). Dieser Teil der Analysen wurden durch Dr. Chr. Gille, Universitätskinderklinik, Abteilung Neonatologie, durchgeführt. Der Prozentsatz der Blastenformation wurde folgendermassen errechnet: $100/(R1+R2)*R2$. Die Analyse der T Zell Proliferation erfolgte, wie oben beschrieben, in einem Histogramm Bild. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von OKT3 stimulierten Proben ("mit OKT3"), welche auf die unstimulierten Kontrollproben normalisiert wurden ("ohne OKT3").



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Phagozytose Untersuchungen in huNSG Mäusen

Die Untersuchungen zur Phagozytosefähigkeit erfolgten analog den oben beschriebenen Versuchen mit humanen PBMC Kulturen durch Exposition der Zellen gegenüber gfp-*E. coli* Bakterien.

***In vivo* Gabe von *E. coli* LPS**

Zur *in vivo* Quantifizierung der pro-inflammatorischen Zytokinsynthese wurden in der 12. Woche nach Transplantation huNSG Mäuse mit LPS (*E. coli* 055:B5, L6529, Sigma Aldrich) intraperitoneal injiziert (10ug pro Maus). Vor Injektion und 4 hr nach Injektion wurde Serum gewonnen und bei -80° für die spätere Analyse asserviert. Zusätzlich hierzu wurden isolierte, humane CD14⁺ Monozyten *in vitro* mit LPS für 16 hr stimuliert (100ng/ml) und die Überstände nachfolgend asserviert. Die Messungen wurden mittels eines Bioplex Suspensions Array Systems mit einer fünf-parametrischen Kurve durchgeführt, anhand derer die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) in Konzentrationswerte umgerechnet wurden. Die Messungen wurden durch cand. med. Andreas Wirth, Universitätskinderklinik Tübingen, und Dipl. biochem. Aylene Wilhelm, Universitätskinderklinik Tübingen, durchgeführt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur *in vitro* Detektierung der intrazellulären TNF Synthese in adult transplantierten huNSG-Monozyten wurden Knochenmarkszellen für 6 hr in der Gegenwart entweder von LPS (1ug/ml) oder PBS und von Golgi Plug[®] (BD Biosciences) gemäss den Angaben des Herstellers kultiviert. Anschliessend wurden die Zellen für 20 Minuten mit CD14-FITC (Biolegend) und CD45-PeCy7 (BD) Antikörpern gefärbt, permeabilisiert (Fix & Perm[®] Kit, ADG Bio Research GmbH, Hamburg) und nachfolgend für 45 Minuten mit PE-anti TNF Antikörper (R&D, clone # 6402) gegengefärbt und anschliessend durchflusszytometrisch analysiert. Diese Analysen wurden durch Dipl. biochem. Aylene Wilhelm, Universitätskinderklinik Tübingen, durchgeführt.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Statistische Auswertung

Die statistische Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Hierbei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test, welcher die Übereinstimmung zweier Verteilungen, welche zur derselben Grundgesamtheit gehören, überprüft. Sofern nicht anders angegeben, wurde Mittelwerte \pm Standard Abweichungen dargestellt. P Werte ≤ 0.05 (adjustiert nach Bonferroni-Holm für Multiple Gruppen Vergleiche) wurden als statistisch signifikant bezeichnet.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

ERGEBNISSE

Ergebnisse „*In vitro* Modell A“: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten

Der Erstkontakt mit *E. coli* Bakterien reduziert die nachfolgende Phagozytoseleistung von kultivierten Monozyten.

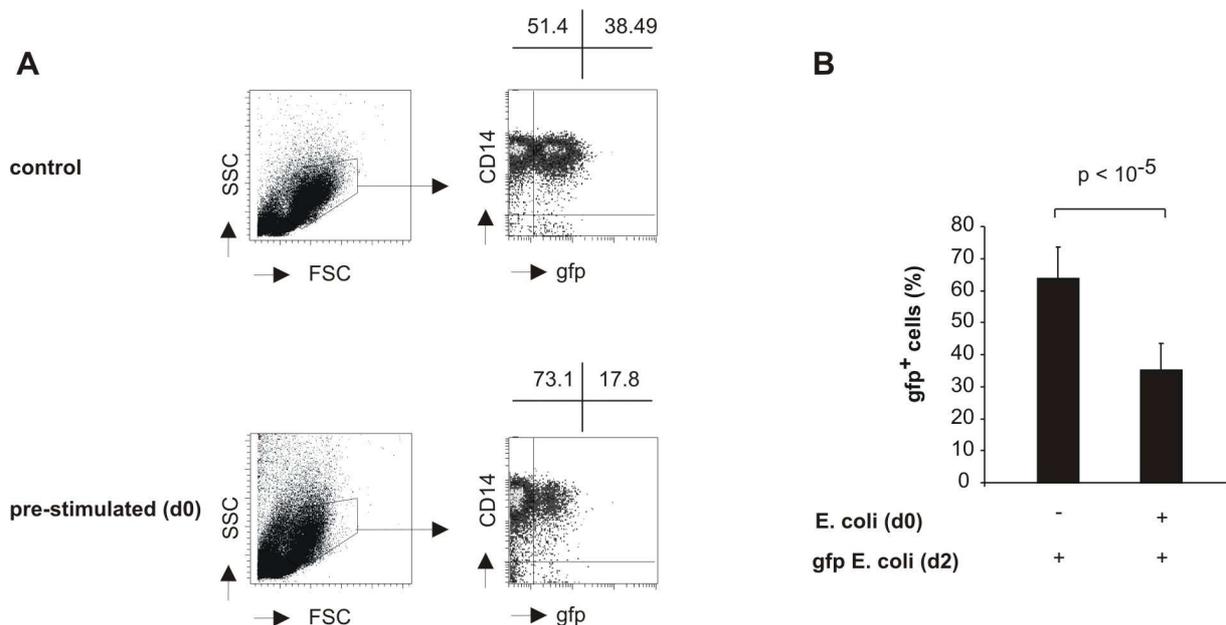


Abbildung 1: Re-programmierte Monozyten aus PBMC Kulturen zeigen eine stark verminderte Phagozytoseaktivität bei erneuter bakterieller Exposition an Tag 2. Re-programmierte Monozyten wurden in einem Gentamycin-haltigen Medium bis zum d2 kultiviert und anschliessend mit gfp-*E. coli* Bakterien ko-inkubiert. (A) Dargestellt ist das charakteristische durchflusszytometrische Scatterbild von vorstimulierten und Kontrollmonozyten an d2 nach Phagozytose von gfp-*E. coli*. Der % Satz im rechten oberen Quadranten entspricht den phagozytierenden Monozyten. (B) Mittelwert und Standardabweichung der Phagozytoseaktivität von 3 gepoolten Experimenten mit insgesamt 9 Spendern.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Um der Frage nachzugehen, welche phänotypischen und funktionellen Änderungen Monozyten nach einem bakteriellen Erstkontakt erfahren, wurden periphere mononukleäre Zellen gesunder Spender isoliert und mit einer niedrigen Dosis an *E. coli* Bakterien (Verhältnis PBMCs zu Bakterien = multiplicity of infection (MOI) 1:10) an Tag 0 (d0) in FCS-haltigem RPMI Medium inkubiert. 1hr später wurden die Bakterien durch Zentrifugation über ein FCS Kissen entfernt und die PBMC Kulturen nachfolgend in einem Gentamycin-haltigen Medium zusammen mit unstimulierten Kontroll-PBMCs kultiviert. Am Tag 2 (d2) wurde die Phagozytoseleistung der Monozyten in vorstimulierten und Kontroll-PBMC Kulturen durch Exposition der PBMCs mit lebenden gfp-exprimierenden *E. coli* Bakterien bestimmt (MOI 1:50). Interessanterweise konnten wir hierbei beobachten, dass die bakterielle Vorstimulation von PBMCs die nachfolgende Phagozytoseleistung von Monozyten deutlich hemmt (Abbildung 1). Im Gegensatz hierzu war die Phagozytoseleistung von an d0 isolierten, bakteriell vorstimulierten Monozyten an d2 unverändert (Abbildung 2).

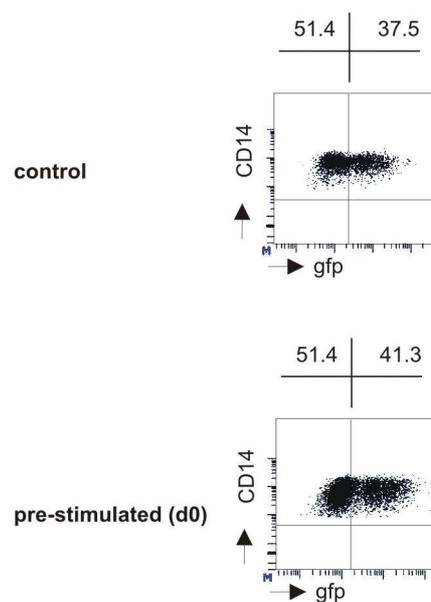


Abbildung 2: Isolierte und nachfolgend re-programmierte Monozyten weisen keine Einschränkung ihrer Phagozytosefähigkeit an d2 auf. CD14⁺ Monozyten wurden an d0 durch magnetische Zellseparation isoliert und anschliessend re-programmiert. An d2 wurde die Phagozytoseaktivität nach Koinkubation mit gfp-*E. coli* Bakterien quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives, originales Scatterbild eines Experimentes mit 3 gesunden Spendern.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Die Vorinkubation von PBMCs mit Cytochalasin D konnte hierbei die Zahl der gfp^+ Monozyten deutlich reduzieren (Daten nicht dargestellt). Dieser Befund legt nahe, dass die gfp -*E. coli* Bakterien durch einen Prozess, welcher eine Aktin-Polymerisation erfordert, aktiv phagozytiert wurden und nicht nur passiv an der Zellmembran adhärirten.

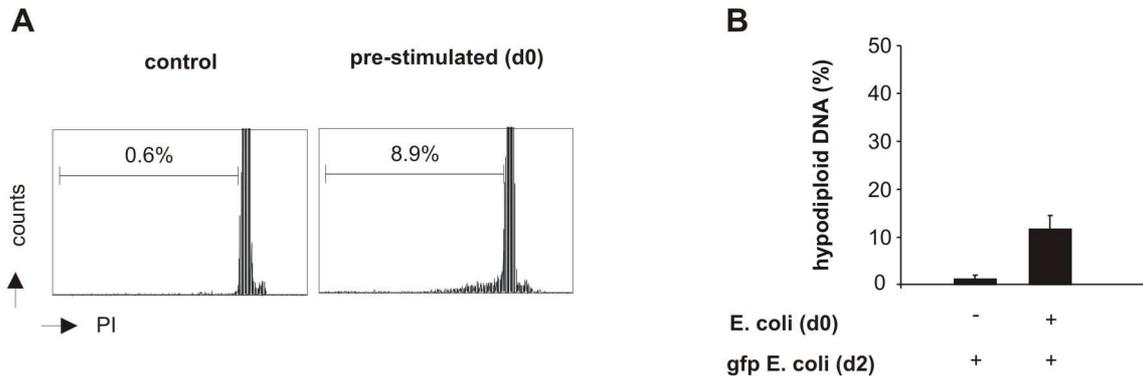


Abbildung 3: Ein gewisser Teil der PBMCs wird im Rahmen des Prozesses der Re-Programmierung apoptotisch. PBMCs wurden, wie oben beschrieben, re-programmiert und der % Satz an apoptotischen Zellen nach 24 hr mittels einer Nicoletti Färbung bestimmt. (A) Originales Histogramm. Angegeben ist der % Satz PI⁺ Zellen als ein Mass für Frequenz apoptotischer Zellen. (B) Angegeben ist der % Satz hypodiploider DNA im PBMC Gate von 2 gepoolten Experimenten mit insgesamt 4 Spendern.

Im Rahmen dieser bakteriellen Vorstimulation wurde, wie durch unsere Arbeitsgruppe vorbeschrieben (21), ein kleiner Anteil der in dem PBMC Gate gelegenen Zellen apoptotisch (Mittelwert vorstimulierte Annexin⁺ PBMCs: 11.4 ± 2.1 , Kontrollmonozyten: $0.45 \pm 0.14\%$) (Abbildung 3).

Mittels kinetischer Experimente konnten wir ausschliessen, dass ein rascherer intrazellulärer Verdau in bakteriell vorstimulierten Monozyten dafür verantwortlich war, dass ein relativ niedrigeres gfp Signal detektiert werden konnte (Abbildung 4).



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

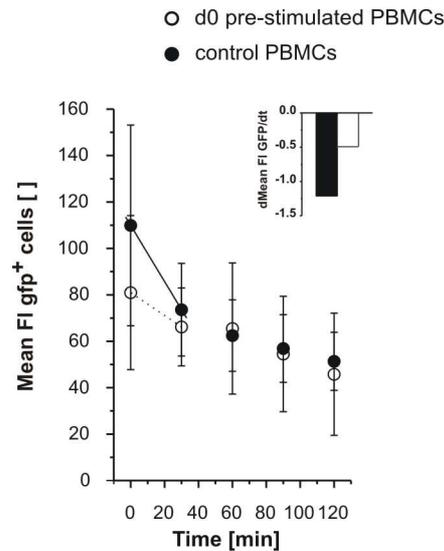


Abbildung 4: Das reduzierte gfp Signal in re-programmierten Monozyten wird nicht durch einen schnelleren intrazellulären Verdau der Bakterien in dieser Zellpopulation verursacht. Re-programmierte und Kontrollmonozyten wurden an d2 mit gfp-*E. coli* koinkubiert und ein Aliquot zu den angegebenen Zeitpunkten zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität entnommen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der gfp/CD14⁺ Zellen von allen CD14⁺ Zellen. Das Piktogramm zeigt die Rate des intrazellulären Bakterienverdaus als lineare Kurve der initialen Degradationsphase. Das Experiment stellt gepoolte Daten von 3 Experimenten mit insgesamt 7 Spendern dar.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass ein Erstkontakt mit lebenden *E. coli* Bakterien die nachfolgende Phagozytosekompetenz von Monozyten in PBMC Kulturen, nicht aber in Kulturen an d0 isolierter Monozyten, hemmt. Da das oben beschriebene Modell die Interaktion verschiedener Zellarten unter dem Einfluss Zelltyp-spezifischer Zytokine ermöglicht, wurde ein Grossteil der nachfolgenden Experimente mit PBMC Suspensionskulturen durchgeführt.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Die Inhibition der Phagozytoseleistung setzt die Exposition gegenüber intakten Bakterien voraus und lässt sich nicht durch die Zugabe autologer apoptotischer PBMCs, LPS Vorbehandlung oder durch Exposition gegenüber isolierten Zytokinen hervorrufen.

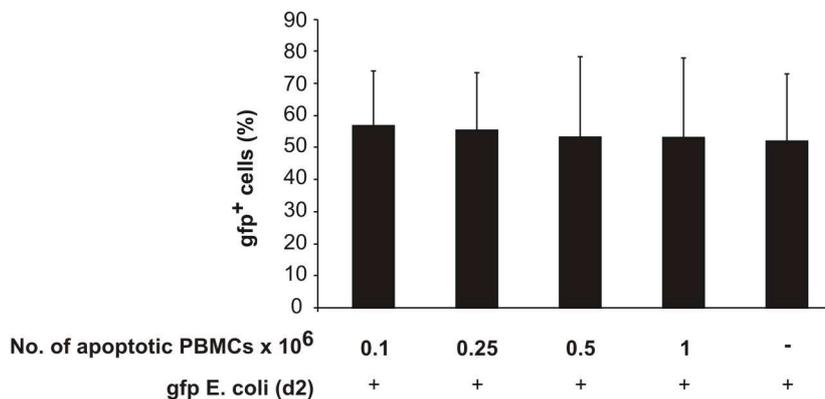


Abbildung 5: Die reduzierte Phagozytoseleistung re-programmierter Monozyten wird nicht durch die alleinige Gegenwart apoptotischer Zellen ausgelöst. PBMCs wurden durch radioaktive Bestrahlung, wie in Material und Methoden beschrieben, apoptotisch gemacht (d-1). An d0 wurden frische PBMCs der gleichen Spender isoliert und mit den autologen, apoptotischen PBMCs in den angegebenen Verhältnissen ko-inkubiert. An d2 erfolgte die Bestimmung der Phagozytoseaktivität durch Koinkubation mit *gfp-E.coli* Bakterien. Daten stellen 2 gepoolte Experimente mit insgesamt 4 Spendern dar.

Da in der Literatur beschrieben ist, dass die Gegenwart apoptotischer Zellen funktionelle Veränderungen von Immunzellen, insb. von T Zellen, im Sinne einer reduzierten proliferativen Kapazität und eines modulierten Zytokinmilieus hervorrufen kann (6), (22) und wir eine kleine, aber konstant nachweisbare Zahl an apoptotischen Zellen in unseren PBMC Suspensionskulturen nachweisen konnten, untersuchten wir als nächstes, welchen Einfluss die Gegenwart apoptotischer Zellen auf die Phagozytoseleistung von Monozyten hat. Interessanterweise konnten wir hierbei sehen, dass die Gegenwart autologer apoptotischer Zellen in PBMC Kulturen die Phagozytoseleistung von Monozyten nicht beeinflusst und daher kein adäquates Erklärungsmodell für die von uns beobachtete reduzierte Phagozytoseleistung re-programmierter Monozyten darstellen kann (Abbildung 5).



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

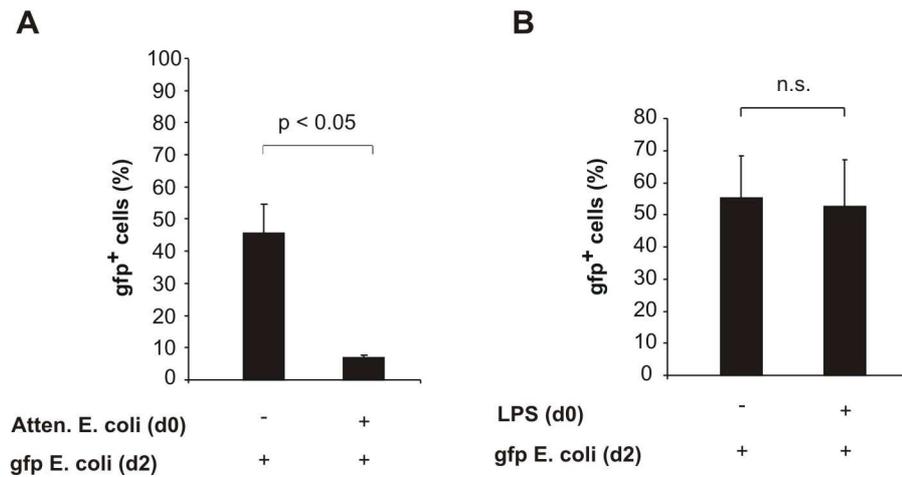


Abbildung 6: Abgetötete *E. coli* Bakterien können die oben beschriebene Phagozytosehemmung induzieren, während die alleinige Stimulation des Toll-like receptor 4 (TLR4) hierfür nicht ausreicht. (A) *E. coli* Bakterien wurden an d0 durch Hitze inaktiviert und nachfolgend die Re-Programmierung von PBMCs mit diesen Bakterien durchgeführt. An d2 wurde, wie oben beschrieben, die Phagozytoseaktivität bestimmt. (B) PBMCs wurden an d0 in LPS-haltigem Medium kultiviert und die Phagozytoseaktivität an d2 bestimmt. Daten aus A stellen gepoolte Daten von 2 Experimenten mit 6 Spendern, Daten aus B stellen Daten von einem Experiment mit 3 Spendern dar. n.s. = nicht signifikant.

Um die Voraussetzungen für eine Hemmung der Phagozytosekapazität weiter einzugrenzen, wurde nachfolgend die Phagozytoseleistung von Monozyten in PBMC Kulturen getestet, welche zuvor mit Hitze-inaktivierten *E. coli* Bakterien re-programmiert worden waren. Die Hemmung der Phagozytoseleistung war hierbei vergleichbar zu Monozyten, welche mit lebenden Bakterien vorstimuliert worden waren. Wir schliessen daraus, dass offensichtlich die direkte und gegenseitige Interaktion des Monozyten mit einem lebenden Bakterium keine notwendige Voraussetzung zur nachfolgenden Inhibierung der Phagozytoseleistung darstellt (Abbildung 6A). Um auszuschliessen, dass die alleinige Stimulation des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) ausreichend sein würde, um nachfolgend die Phagozytose zu hemmen, wurden PBMC Kulturen mit LPS vorstimuliert und die Phagozytoseleistung an d2 bestimmt. Diese zeigte sich auch nach Vorstimulation mit LPS völlig unverändert (Abbildung 6B), so dass wir darauf schliessen konnten, dass viel komplexere Prozesse als eine alleinige Triggerung des TLR4 für die Phagozytosehemmung verantwortlich sein mussten.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

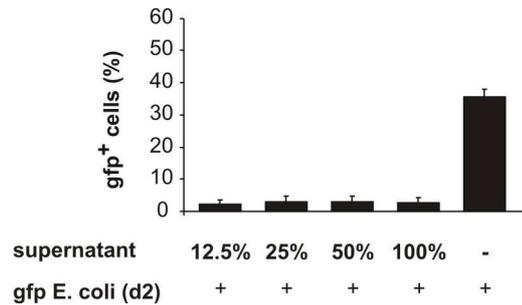


Abbildung 7: Die Kokultivierung in Gegenwart von Überständen re-programmierter Monozyten kann eine Phagozytosehemmung induzieren. Die Überstände re-programmierter Monozyten wurden in den angegebenen Verhältnissen zum Medium von frisch isolierten PBMCs des gleichen Spenders gegeben (d0). An d2 erfolgte die Quantifizierung der Phagozytoseleistung. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von 3 gesunden Spendern, welche in einem Experiment untersucht wurden.

Da wir annahmen, dass das existierende Zytokinmilieu einen massgeblichen Einfluss auf die Phagozytoseleistung von Monozyten haben sollte, führten wir nachfolgend Phagozytoseexperimente in Gegenwart von Überständen durch, welche nach bakterieller Vorstimulation autologer PBMCs gewonnen und für den späteren Gebrauch eingefroren worden waren. In der Tat zeigte sich hier, dass die Gegenwart auch geringer Mengen an Überständen eine deutliche Hemmung der Phagozytoseleistung bewirkten (Abbildung 7).

Wir analysierten daher das Zytokin Profil von bakteriell vorstimulierten Monozyten mittels eines Multiplex Bead Assays und konnten hohe Konzentrationen diverser inflammatorisch wirksamer Zytokine nachweisen (Abbildung 8). Hierbei waren IL10, IL1 α und in einem geringeren Ausmass auch tumor necrosis factor (TNF) die Zytokine, welche in den höchsten Konzentrationen nachweisbar waren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

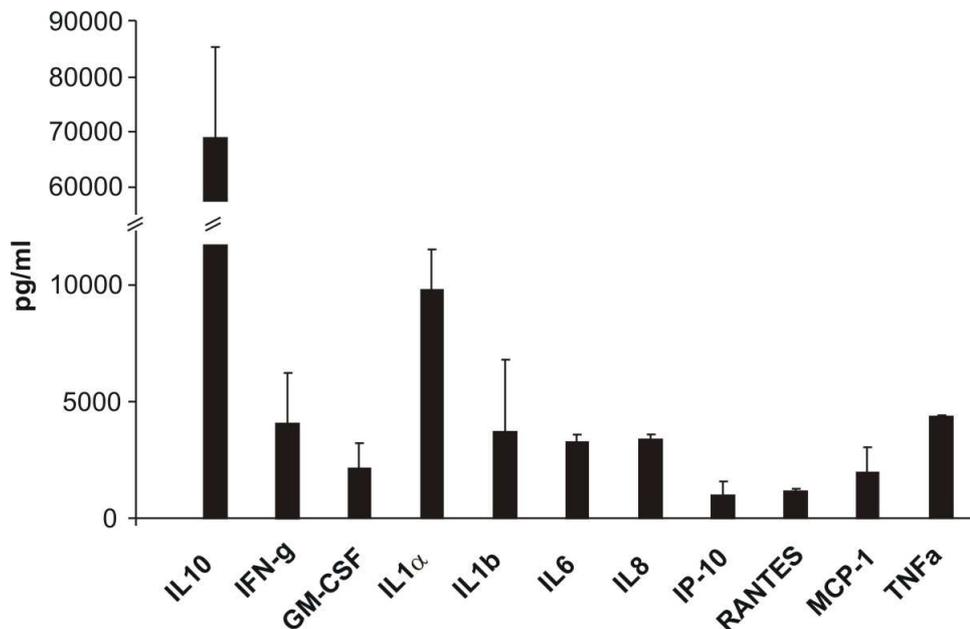


Abbildung 8: Re-programmierte PBMCs sezernieren grosse Mengen an IL10, IL1 α und TNF. Unmittelbar nach Phagozytose an d2 wurden die Überstände re-programmierter Monozyten gewonnen und mittels einer Multiplex Bead Assays analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Spendern, welche in einem Experiment untersucht wurden.

Um zu ermitteln, ob die Gegenwart eines Einzelnen dieser Zytokine zur Phagozytoseinhibition ausreichen würde, wurden PBMCs in Gegenwart von IL10, IL1 α , TNF oder der Kombination von IL10 und IL1 α kultiviert (Abbildung 9). Die Exposition gegenüber einzelnen Zytokinen induzierte hierbei keine Phagozytosehemmung, lediglich die kombinierte Exposition gegenüber IL10 und IL1 α hemmte sehr deutlich die Phagozytoseleistung der Monozyten. Passend hierzu konnte die Zugabe eines Anti-IL10 Antikörpers, nicht aber eines IL1 Rezeptor Antagonisten (IL1Ra) zu PBMC Kulturen die Phagozytose-inhibierende Wirkung von Überständen antagonisieren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

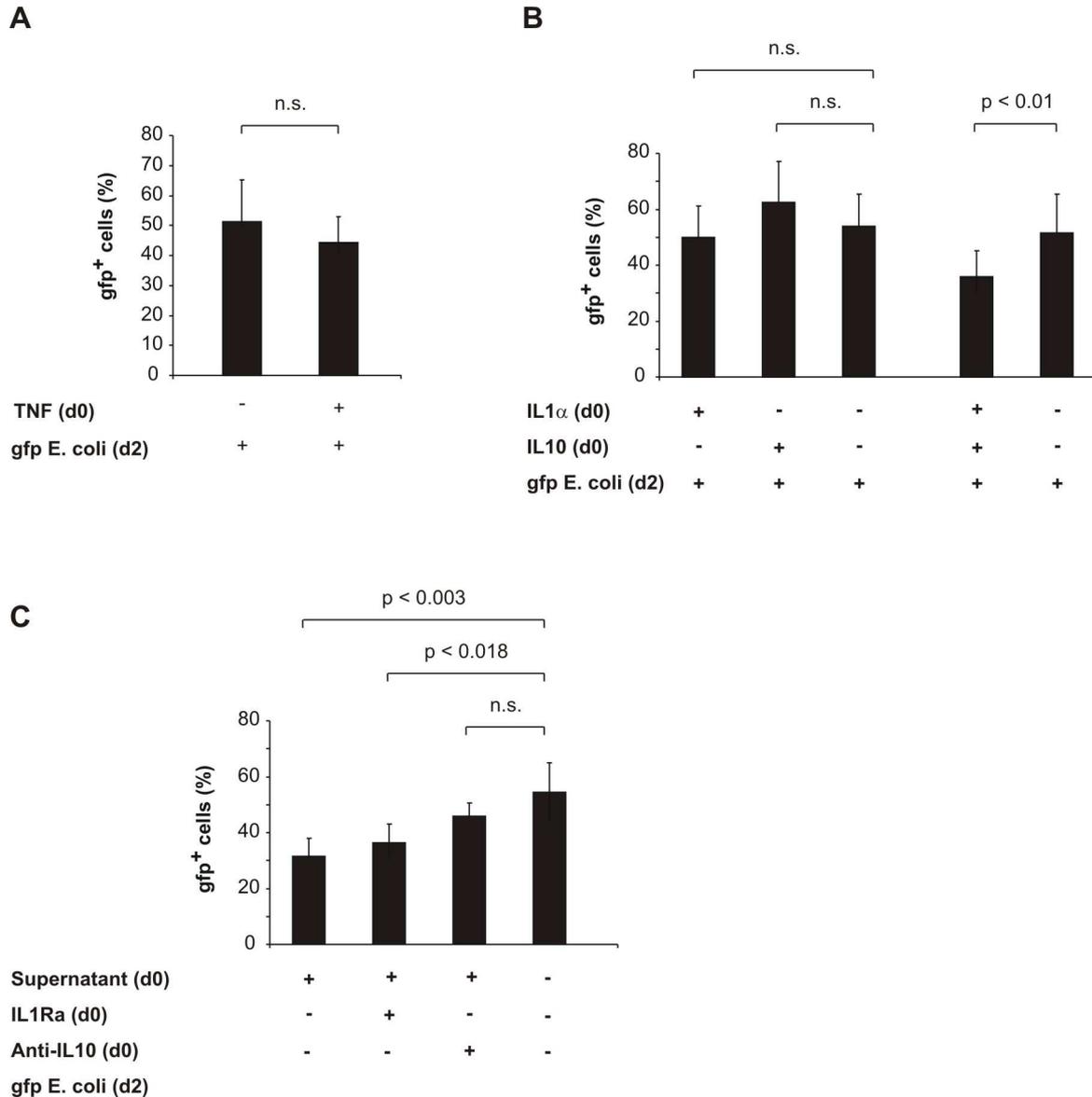


Abbildung 9: Die Exposition gegenüber isolierten inflammatorischen Zytokinen löst keine Phagozytosehemmung aus. Frisch isolierte PBMCs wurden in Gegenwart von TNF (A), IL1α oder IL10 bzw. der Kombination der letzten beiden (B) bis zum d2 kultiviert und anschliessend die Phagozytoseleistung ermittelt. (C) Anti-IL10, nicht aber IL1Ra kann die Phagozytose-inhibierende Wirkung in PBMC Kulturen aufheben, welche seit dem d0 in Gegenwart von Überständen kultiviert worden waren. Die Daten stellen gepoolte Daten aus zwei Experimenten mit insg. 8 Spendern dar. n.s. = nicht signifikant.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Diese bisherig dargestellten Daten weisen darauf hin, dass die Hemmung der Phagozytoseleistung bakteriell vorstimulierter Monozyten offensichtlich ein komplexer, multifaktoriell bedingter Prozess ist, welcher die Gegenwart von intakten Bakterien und die Existenz eines spezifischen inflammatorischen Zytokinmilieus - unter anderem mit IL10 und IL1 α - erfordert.

Bakteriell vor-stimulierte Monozyten weisen eine intakte Phagozytoseleistung für apoptotische Zellen auf.

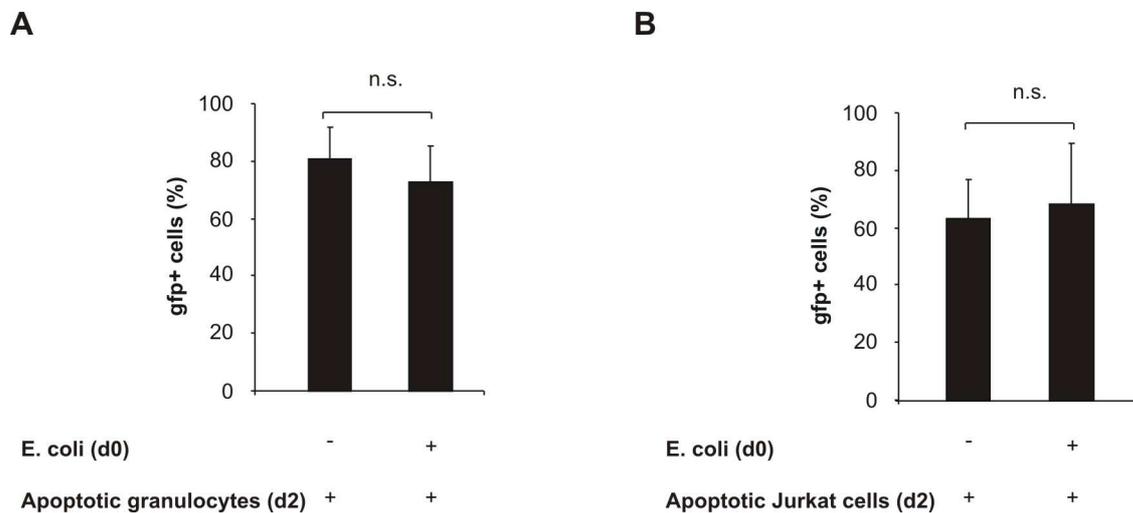


Abbildung 10: Die bakterielle Re-Programmierung an d0 beeinflusst nicht die spätere Phagozytosefähigkeit von Monozyten für apoptotische Zellen. Re-programmierte oder Kontrollmonozyten wurden an d2 mit apoptotischen PKH26-markierten Granulozyten oder Jurkatzellen koinkubiert und das Ausmass der Phagozytosefähigkeit für diese apoptotischen Zellen bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Experimenten mit insg. 6 Spendern. n.s. = nicht signifikant.

Um näher zu untersuchen, ob die reduzierte Phagozytoseleistung selektiv für die Phagozytose von Bakterien besteht, oder es sich hierbei um prinzipiell veränderte Mechanismen in der Regulation von phagozytären Prozessen handelt, wurden bakteriell vorstimulierte Monozyten aus PBMC Kulturen an d2 mit PKH26-gefärbten apoptotischen,



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

allogenen Granulozyten oder Jurkatzellen ko-inkubiert (Abbildung 10). Es zeigte sich, dass die Phagozytoseleistung für apoptotische Partikel trotz vorangegangener Vorstimulation erhalten war, d.h. regulierte Mechanismen, welche spezifisch für die Erkennung und / oder Internalisierung von Bakterien verantwortlich sind, müssen für eine spätere Inhibierung der Phagozytoseleistung verantwortlich sein.

Die bislang dargestellten Daten zeigen, dass für eine Phagozytosehemmung an d2 die Vorstimulation mit intakten - lebenden oder toten - Bakterien, nicht aber die Exposition gegenüber LPS notwendig und ausreichend ist, um die Phagozytoseleistung an d2 einzuschränken.

Die bakterielle Vorstimulation induziert eine FcγR und Scavenger Receptor (SR) Herunterregulation in CD14⁺ Monozyten.

Die oben beschriebene selektive Hemmung von bakteriellen Phagozytoseprozessen nach Re-Programmierung suggeriert, dass sehr spezifisch Mechanismen der Erkennung und Internalisierung von Bakterien verändert werden können. Um dieser Hypothese nachzugehen, analysierten wir das mRNA Expressionsprofil re-programmierter und Kontrollmonozyten in Bezug auf eine Vielzahl von Genfamilien, welche eine Rolle bei phagozytären Prozessen spielen (Abbildung 11). Hierbei zeigte sich, dass vorstimulierte Monozyten im Gegensatz zu Kontrollmonozyten eine deutlich reduzierte mRNA Expression von Fcγ Rezeptoren, wie dem CD16 (FcγRIII), von Scavenger Rezeptoren (SR), wie dem CD36, des Lectin-like oxLDL Receptors (Lox-1) sowie zu einem geringeren Ausmass auch ihrer Komplement Rezeptoren (CR), wie dem CD11b/CD18 (ITGαM/ITGβ2) zeigten. Passend zu den oben dargestellten Daten, dass die Phagozytose für apoptotische Zellen auch nach bakteriellem Erstkontakt erhalten bleibt, zeigte sich die Höhe der mRNA Expression für Phosphatidylserin (PS) Rezeptoren, wie z.B. dem T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein-1 (TIM1), -4 (TIM4) und dem brain-specific angiogenesis inhibitor-1 (BAI1), welche in der Phagozytose von apoptotischen Zellen eine zentrale Rolle spielen, in re-programmierten Monozyten unverändert. Gleiches galt für die TLR4 Rezeptoren und kleine GTPasen (z. B. Rho1, RhoG, Rac1 und Cdc42), welche die phagozytäre Signaltransduktion medieren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

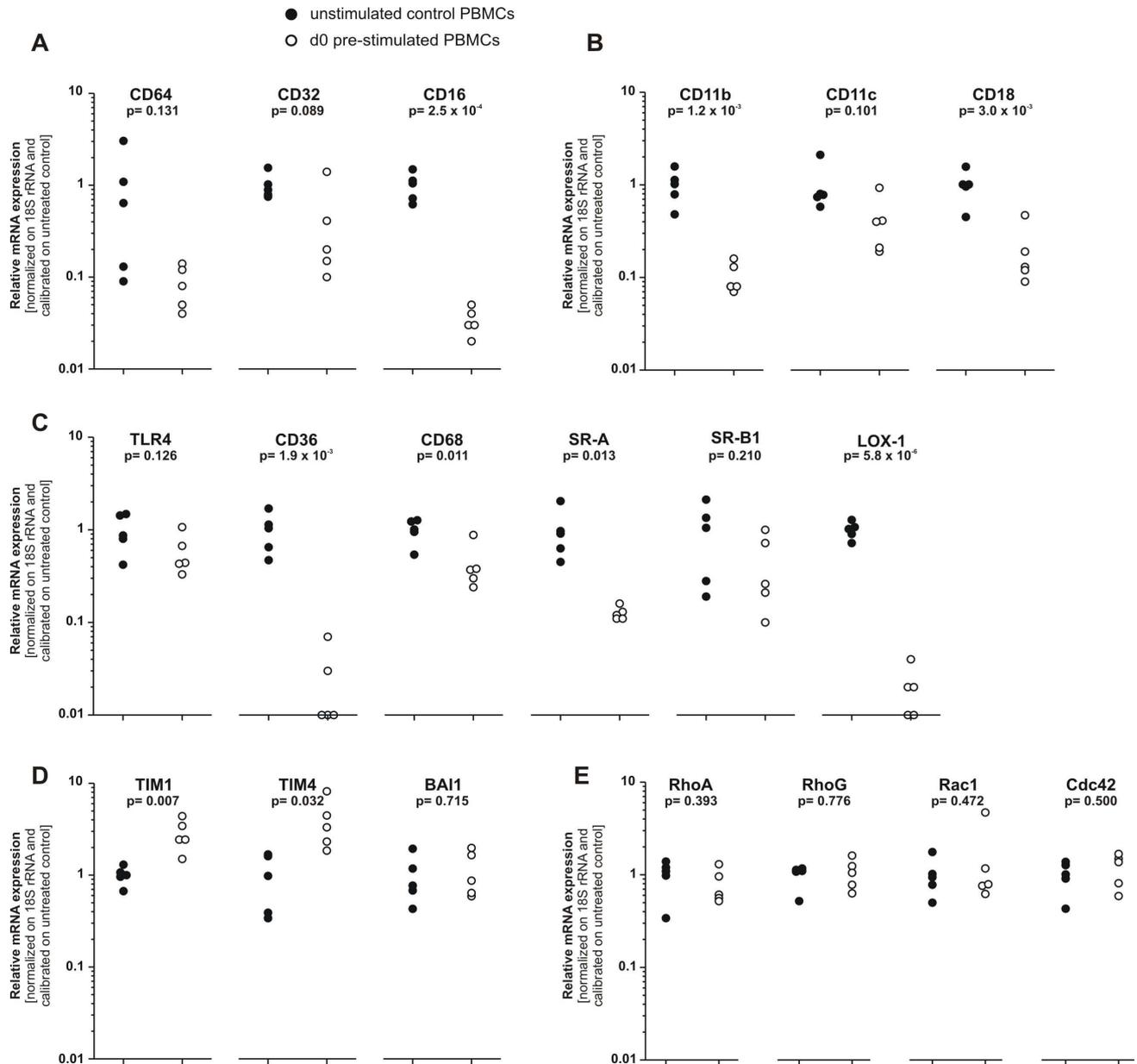


Abbildung 11: Re-programmierte Monozyten zeigen eine reduzierte mRNA Expression von Fcγ und Scavenger Rezeptoren. Re-programmierte und Kontrollmonozyten wurden an d2 mit *E. coli* Bakterien kokkubiert. 1 hr später wurden die Monozyten mittels magnetischer Zellseparation isoliert und eine qRT-PCR für wichtige Phagozytoserezeptorfamilien durchgeführt. Dargestellt ist die relative Transkription der entsprechenden Rezeptoren, welche zunächst auf den 18S rRNA Gehalt der Zellproben normiert und dann auf den Mittelwert unbehandelter Kontrollproben kalibriert wurde. Die p-Werte zeigen die statistische Signifikanz an, welche mit einem Student T Test für ungepaarte Proben errechnet wurde. Die Daten repräsentieren ein Experiment mit 5 Spendern.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

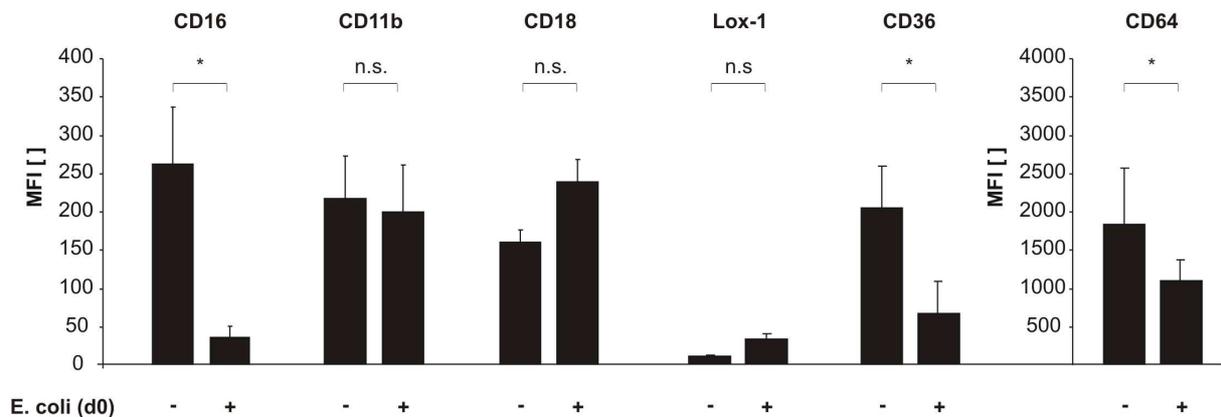


Abbildung 12: Re-programmierte Monozyten zeigen eine reduzierte Proteinexpression bestimmter Fcγ Rezeptoren und des Scavenger Rezeptors CD36. Re-programmierte und Kontrollmonozyten wurden an d2 vor der *E. coli* Phagozytose durchflusszytometrisch auf die Rezeptorexpression oben angegebener Rezeptoren untersucht. Angegeben sind die MFI Werte von 3 gepoolten Experimenten mit 7 Spendern.

Durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenrezeptoren bestätigten für die FcγR (CD16 und CD64) und den Scavenger Rezeptor CD36, nicht aber für das Lox-1 oder die Komplement Rezeptor Untereinheiten CD11b and CD18, dass sich parallel zur erniedrigten intrazellulären mRNA Expression auch an der Zelloberfläche eine erniedrigte Rezeptorexpression dieser Proteine fand (Abbildung 12). Wir schliessen daraus, dass die bakterielle Vorstimulation von PBMCs zu einer selektiven Herunterregulation von Fcγ und Scavenger Rezeptoren führt, welche mit einer spezifisch reduzierten Phagozytoseleistung für Bakterien am d2 vereinbar ist.

Die Herunterregulation von Fcγ und Scavenger Rezeptoren trägt funktionell zur Phagozytosehemmung von re-programmierten Monozyten bei.

Üblicherweise wird die Phagozytose von Bakterien durch die konzertierte Aktion von SRs, FcγRs und CRs vermittelt. Hierbei beruht die Wirksamkeit der letzten beiden Rezeptorklassen auf der Gegenwart von opsonisierendem Serum-IgG bzw. von Komplement Proteinen. Um den relativen Beitrag beider Rezeptorfamilien in der Phagozytose von Bakterien bestimmen zu können, untersuchten wir zunächst den Einfluss einer Serum



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Modifikation auf die Monozyten-medierte Phagozytose von Bakterien (Abbildung 13). In der Abwesenheit von Serum werden Bakterien in der Regel durch SR-abhängige Erkennung internalisiert.

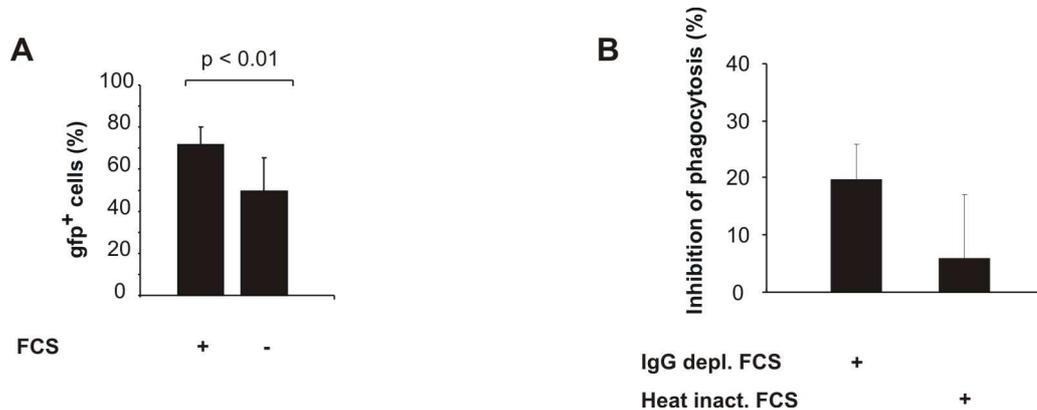


Abbildung 13: Die Phagozytoseleistung ruhender Monozyten wird in erster Linie durch die Fc γ und Scavenger Rezeptor Familien bewirkt. Frisch isolierte PBMCs wurden in einem Medium mit 10% FCS kultiviert. An d2 wurde die Phagozytoseaktivität derart ruhender Monozyten in der Gegenwart oder der Abwesenheit von FCS (A) bzw. in der Gegenwart von IgG-depletiertem FCS bzw. hitze-inaktiviertem FCS (B) getestet. Die Daten stellen gepoolte Daten aus 4 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 12 Spendern dar.

Wie zu erwarten zeigte sich, dass das Hinzufügen von Serum die Phagozytoseleistung deutlich erhöhte. Dies wurde in erster Linie durch die Gegenwart des opsonisierenden IgG und nur zu einem geringen Ausmass durch das Vorhandensein von Komplementfaktoren vermittelt, da eine IgG Depletion in einer starken Hemmung der Phagozytoseleistung resultierte, während eine Komplement Inaktivierung kaum einen Effekt zeigte. Wir schliessen daraus, dass in unserem Modellsystem Fc γ Rs (CD16 und CD64) und SRs massgeblich die Effizienz der Phagozytose von ruhenden PBMC-ständigen Monozyten bestimmen. Zusammen mit unserer Beobachtung, dass die bakterielle Vorstimulation die Expression von Fc γ Rs (CD16 und CD64) und CD36 herunterreguliert, deutet das darauf hin, dass kausal ein Zusammenhang zwischen der verminderten Phagozytoseleistung und der Fc γ R/SR Herunterregulation existiert.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, quantifizierten wir das Ausmass der Phagozytosehemmung in bakteriell vorstimulierten Monozyten in Abhängigkeit von der



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Gegenwart von Kontroll- oder IgG-depletiertem Serum. Abbildung 14A zeigt, dass interessanterweise die Depletion von IgG die Phagozytoseleistung re-programmierter Monozyten nicht weiter vermindern kann. Diese Beobachtung würde dazu passen, dass re-programmierte Monozyten die FcγR für ihre Phagozytose nicht mehr benutzen.

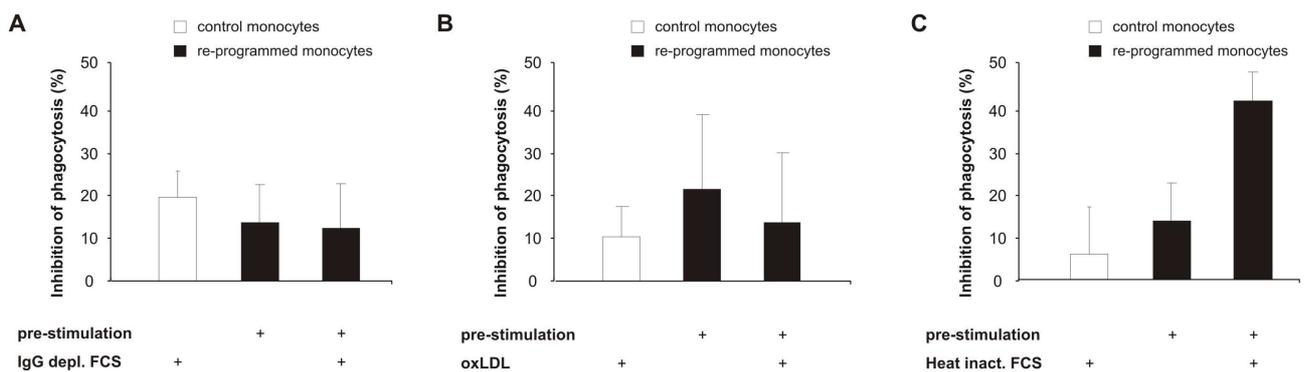


Abbildung 14: Die residuelle Phagozytoseaktivität re-programmierter Monozyten basiert auf dem Vorhandensein von Komplement Rezeptor-vermittelten Signalen. Re-programmierte Monozyten wurden an d2 in frischem Medium resuspendiert, welches entweder 10% natives oder IgG-depletiertes Serum (A), FCS-freies Medium +/- oxLDL (B) oder hitze-inaktiviertes FCS (C) enthielt. 30 Minuten später wurde die Phagozytosekapazität bestimmt. Angegeben ist das Ausmass der Inhibition der Phagozytose von CD14⁺ Monozyten in % in den respektiven FCS Präparationen in Relation zu Kontrollinkubationen, welche in einem Medium mit FCS (A, C) oder in Serum-freiem Medium (B) durchgeführt wurden. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, welche mit insgesamt 7 Spendern durchgeführt wurden.

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss einer bakteriellen Vorstimulation auf die Phagozytoseleistung in Gegenwart oder Abwesenheit von oxidierten low density Lipoprotein Partikeln (oxLDL). Hierbei handelt es sich um gut definierte kompetitierende Liganden der SR Familie. Das Hinzufügen von oxLDL Partikeln zu re-programmierten Monozyten zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung an d2, dies deutet darauf hin, dass auch die SR Familie für die Phagozytoseleistung bakteriell vorstimulierter Monozyten vernachlässigbar ist. Im Gegensatz hierzu führte eine Dekomplementierung des FCS zu einer ganz deutlichen



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Hemmung der residuellen Phagozytoseleistung re-programmierter Monozyten (Abbildung 14B).

Diese Daten implizieren, dass die Phagozytoseleistung ruhender Monozyten in erster Linie durch die Fc γ und Scavenger Rezeptor Familien bewirkt wird, während re-programmierte Monozyten massgeblich ihrer CR bedürfen, um ihre Phagozytoseleistung aufrechtzuerhalten.

Re-programmierte Monozyten zeigen einen charakteristischen Phänotyp mit intakter Fähigkeit zur T Zell Stimulation und einem charakteristischem IL6^{hi}IL10^{lo}IL12/23p40^{lo}TGF- β ^{int} Zytokinprofil.

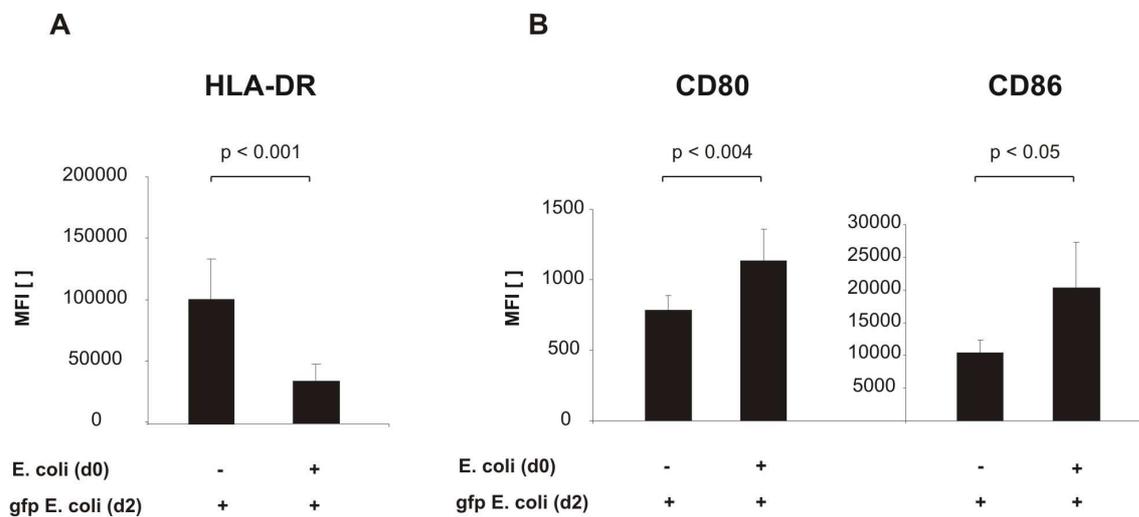


Abbildung 15: Re-programmierte Monozyten zeigen einen HLA-DR^{int} CD80^{hi} CD86^{hi} Phänotyp. Re-programmierte und Kontrollmonozyten wurden an d2 vor Durchführung einer *E. coli* Phagozytose durchflusszytometrisch auf die Rezeptorexpression oben genannter Rezeptoren untersucht. Dargestellt sind die MFIs mit Mittelwerten und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Spendern.

Um die funktionellen Konsequenzen einer Re-Programmierung von Monozyten auf adaptive Immunprozesse näher zu beleuchten, untersuchten wir die Oberflächenexpression von kostimulatorischen Rezeptoren, welche bekanntermassen wichtig für die Interaktion von CD14⁺



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Monozyten mit T Zellen sind und charakterisierten das Zytokinmilieu, welches durch eine Ko-Kultivierung von re-programmierten PBMCs mit frisch isolierten, CD14-depletierten PBMCs entstand. Re-programmierte Monozyten zeigten eine Herunterregulation von HLA-DR (Abbildung 15) und zu einem geringeren, statistisch nicht signifikanten Ausmass auch des HLA-DQ (Daten nicht gezeigt). Parallel hierzu fand sich eine Hochregulation der CD80/CD86 Oberflächenexpression auf bakteriell vorstimulierten CD14⁺ Monozyten. Diese Befunde sind vereinbar mit einem distinkt veränderten monozytären Phänotyp, welcher eine reduzierte Antigen-präsentierende Kapazität bei gleichzeitig erhaltenem T Zell aktivierendem Potential aufweist.

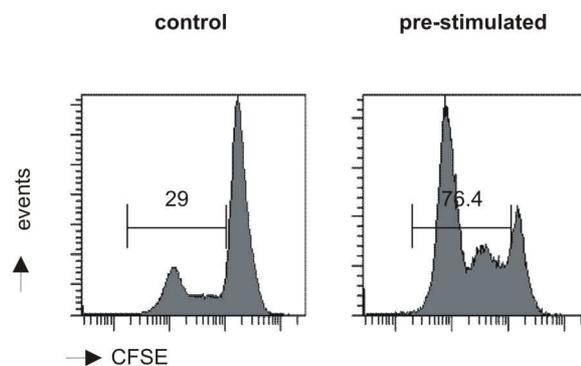


Abbildung 16: Re-programmierte Monozyten besitzen ein höheres Potential zur Induktion einer T Zell Proliferation als Kontrollmonozyten. Frisch isolierte, CFSE-markierte, CD14-depletierte PBMCs wurden an d2 zu re-programmierten bzw. unstimulierten PBMCs in definierter Menge, wie in Material und Methoden beschrieben, hinzugefügt. 5 Tage später wurde die T Zell Proliferation durchflusszytometrisch quantifiziert. Gezeigt ist exemplarisch ein originales Histogramm eines Experiment mit drei verschiedenen Spendern.

Passend hierzu zeigten re-programmierte PBMC-ständige Monozyten ein deutlich erhöhtes Potential zur Proliferationsinduktion von naiven autologen T Zellen (Abbildung 16). Da die Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf PBMCs, welche in Gegenwart apoptotischer Zellen kultiviert wurden, nicht verändert waren (Daten nicht dargestellt), gehen wir davon aus, dass die Gegenwart apoptotischer Bystander Zellen nicht alleinig für die gesteigerte T Zell Proliferation verantwortlich gemacht werden kann.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

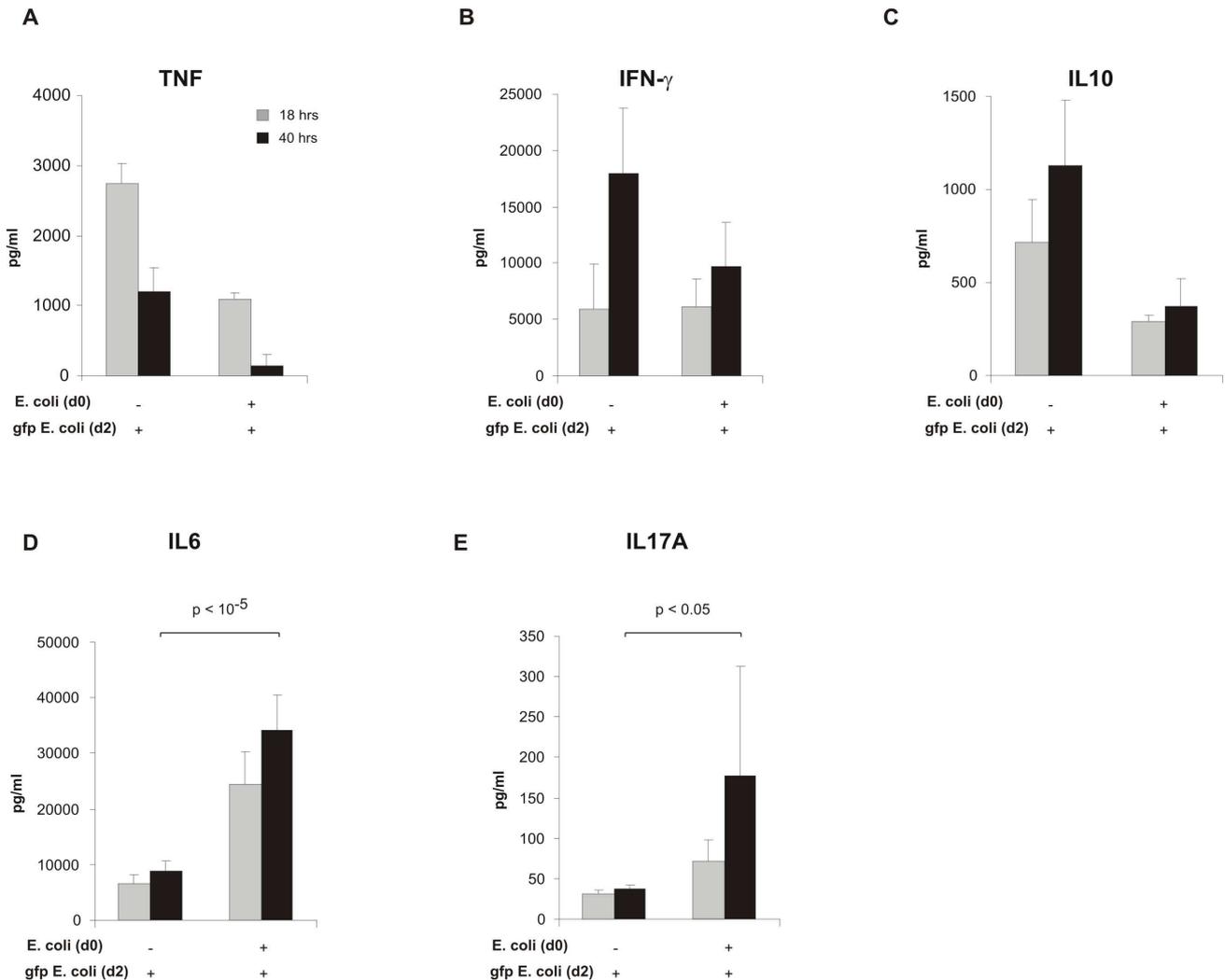


Abbildung 17: Re-programmierte PBMCs können ein T_H17 Milieu induzieren. Re-programmierte und Kontrollmonozyten wurden an d2 mit *E. coli* Bakterien ko-inkubiert. Unmittelbar nach der Phagozytose wurden frisch isolierte, autologe CD14-depletierte PBMCs in definierter Menge hinzugegeben. Die Überstände dieser Ko-Kulturen wurden nach 18 bzw. nach 40 hr mittels Durchflusszytometrie auf die Konzentrationen der angegebenen Zytokine hin untersucht. Die Daten entsprechen gepoolten Daten von 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Spendern.

Interessanterweise unterschied sich das Zytokinmilieu, welches in dem naiven Ko-Kultur System generiert wurde, fundamental von dem, welches sich in dem Ko-Kultursystem mit re-programmierten Monozyten fand (Abbildung 17). Im ersten war TNF das dominierende



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Zytokin in der sehr frühen inflammatorischen Phase (nach 18 h), während das T_H1-typische IFN- γ und das T_R1-charakteristische IL10 in späteren Phasen akkumulierten (nach 40 h). In dem Ko-Kultursystem mit re-programmierten Monozyten waren die Konzentrationen dieser Zytokine deutlich reduziert, stattdessen zeigten sich hier IL6 und später (nach 40 h) das T_H17-charakteristische Zytokin IL17A. Bemerkenswerterweise liessen sich in der Ko-Kultur von re-programmierten, isolierten Monozyten mit frisch isolierten T Zellen keine T_H17 Zellen induzieren (Daten nicht gezeigt). Wir schliessen daraus, dass die Re-Programmierung von PBMC Kulturen für die Entstehung bzw. die Konvertierung zu T_H17 Zellen notwendig ist.

Da M1 und M2 Makrophagen als klassische Vertreter inflammatorischer monozytärer Zellen angesehen werden (14), fragten wir uns, ob die von uns generierten Monozyten einem dieser klassischen Vertreter entsprechen könnten. Die Analyse der in M1 und M2 Makrophagen typischerweise exprimierten intrazellulären Zytokine zeigte, dass re-programmierte Monozyten einen IL6^{hi}IL10^{lo}IL12/23p40^{lo}TGF- β ^{int} Phänotyp aufweisen und damit einen Intermediärzustand zwischen den GM-CSF induzierten IL10^{lo}IL12/23^{hi} M1- und den M-CSF induzierten IL10^{hi}IL12/23^{lo} M2-Makrophagen darstellen (Abbildung 18). Die hier charakterisierten re-programmierten Monozyten weisen also einen einzigartigen Phänotyp auf, der weder einem M1 noch M2 Makrophagen entspricht.

Zusammenfassend zeigen unsere Analysen, dass re-programmierte Monozyten nicht, wie früher angenommen, in einem immun-paralytischen Stadium persistieren und dadurch bedingt eine eingeschränkte Neigung zur Phagozytose aufweisen, sondern dass sie augenscheinlich ihre phänotypische und funktionelle Orientierung hin zur Modulation von adaptiven Immunantworten ändern. Hiermit tragen sie zum einen zu einer verstärkten T Zell Proliferation aber auch zu einer Modulation des Zytokinmilieus bei, welches T_H17-dominierte Immunantworten begünstigt.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

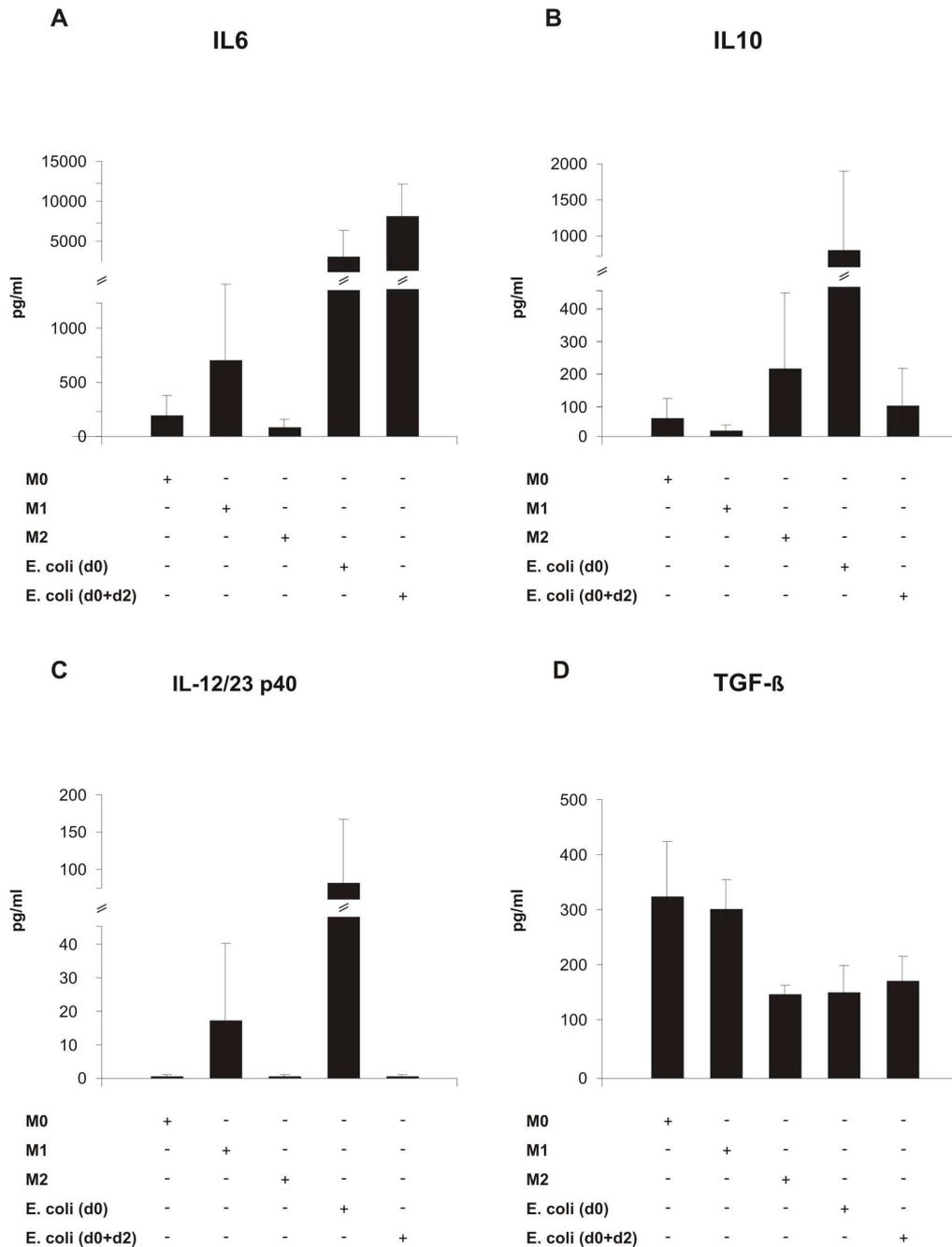


Abbildung 18: Das Zytokinprofil bakteriell re-programmierter Monozyten entspricht einem Intermediär-Zustand zwischen M1 und M2 Makrophagen. M0, M1 und M2 Makrophagen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, generiert und die Überstände an d8 auf die o.g. Zytokinkonzentrationen untersucht. Re-programmierte Monozyten wurden an d2 nach erneuter Phagozytose von *E. coli* Bakterien isoliert und für weitere 24 Stunden in Medium kultiviert, bevor die Überstände auf die Konzentrationen o.g. Zytokine hin analysiert wurden. Das Experiment stellt gepoolte Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 4 Spendern dar.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Da wir als langfristig die oben beschriebenen Phänomene auch *in vivo* untersuchen wollten, mussten wir zunächst ein Mausmodell generieren, welches ein Surrogatmodell zur menschlichen Hämatopoese darstellen kann. Hierzu transplantierten wir den oben beschriebenen NSG Mausstamm mit menschlichen CD34⁺ Stammzellen (SC) und untersuchten, ob sich überhaupt eine monozytäre Zelllinie generieren lässt. Die durchflusszytometrische Analyse von CD14⁺ Monozyten und CD15⁺ Granulozyten zeigte, dass sich bereits in der Woche 12 nach Transplantation relevante Mengen an CD14⁺ Monozyten (Mittelwert 18.4 ± 7.7%) und CD15⁺ Granulozyten (Mittelwert 11 ± 4%) generieren liessen (Abbildung 19). Der Pool an unreifen Knochenmarks-ständigen CD33⁺ Vorläufer Zellpopulationen war hierbei beträchtlich (Mittelwert 58 ± 7%). Wir schliessen daraus, dass die myelomonozytäre Zelldifferenzierung in adult transplantierten huNSG Mäusen auch ohne die exogene Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie dem GM-CSF oder dem M-CSF, gut möglich erscheint.

huNSG-generierte Monozyten zeigen ein phänotypisch vergleichbares Rezeptorexpressionsprofil zu humanen Kontrollmonozyten.

Um den Reifegrad der huNSG-generierten Monozyten näher zu charakterisieren, bestimmten wir in einem nächsten Schritt die Expression antigen-präsentierender Moleküle, wie dem HLA-DR und T Zell ko-stimulatorischer Moleküle wie dem CD80 und CD86 (Abbildung 20). Es zeigte sich, dass in huNSG Mäusen die HLA-DR Expression (Mittelwert: 92 ± 13.9%) vergleichbar mit humanen Referenzwerten war und dass die basale Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 (MFI: 40 ± 21.8) dem humaner, adulter Kontrollen ähnelte. Wie zu erwarten, fehlte in den steril gehaltenen huNSG Mäusen das auch zur B7 Familie gehörende CD80, welches durch die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen induziert wird, nahezu vollständig (Mittelwert: 7 ± 8%). Zum Nachweis der prinzipiellen Induzierbarkeit ko-stimulatorischer Moleküle wurden Knochenmarks-ständige Monozyten *in vitro* mit IFN- γ stimuliert. Unter diesen Kautelen konnte eine deutliche Hoch-Regulation des CD86 Moleküls gezeigt werden (MFI huNSG Mäuse unstimuliert: 46.5 ± 19.7, stimuliert 99 ± 24, humane Kontrolle unstimuliert 69 ± 34.2, stimuliert 169 ± 78.4).



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

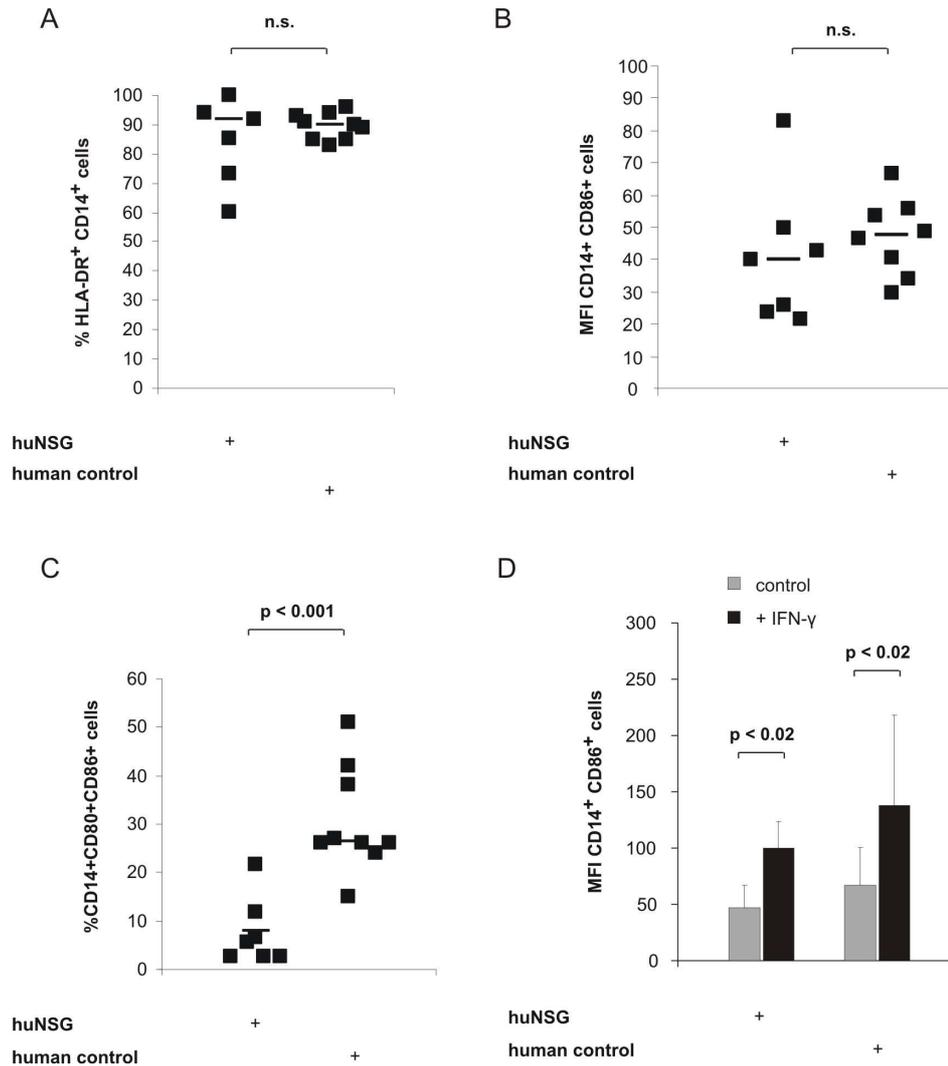


Abbildung 20: NSG-generierte Monozyten zeigen eine den menschlichen Kontrollen vergleichbare Expression an Antigen-präsentierenden und T Zell ko-stimulierenden Molekülen. Peripheres Blut von huNSG Mäusen wurde in der 12. Woche nach Transplantation auf die Expression von HLA-DR (A), CD86 (B) und CD80 (C) hin untersucht. Angegeben sind die Einzelwerte und Mediane der genannten Zellpopulationen in % (A, C) bzw. der MFI (B) bezogen auf die Gesamtheit der CD45⁺ Zellen. (D) Durch *in vitro* Stimulation mit IFN- γ lässt sich die CD86 Expression auf NSG-generierten Monozyten hochregulieren. Knochenmarks-ständige huNSG Monozyten bzw. menschliche PBMC Kontrollen wurden *in vitro* mit IFN- γ stimuliert und vorher bzw. nach 24 Stunden auf die Expression von CD86 hin untersucht. Die Daten stellen gepoolte Daten aus Stammzelltransplantationsreihen mit jeweils 3 humanen SC Spendern dar.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Diese Daten weisen darauf hin, dass in adult transplantierten huNSG Mäusen das Knochenmarksstroma bzw. das dort herrschende Zytokinmilieu trotz des murinen MHC Hintergrundes ausreichend gute Konditionen zur Induktion von humanen, antigen-präsentierenden MHC Molekülen und zur Expression ko-stimulatorischer Moleküle bietet.

huNSG-generierte CD14⁺ Monozyten zeigen eine verminderte T Zell stimulierende Kapazität bei erhaltener Phagozytoseleistung.

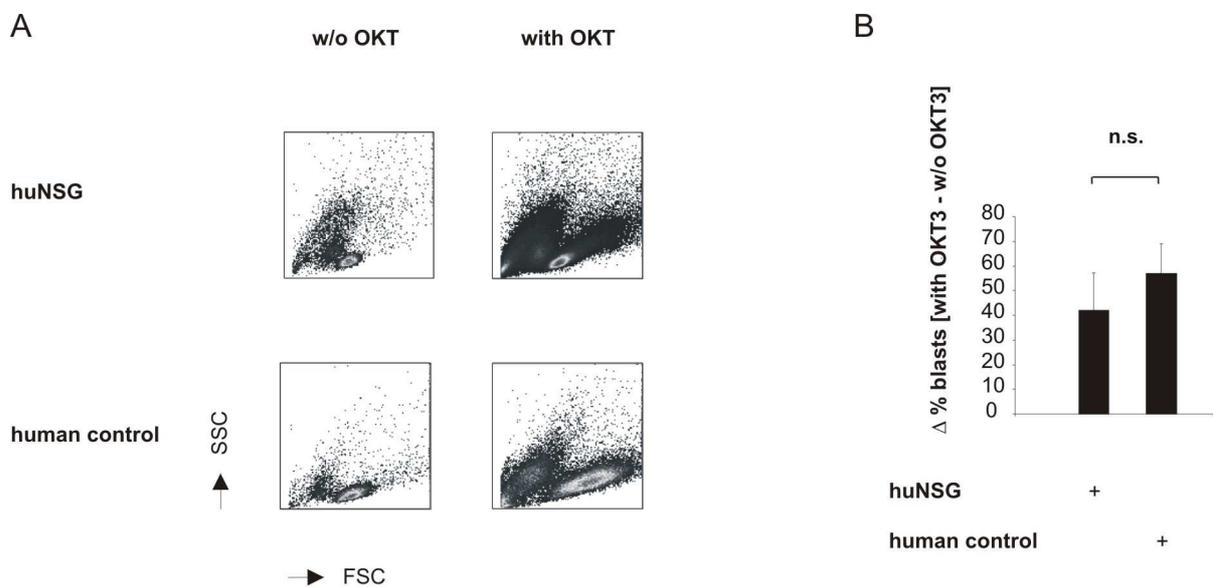


Abbildung 21: HuNSG-generierte Monozyten können eine T Zell Blastenformation nach OKT3 Stimulation induzieren. huNSG-generierte Milzzellen von Woche 12 transplantierten Mäusen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, CFSE-markiert und für 5 Tage in der An- bzw. Abwesenheit von OKT kultiviert. Dargestellt sind exemplarisch die Scatter Plots (A) bzw. Mittelwerte und Standardabweichungen (normalisiert auf Kontrollmäuse ohne OKT) von 3 huNSG Mäusen, welche mit 2 verschiedenen SC Spendern humanisiert worden waren.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

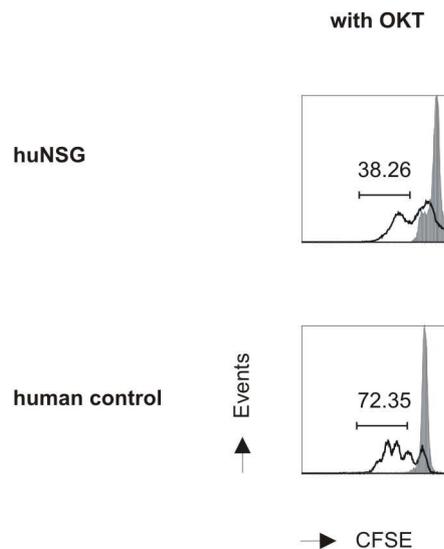


Abbildung 22: HuNSG-generierte Monozyten induzieren eine T Zell Proliferation nach OKT3 Stimulation. huNSG-generierte Milzzellen von Woche 12 transplantierten Mäusen wurden CFSE-markiert und für 5 Tage in der An- bzw. Abwesenheit von OKT kultiviert. Dargestellt sind exemplarisch die überlagerten Histogramme einer huNSG Maus und einer menschlichen Kontrolle jeweils mit den - OKT Kontrollen (grau straffiert) und den + OKT Proben (schwarze Linie) von 3 huNSG Mäusen, welche mit 2 verschiedenen SC Spendern humanisiert worden waren.

In einem weiteren Schritt analysierten wir die funktionelle Kapazität huNSG-generierter Monozyten in Bezug auf ihre Fähigkeit zur T Zell Stimulation und zur Phagozytoseaktivität. Hierbei wählten wir die T Zell Blastenformation und die Proliferation durch eine mAB Antikörper-medierte (OKT) T Zell Rezeptorligation als Mass für die Fähigkeit zur T Zell Stimulation. Wenn der OKT3 Antikörper nicht kreuz-vernetzt wird, ist die T Zell Proliferation abhängig von dem Vorhandensein und der Anzahl an Antigen-präsentierenden Zellen, hier z.B. Monozyten, und ihrer Fähigkeit, ko-stimulatorische Moleküle in ausreichender Dichte zu exprimieren (23). Es zeigte sich hierbei, dass die T Zell Blasten Formation (Abbildung 21) (Mittelwert Δ Blasten (mit OKT - ohne OKT): huNSG Mäuse: $42 \pm 16\%$, humane Kontrollen: $57 \pm 12\%$) und mehr noch die Proliferation (Abbildung 22) nach OKT3 Stimulation im Verhältnis zu adulten Kontrollmonozyten verringert, aber prinzipiell erhalten ist.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

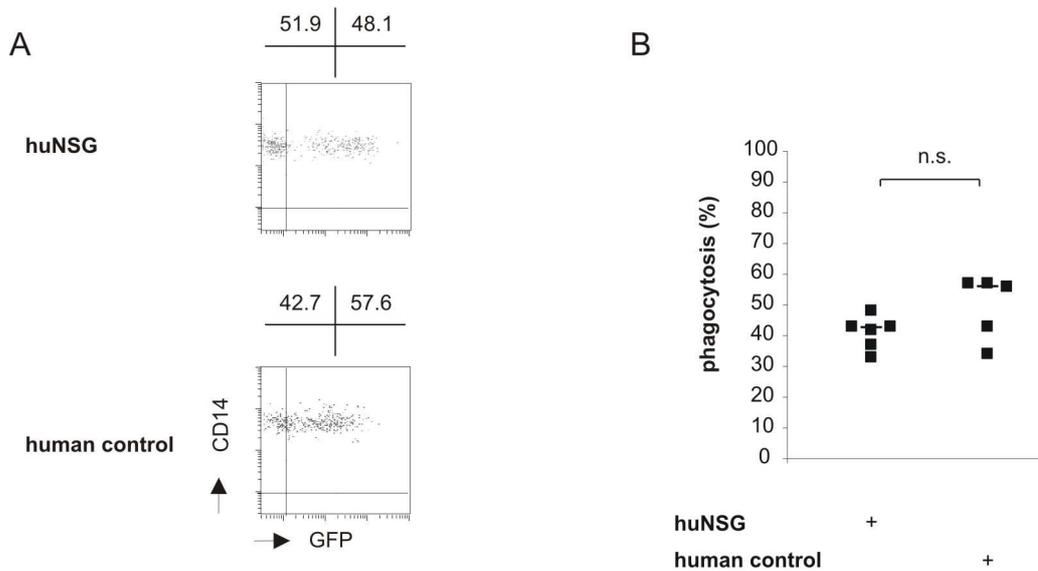


Abbildung 23: huNSG-generierte Monozyten weisen eine den menschlichen Kontrollen vergleichbare Phagozytosekapazität auf. huNSG-generierte Monozyten (Woche 12 nach Transplantation) bzw. menschliche Kontrollen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, für 1 hr mit *gfp-E. coli* Bakterien ko-inkubiert und die Frequenz *gfp*⁺ CD14⁺ Monozyten im Verhältnis zu allen CD14⁺ Monozyten quantifiziert. Dargestellt sind die originalen Dot Plots (A) und die Einzelwerte mit den entsprechenden Medianen von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Mäusen, welche mit SC eines humanen Spenders humanisiert wurden, bzw. 5 verschiedenen menschlichen Kontrollproben.

Um weitere Aspekte der Funktionalität zu untersuchen, wurde die phagozytäre Aktivität von huNSG-generierten Monozyten gegenüber *gfp*-exprimierenden *E. coli* Bakterien getestet. Bereits in der 12. Woche nach Transplantation konnten wir eine hohe Phagozytoseaktivität der huNSG-generierten Monozyten nachweisen, welche sich nicht signifikant von der Phagozytoseleistung adulter Kontrollmonozyten unterschied (Mittelwert huNSG Mäuse: 42.5 ± 5.8% vs. humane Kontrollen: 56 ± 6.8%) (Abbildung 23).

Aus diesen Daten schliessen wir, dass huNSG-generierte Monozyten gewisse funktionelle Defizienzen im Bereich der Aktivierung von huNSG-generierten T Zellen zeigen, dass sie aber in Bezug auf die Phagozytose von Bakterien bereits in Woche 12 nach Transplantation funktionell kompetent sind.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

huNSG-generierte CD14⁺ Monozyten zeigen nach *in vivo* Gabe von moderaten LPS Dosen eine unzureichende pro-inflammatorische Zytokinantwort.

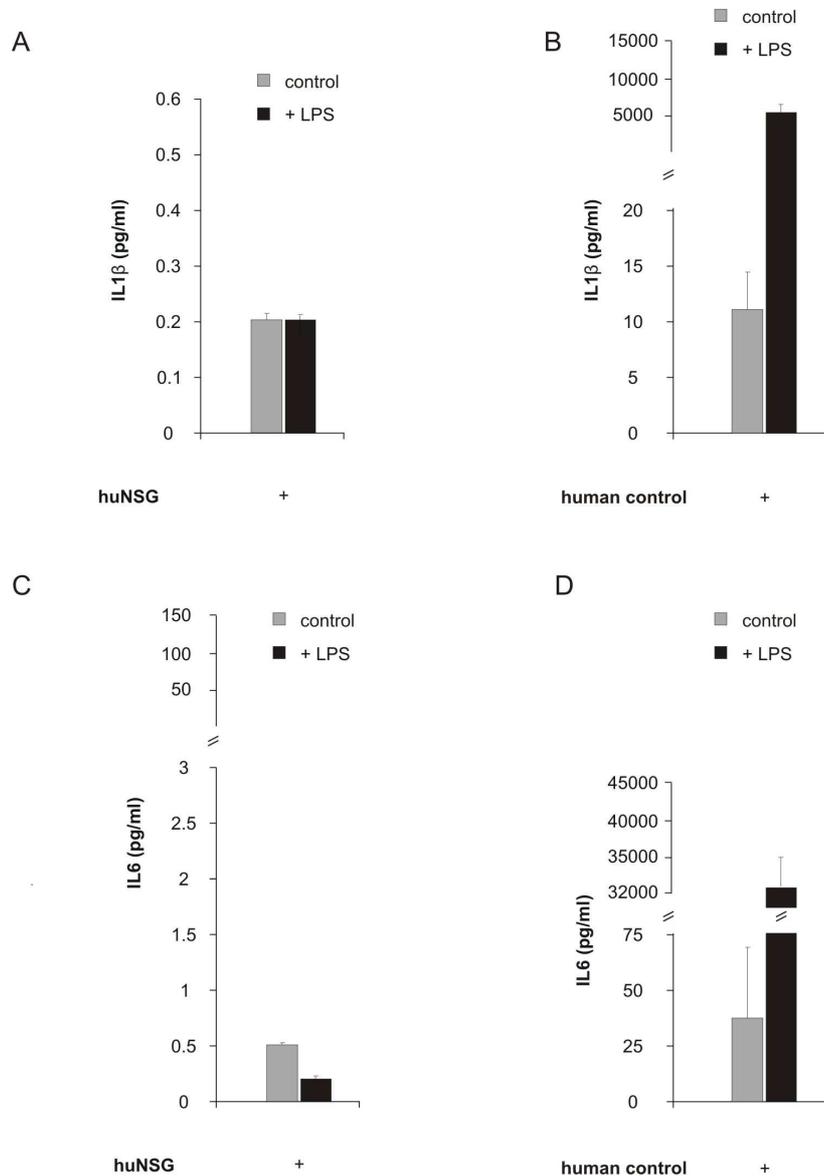


Abbildung 24: Die pro-inflammatorische Zytokinantwort von huNSG-generierten Monozyten fehlt nach *in vivo* Gabe von moderaten LPS Dosen. Humanisierte NSG Mäuse wurde *in vivo* mit 10 μ g LPS stimuliert. Als Kontrollen wurden isolierte menschliche Monozyten *in vitro* mit 100ng/ml LPS stimuliert. Die Konzentrationen an IL1 β (A, B) und IL6 (C, D) wurden vor bzw. nach Stimulation mittels eines Multiplex Bead Assays quantifiziert. Die Daten repräsentieren gepoolte Daten von zwei humanisierten Mäusen (A, C) bzw. 2 humanen Kontrollproben (B, D), welche in Duplikaten bzw. Triplikaten analysiert wurden.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

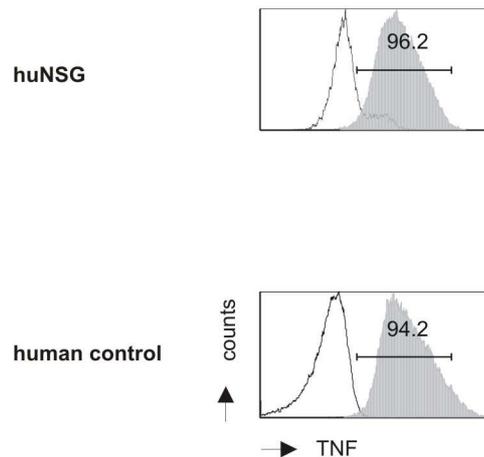


Abbildung 25: huNSG-Monozyten können nach *in vitro* Stimulation mit LPS adäquate Mengen an TNF synthetisieren. huNSG-generierte und menschliche Kontrollmonozyten wurden *in vitro* mit 100ng/ml LPS stimuliert und die intrazelluläre TNF Synthese durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten repräsentieren gepoolte Daten von zwei humanisierten Mäusen bzw. 2 humanen Kontrollproben, welche in Duplikaten bzw. Triplikaten analysiert wurden.

Um die Funktionalität in Bezug auf die Synthese und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine näher zu untersuchen, wurden huNSG Mäuse *in vivo* mit moderaten Dosen von LPS (10µg pro Maus) stimuliert. Unter diesen Dosen zeigten huNSG Mäuse praktisch keine IL1β und IL6 Sekretion. Der Vergleich zu humanen Kontrollmonozyten, welche *in vitro* mit niedrigen Dosen an LPS (100ng/ml) stimuliert wurden, bestätigte, dass Monozyten üblicherweise auf eine LPS Stimulation mit einer hohen Sekretion an IL1β und IL6 reagieren (Abbildung 24). *In vitro* stimulierte huNSG-generierte Monozyten zeigten ebenso wie die humanen Kontrollmonozyten eine starke intrazelluläre TNF Synthese (Abbildung 25), so dass wir davon ausgehen, dass auch *in vivo* nach einer entsprechend hohen LPS Stimulation pro-inflammatorische Zytokine induzierbar sein sollten.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

DISKUSSION

„In vitro Modell A“: Bakterielle Re-Programmierung humaner Monozyten

Viele Jahre lang herrschte die Meinung vor, dass das Krankheitsbild der Sepsis einer unkontrollierten Inflammation entspricht. Ein Grossteil der experimentellen Therapieansätze zielte daher darauf ab, die initiale pro-inflammatorische Immunantwort zu mitigieren (24). In letzter Zeit konnten aber eine Reihe von Untersuchungen belegen, dass ein Grossteil der Patienten nicht durch die exzessive Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sterben, sondern durch eine progredient zunehmende Immunsuppression (24), (12), (25). Bislang weiss man wenig über die verschiedenartigen Elemente, welche in der zweiten Phase eines septischen Schocks zur Re-Programmierung und der damit einhergehenden Immunsuppression beitragen. Da Monozyten eine Schlüsselrolle in dem angeborenen Immunsystem einnehmen und massgeblich zur Einleitung der adaptiven Immunantwort beitragen, wollten wir in dieser Arbeit die phänotypischen und funktionellen Änderungen von Monozyten in der anti-inflammatorischen Phase einer Inflammation näher charakterisieren.

Wir haben daher ein *in vitro* Modell der bakteriellen Re-Programmierung mit peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) entwickelt, welche zunächst mit geringen Dosen an *E. coli* Bakterien vorstimuliert, bis zum Tag 2 (d2) in einem Gentamycin-haltigen Medium kultiviert und nachfolgend mittels verschiedenartigster Methoden charakterisiert wurden. Im Gegensatz zu existierenden Studien zur frühen anti-inflammatorischen Phase haben wir bewusst darauf verzichtet, zum einen die Re-Programmierung mittels LPS vorzunehmen und zum anderen an primär isolierten Monozyten zu arbeiten. Hintergrund unserer Überlegungen waren die Tatsachen, dass eine Exposition gegenüber lebenden Bakterien möglicherweise andere funktionelle Konsequenzen als die alleinige Stimulation des Toll-like receptor 4 (TLR4) haben könnte und dass eine Kokultivierung mit physiologischerweise vorhandenen anderen Zellen in PBMC Kulturen besser eine komplexe Interaktion dieser Zellen erlauben würde und damit dem Zustand der Realität näher wäre.

Die hier dargestellten Daten zeigen eindrücklich, dass bakteriell re-programmierte, CD14⁺ Monozyten einen distinkten (IL6^{hi}IL10^{lo}IL12/23^{lo}TGF-β^{int}) Phänotypen mit einer eindrücklich reduzierten Fähigkeit zur Phagozytose aufweisen, dass sie aber gleichzeitig wesentlich zu einer vermehrten T Zell Proliferation und zur Induktion eines T_H17-polarisierten Zytokinmilieus beitragen können.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Ein Grossteil der in der Literatur beschriebenen Phänomene, welche in der anti-inflammatorischen Phase beobachtet werden können, wurden zuallererst hohen Konzentrationen an dem anti-inflammatorisch wirksamen Zytokin IL10 zugeschrieben (26), (12), (27), (28), (29). Auch in Bezug auf Monozyten konnte gezeigt werden, dass die initiale hyper-inflammatorische Antwort mit den hiermit einhergehenden Änderungen des Zytokinmilieus ursächlich für Funktionseinschränkungen sein kann (30), (31). In unseren Untersuchungen konnten wir bestätigen, dass die bakterielle Re-Programmierung von PBMCs zu hohen Konzentrationen an IL1 α und exzessiven Konzentrationen an IL10 führt. Obwohl die Zugabe eingefrorener Überstände von re-programmierten PBMCs eine deutliche Hemmung der Phagozytoseleistung auf frisch gewonnene PBMCs ausüben konnte, war interessanterweise die isolierte Zugabe der Zytokine IL1 α oder IL10 nicht in der Lage, eine Phagozytosehemmung zu initiieren. Die kombinierte Gabe beider Zytokine konnte dann allerdings eine der bakteriellen Vorstimulation vergleichbare Phagozytosehemmung auslösen. Passend hierzu wird in der Literatur beschrieben, dass die alleinige Gabe von IL10 keine „Immunparalyse“ bei (psoriatischen) Patienten induzieren kann (32). *In vitro* Studien, welche die Koinkubation von PBMCs mit *Salmonella typhi* flagella Bakterien untersuchten, konnten zeigen, dass IL10- oder IL1 β -neutralisierende Antikörper alleine die Funktionalität von re-programmierten Monozyten oder T Zellen nicht wiederherstellen können (33). Interessanterweise konnten in unserem *in vitro* Modell Anti-IL10 Antikörper, nicht aber der IL1 Rezeptor Antagonist IL1Ra die Phagozytose-hemmende Wirkung von Überständen revertieren. Passend zu Literaturdaten weisen unsere Daten auf die zentrale Rolle des IL10 in der Auslösung einer anti-inflammatorischen Immunsuppression hin.

Eine Reihe von früheren Arbeiten konnte zeigen, welche wichtige Rolle die in exzessivem Ausmass entstehenden apoptotischen Zellen in der Mediierung und Perpetuierung der Immunsuppression spielen (24), (22). Allerdings konzentrierten sich diese Untersuchungen darauf, funktionelle Einschränkungen des adaptiven Immunsystems im Rahmen einer gesteigerten Apoptose zu beschreiben. Bislang war unklar, ob die Gegenwart apoptotischer Zellen auch die Funktionalität von Monozyten beeinflussen kann. Um eine ursächliche Beteiligung von apoptotischen Zellen in der Phagozytosehemmung re-programmierter Monozyten auszuschliessen, führten wir Ko-Kultur Experimente von PBMCs mit autologen, apoptotischen PBMCs durch. Interessanterweise waren auch hohe Konzentrationen an apoptotischen Zellen nicht in der Lage, den Phänotyp oder die Funktionalität von PBMC-ständigen Monozyten zu ändern. Wir schliessen daraus, dass die Gegenwart apoptotischer Zellen nicht ursächlich für die Inhibition der Phagozytose in unserem Modellsystem war.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Frühere „Gene expression profiling“ Untersuchungen an bakteriell re-programmierten Monozyten konnten zeigen, dass die meisten transkriptionell regulativ veränderten Antworten auf eine modifizierte intrazelluläre Signaltransduktion des TLRs zurückzuführen sind (34), (35). Allerdings exprimieren Monozyten ein grosses Arsenal an pattern recognition receptors (PRR), welches in seiner Gesamtheit die komplexe phagozytäre Synapse formiert (36). Da in unserem Modell die bakterielle Re-Programmierung von Monozyten eine selektive Hemmung der späteren Phagozytoseleistung für Bakterien, nicht aber für apoptotische Zellen induzierte, analysierten wir die mRNA und Oberflächenprotein Expression einer Reihe von an der Phagozytose von Bakterien beteiligten Molekülen. In der Tat zeigte sich hier, dass die Exposition gegenüber *E. coli* Bakterien letztlich in einer Herunter-Regulation von dreien in der Phagozytose wichtigen Rezeptorklassen führte, nämlich den FcγRs, den Komplement Rezeptoren (CRs) und den Scavenger Rezeptoren (SRs). Funktionelle Experimente, welche wir in Gegenwart von IgG-depletiertem Serum oder dem SR-Liganden oxLDL durchführten, konnten eindrücklich die Bedeutung der FcγR und SR Herunter-Regulation in der Induktion der Phagozytosehemmung von re-programmierten Monozyten belegen. Passend hierzu finden sich in der Literatur Hinweise, dass eine Herunter-Regulation des SR MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) auf alveolären Makrophagen zu einer erhöhten Neigung für sekundäre Pneumokokken Infektionen in der post-infektiösen Phase viraler Erkrankungen beitragen kann (37). In der frühen Phase septischer Erkrankungen scheinen also distinkte Rezeptorfamilien für die Phagozytose von Bakterien und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine verantwortlich zu sein, und die Herunter-Regulation selektiver Rezeptorklassen scheint letztlich die mit der Re-Programmierung von Monozyten einhergehenden Phänomene zu erklären.

Auf den ersten Blick erscheint eine Herunter-Regulation essentieller Phagozytose Rezeptoren nach bakteriellem Erstkontakt eine paradoxe Reaktion zu sein. Allerdings erscheint es möglich, dass eine derartige Regulation einer funktionellen Konversion der Monozyten entspricht, welche transient - auf Kosten der angeborenen Immunität - die Induktion einer verbesserten adaptiven Immunantwort ermöglicht. In der Tat zeigen frühere Berichte, dass die sogenannte Endotoxin-Toleranz mit einer reduzierten HLA-DR Expression und einem Verlust der Antigen-präsentierenden Funktion einhergeht (8). Die phänotypische Analyse unserer re-programmierten Monozyten konnte diese früheren Berichte bestätigen. Gleichzeitig konnten wir aber auch zeigen, dass re-programmierte Monozyten eine Hoch-Regulation der T Zell kostimulierenden Moleküle wie dem CD80 und CD86 aufweisen. Passend hierzu zeigten re-programmierte PBMCs eine erhöhte Neigung zur Induktion einer



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

T Zell Proliferation und trugen durch die Sekretion von IL6 und TGF- β dazu bei, dass eine T_H17-dominierte adaptive Immunantwort eingeleitet wurde. Interessanterweise finden sich in der Literatur Hinweise, dass ein relevanter physiologischer Stimulus für die Konvertierung von naiven CD4⁺ T Zellen in T_H17 Zellen die Erkennung und die Phagozytose infizierter apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen (DCs) darstellt (38). Da sich in unserem Kultursystem DCs allerdings nicht in relevanten Mengen nachweisen liessen (Daten nicht dargestellt) und überdies beschrieben ist, dass die Induktion von T_H17 Zellen auch durch die Ko-Kultur von CD45RO⁺ CD4⁺ Gedächtnis T Zellen mit LPS-vorstimulierten Monozyten erreicht werden kann (39), vermuten wir, dass die von uns beobachtete IL17 Sekretion in erster Linie durch die Zytokine, welche von re-programmierten PBMCs ausgeschüttet wurden, induziert wurden. Neben der Induktion inflammatorischer Mediatoren sind T_H17 Zellen an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt (40), (41). In Bezug auf gramnegative Infektionen konnte in einem Mausmodell mit intraperitonealer Gabe von *E. coli* Bakterien gezeigt werden, dass die Neutralisierung von IL17 zu einer reduzierten Infiltration von neutrophilen Granulozyten und einer verminderten Beseitigung von Bakterien führen kann (42). Allerdings ist die Rolle des IL17 in der Pathogenese der monozytären Re-Programmierung bislang unzureichend charakterisiert und es muss daher offen bleiben, ob die Beobachtung einer T_H17 Zell Induktion nach bakteriellem Erstkontakt eine klinische Relevanz besitzt. Passend zu unseren Beobachtungen wurde unlängst eine Untersuchung publiziert, welche zeigte, dass eine T_H17 dominierte Immunantwort zur immunsuppressiven Phase nach Verbrennungen beitragen kann (43).

Unsere *in vitro* Untersuchungen erweitern die Kenntnisse der funktionellen Konversion von Monozyten in der Phase der bakteriellen Re-Programmierung und weisen darauf hin, dass die phagozytäre Kapazität von Monozyten ein geeigneter Biomarker in der Diagnose einer persistierenden Immunsuppression septischer Patienten sein könnte. Schwere Verminderungen der Phagozytoseleistung von Monozyten sollten als starker Indikator für eine persistierende Immunsuppression des Patienten angesehen werden und könnten durchaus dazu beitragen, dass klinische Entscheidungen, wie die Durchführung einer „second-look“ Operation bei abdominell erkrankten Patienten oder supportive immunsuppressive Therapien, z.B. mit Steroiden, differenzierter gefällt werden können.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

„In vivo Modell B“: Stammzelltransplantation von immun-permissiven NSG Mäusen zur Generierung „humaner“ Surrogatmonozyten

Es ist gut bekannt, dass sich die in Mausmodellen gewonnenen Daten zur Pathogenese und Modulation der Sepsis schwierig auf den Menschen übertragen lassen (44). Wir haben unsere umfangreichen Untersuchungen zur anti-inflammatorischen Phase der Sepsis daher zunächst damit begonnen, ein *in vitro* Modell mit menschlichen PBMCs zu generieren und näher zu verstehen. In den letzten Jahren gelang es aber - in dem Bemühen für den Menschen relevante präklinische Daten in Mausmodellen zu generieren - definierte immun-permissive Mausstämme zu kreieren, welche humanisiert werden können (HIS Mäuse = „human immune system“ mice) und welche sich als wichtiges Instrument zur Schaffung eines Surrogatmodells der menschlichen Immunantwort erwiesen haben (45). In der Tat konnten in humanisierten Mäusen wichtige Studien zu einer Reihe von viralen Erkrankungen wie HIV, EBV, CMV, Dengue Fieber und Hepatitis C durchgeführt werden (46), (47). Allerdings gibt es bislang nur sehr vereinzelt Daten zur Induktion von bakteriellen Erkrankungen in humanisierten Mäusen (48), (49). Da wir letztlich an dem Ziel arbeiten, humanisierte Mäuse zur Induktion einer gramnegativen Sepsis zu nutzen und sich die Forschungsbemühungen von uns und anderen Wissenschaftlern bislang darauf konzentriert haben, das adaptive Immunsystem in diesen HIS Mäusen näher zu charakterisieren, haben wir in diesem 2. Teil der Arbeit zunächst die Entstehung des „angeborenen“ Immunsystems in huNSG Mäusen näher untersucht.

Hierzu haben wir NSG Mäuse mit menschlichen CD34⁺ Stammzellen (SCs) transplantiert und das Entstehen bzw. die Differenzierung von CD14⁺ Monozyten näher charakterisiert. Wir konnten hierbei zeigen, dass die Generierung von Monozyten auch ohne die exogene Supplementation myelo-monozytär wichtiger hämatopoetischer Wachstumsfaktoren möglich ist und der entstehende Phänotyp dem von humanen Kontrollen gleicht. Allerdings weisen die huNSG-generierten Monozyten gewisse funktionelle Defizienzen auf, welche möglicherweise durch die Gabe von GM-CSF oder M-CSF doch positiv beeinflusst werden könnten.

In ersten Analysen konnten wir zeigen, dass sich in huNSG Mäusen ein beträchtlicher Pool an CD33⁺ Vorläuferzellen generieren lässt und sich bereits in der 12. Woche nach Transplantation sowohl CD14⁺ Monozyten als auch CD15⁺ Granulozyten in der Peripherie und im Knochenmark nachweisen lassen. Diese, verglichen mit lymphozytären Reihen,



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

relativ problemlose Generierung der myelo-monozytären Reihe beruht möglicherweise auf der früher beschriebenen Kreuzreaktivität des murinen G-CSF mit seinem humanen Homolog (46). Interessanterweise konnte trotz des murinen MHC Hintergrundes sowohl ein mit menschlichen Kontrollen vergleichbare HLA-DR Expression als auch eine Expression wichtiger ko-stimulatorischer Moleküle auf den entstehenden Monozyten verzeichnet werden. Wir vermuten daher, dass insb. die HLA-DR Expression nicht durch das umgebenden HLA Milieu gesteuert, sondern konstitutiv genetisch determiniert ist.

Funktionell zeigte sich, dass huNSG-generierte CD14⁺ Monozyten durch Kokultivierung mit IFN- γ das für die Kostimulation der T Zellen wichtige CD86 Molekül zwar nicht in dem gleichen Ausmass wie menschliche Kontrollen aber doch beträchtlich hochregulieren. Die Fähigkeit NSG-generierter Monozyten zur Induktion einer T Zell Proliferation war verringert aber prinzipiell erhalten. In früheren Untersuchungen konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl in NSG als auch in NOD/shi-scid/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) Mäusen i) die Stärke der alloimmunen T Zell Antworten im Vergleich zu menschlichen T Zellen reduziert ist (50), ii) dass die funktionelle Differenzierung von NK Zellen beeinträchtigt ist (50), (51) und dass iii) wichtige Subpopulationen von aktivierten und Gedächtnis B Zellen in Milz und Knochenmark im Sinne einer partiellen Differenzierungsblockade fehlen (50), (52). Aufgrund dieser vorbeschriebenen funktionellen Limitationen wichtiger adaptiver Immunzellen ist es gut möglich, dass die von uns beobachtete verminderte T Zell Proliferation nicht eigentlich ein Ausdruck einer verminderten Fähigkeit der Monozyten zur Kostimulation, sondern einer reduzierten T Zell Funktionalität an sich ist. Zur abschliessenden Klärung dieser Frage müsste eine Ko-Kultivierung der NSG-generierten Monozyten mit funktionell intakten menschlichen T Zellen erfolgen.

Interessanterweise zeigte sich, dass die Fähigkeit von NSG-generierten Monozyten zur Phagozytose von *E. coli* Bakterien mit der Phagozytoseleistung menschlicher Kontrollproben vergleichbar war. Da die Fähigkeit zur Phagozytose gleichzeitig eine der ontogenetisch am frühesten auftretenden immunologischen Antworten ist, vermuten wir, dass die Anforderungen an das hierfür notwendige Zytokinmilieu bzw. das umgebende Stroma geringer sind als für die Einleitung adaptiver Immunphänomene, wie z.B. einer Kostimulation von T Zellen.

Da die genetischen Modifikationen des NSG Hintergrundes in erster Linie T, B und NK Zellen betreffen, haben Manz und Mitarbeiter vermutet, dass das murine myeloide Kompartiment von NSG Mäusen, welches nach der sublethalen Bestrahlung wieder erscheint, das



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

Anwachsen eines humanen myeloiden Kompartments behindern könnte (46). Im Gegensatz zu diesen Befürchtungen konnten wir menschliche Monozyten bereits ab Woche 4 bis hin zu Woche 30 nach hämatopoetischer SC Transplantation nachweisen (Daten nicht gezeigt). Zwar scheinen NSG Mäuse sowohl das murine als auch das menschliche myeloide Kompartiment gleichzeitig unterhalten zu können, allerdings zeigen neuere Arbeiten von Chen und Mitarbeitern, dass die hydrodynamische Schwanzveneninjektion einer das humane M-CSF kodierenden Plasmid DNA die Generierung von „humanen“ Monozyten dramatisch verbessern kann (53). Zwar fehlen in der o.g. Arbeit weitergehende funktionelle Untersuchungen, wir vermuten aber, dass die Supplementation von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren unser Modell in idealer Weise erweitern würde.

Bislang gibt es nach unserem Kenntnisstand nur 2 Arbeiten, welche eine bakterielle Infektion in huNSG Mäusen induziert haben, beide haben hierbei neonatal und nicht adult transplantierte Mäuse verwendet (48), (49). Hotchkiss und Mitarbeiter haben das „Caecale Ligation und Punktionsmodell“ verwendet, bei dem mehrere Punktionen in das distale Ileum der Mäuse vorgenommen werden und das Abdomen anschliessend verschlossen wird. Dieses Modell wird als Goldstandard der Sepsis in Mausmodellen angesehen, weil es - vergleichbar zu der natürlich entstehenden Sepsis - zu allmählich entstehenden gramnegativen Infektionen kommt. Mittels dieses Modells konnten sie zeigen, dass moderate Mengen an IL1 β und TNF und beträchtliche Mengen an IL6 sezerniert werden und eine extensive Apoptose-induzierte Depletion von T und B Zellen auftritt (48). Passend hierzu konnten Fang und Mitarbeiter zeigen, dass neonatale huNSG Mäuse IL6 nach einer lethalen *Salmonella typhi* Infektion sezernierten (49). Limitierend war aber bei beiden Untersuchungen, dass der Fokus nicht auf der Charakterisierung der monozytären Funktion lag und unklar bleibt, welche Rolle die angeborene Immunität in diesen beiden Modelluntersuchungen spielte. Zusätzlich hierzu konnten wir in eigenen Arbeiten zeigen, dass NSG-generierte Monozyten von neonatal transplantierten Mäusen erhebliche phänotypische und funktionelle Defizienzen gegenüber humanen Kontrollmonozyten aufweisen (54). Obwohl wir zeigen konnten, dass sich neonatal transplantierte NSG Mäuse sehr wohl zu spezifischen Untersuchungen zu Besonderheiten und Limitationen neonataler humaner Monozyten eignen, sollte in Anbetracht der erheblichen funktionellen Defizienzen Untersuchungen zur bakteriellen Sepsis besser in adult transplantierten NSG Mäusen erfolgen. Unsere Untersuchungen zur Zytokinsynthese in adult transplantierten Mäusen zeigten zwar fehlende Antworten nach *in vivo* Gabe moderater Dosen an LPS, allerdings konnte *in vitro* eine beträchtliche Synthese inflammatorischer Zytokine gezeigt werden. Wir



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

vermuten daher, dass auch in Abhängigkeit von dem Ausmass der vorliegenden Humanisierung (gemessen an dem % CD45⁺ Zellen) höhere als die von uns eingesetzten LPS Dosen notwendig sind, um eine adequate Sekretion inflammatorischer Zytokine zu erzielen. Auch würden wir – auch in Anbetracht der im Modell A dargestellten Erkenntnisse - in künftigen Experimenten nicht auf das prinzipiell gut standardisierbare und damit gut reproduzierbare LPS als Inflammationsstimulus zurückgreifen, sondern systemische *E. coli* Infektionen induzieren. Zusammenfassend zeigen unsere im Modell B dargestellten Daten, dass adulte NSG Mäuse wichtige Aspekte des angeborenen humanen Immunsystems rekapitulieren können, dass aber eine Optimierung des Systems durch die Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren sinnvoll sein könnte. Unter diesen Kautelen könnte das Modell sowohl für Grundlagenwissenschaftler als auch für klinisch tätige Ärzte potentiell attraktiv sein.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

ZUSAMMENFASSUNG

Septische Erkrankungen werden durch eine initiale pro-inflammatorische Phase charakterisiert, welche von einer zweiten anti-inflammatorischen Phase abgelöst wird. Bekannt ist, dass im Rahmen der 2. Phase einer Sepsis Monozyten eine veränderte Funktionalität aufweisen können. Hierzu zählen unter anderem eine verminderte TNF Sekretion und eine verminderte Fähigkeit zur T Zell Stimulation. Es wird angenommen, dass diese anti-inflammatorische Phase einer Sepsis stark begünstigend auf das Auftreten nosokomialer Infektionen wirkt.

In dieser Arbeit werden zwei eigene, unlängst publizierte Arbeiten näher beschrieben (54), (55), welche zum einen bakteriell vor-stimulierte, sog. re-programmierte Monozyten in ihrer Funktionalität näher beschreiben und zweitens die Grundlage dazu legen, diese *in vitro* Beobachtungen auch *in vivo* tierexperimentell untersuchen zu können.

Es zeigt sich, dass durch die bakterielle Re-Programmierung ein Monozyt mit einem distinkten Phänotyp entsteht, welcher zwar eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Phagozytose besitzt, welcher aber gleichzeitig in der Lage ist, adaptive Immunantworten von T Zellen zu modulieren und das entstehende Zytokinmilieu hin zu einem T_H17 dominierten Milieu zu verändern. Unsere Daten erweitern das gegenwärtige Wissen um die Re-Programmierung von Monozyten und weisen darauf hin, dass eine eingeschränkte Phagozytoseleistung von Monozyten ein Warnhinweis auf eine persistierende Immunsuppression ist und sich die Bestimmung der Phagozytosekapazität möglicherweise als Biomarker einer Sepsis eignen würde.



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

LITERATUR

1. Russel J. (2006) Management of Sepsis. *NEJM* 355:1699-1713.
2. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. (2009) Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 101:36-47.
3. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15(5):496-497.
4. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, et al. (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88(5):1747-1754.
5. Biswas SK, Lopez-Collazo E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30(10):475-487.
6. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, et al. (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3(6):678-681.
7. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, et al. (2000) Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164(7):3476-3479.
8. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. (2000) Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96(1):218-223.
9. Marchant A, Duchow J, Delville JP, Goldman M. (1992) Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 monocytes in human whole blood. *Eur J Immunol* 22(6):1663-1665.
10. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, et al. (2009) Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182(10):6494-6507.
11. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, et al. (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85(8):1341-1347.



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

12. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, et al. (2004) The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 95(2):193-198.
13. Zhang X, Morrison D. (1993) Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus re-programming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 54:444-450.
14. Mantovani A, Sica A, Locati M. (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23:344-346.
15. Lauber K, Blumenthal S, Waibel M, Wesselborg S. (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14(3):277-287.
16. Hotchkiss RS, Opal S. (2010) Immunotherapy for sepsis - a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* 363(1):87-89.
17. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, et al. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174(10):6477-6489.
18. Hsu HY, Wittemann S, Joos TO. (2008) Miniaturized parallelized sandwich immunoassays. *Methods Mol Biol* 428:247-261.
19. Hsu HY, Wittemann S, Schneider EM, Weiss M, Joos TO. (2008) Suspension microarrays for the identification of the response patterns in hyperinflammatory diseases. *Med Eng Phys* 30(8):976-983.
20. Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, et al. (2008) Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *J Biol Chem* 283(9):5296-5305.
21. Gille C, Leiber A, Spring B, Kempf VA, Loeffler J, et al. (2008) Diminished phagocytosis-induced cell death (PICD) in neonatal monocytes upon infection with *Escherichia coli*. *Pediatr Res* 63(1):33-38.
22. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, et al. (1997) Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med*. 25(8):1298-1307.



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

23. Wang ZQ, Orlikowsky T, Dudhane A, Trejo V, Hoffmann MK. (1998) Macrophages may activate or destroy T cells with which they form antigen- or coreceptor-mediated cellular conjugates. *Cell Immunol* 189:74-82.
24. Hotchkiss RS, Karl IE. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348(2):138-150.
25. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. (2006) Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 177(3):1967-1974.
26. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. (2000) Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1:S124-128.
27. Schroder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, et al. (2003) Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol* 170(10):5260-5267.
28. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, et al. (2004) IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 172(12):7603-7609.
29. van der Sluijs KF, Nijhuis M, Levels JH, Florquin S, Mellor AL, et al. (2006) Influenza-induced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances interleukin-10 production and bacterial outgrowth during secondary pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 193(2):214-222.
30. Cavillon JM, Pitton C, Fitting C. (1994) Endotoxin tolerance is not a LPS-specific phenomenon: partial mimicry with IL-1, IL-10 and TGF-beta. *J Endotoxin Res* 1:21-29.
31. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, et al. (1995) Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 181(5):1887-1892.
32. Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, et al. (1998) IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 101(4):783-794.



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

33. Wyant TL, Tanner MK, Sztejn MB. (1999) Potent immunoregulatory effects of *Salmonella typhi* flagella on antigenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 67(3):1338-1346.
34. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, et al. (2002) Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2):972-977.
35. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, et al. (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1503-1508.
36. Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, et al. (2001) Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 31(11):3153-3164.
37. Sun K, Metzger DW. (2008) Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med* 14(5):558-564.
38. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. (2009) Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 458(7234):78-82.
39. Evans HG, Suddason T, Jackson I, Taams LS, Lord GM. (2007) Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43):17034-17039.
40. Kolls JK, Linden A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21(4):467-476.
41. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28(4):454-467.
42. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y. (2007) Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-1/IL17 production. *J Immunol* 178(7):4466-4472.
43. Neely CJ, Maile R, Wang MJ, Vadlamudi S, Meyer AA, Cairns BA. (2011) Th17 (IFN γ -IL17+) CD4+ T cells generated after burn injury may be a novel cellular mechanism for postburn injuries. *J Trauma* 70:681-690.



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

44. Pitts LR, Simpson SQ. (2010) From mice to men: systematic reviews of animal data could make sepsis trials safer and more productive. *Crit Care Med* 38(12):2420-2422.
45. Shultz L, Ishikawa F, Greiner DL. (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7:118-130.
46. Manz MG. (2007) Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26(5):537-541.
47. Legrand N, Ploss A, Balling R, Becker PD, Borsotti C, et al. (2009) Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* 6(1):5-9.
48. Unsinger J, McDonough JS, Shultz LD, Ferguson TA, Hotchkiss RS. (2009) Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in "humanized" mice. *J Leukoc Biol* 86(2):219-227.
49. Libby SJ, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, McClelland M, et al. (2010) Humanized nonobese diabetic-scid IL2rgammanull mice are susceptible to lethal Salmonella Typhi infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35):15589-15594.
50. Andre MC, Erbacher A, Gille C, Schmauke V, Goecke B, et al. (2010) Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J Immunol* 185(5):2710-2720.
51. Strowig T, Chijoke O, Carrega P, Arrey F, Meixlsperger S, et al. (2010) Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence. *Blood* 116(20):4158-4167.
52. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, et al. (2009) The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* 21:843-858.
53. Chen Q, Khoury M, Chen J. (2009) Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51):21783-21788.



**Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell
vorstimulierter Monozyten**

54. Gille C, Orlikowsky T, Spring B, Hartwig UF, Wilhelm A, Wirth A, Goecke B, Handgretinger R, Poets CF, André MC. (2012) Monocytes derived from humanized neonatal NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice are phenotypically immature and exhibit functional impairments. *Hum Immunol* Jan 31 [Epub ahead of print].

55. André MC, Gille C, Glemser P, Woiterski J, Hsu HY, et al. Bacterial re-programming of PBMCs impairs monocyte phagocytosis and modulates adaptive T cell responses. *angenommene Publikation, J Leuk Biol*, 02/2012



Untersuchungen zur funktionellen Konversion bakteriell vorstimulierter Monozyten

ANHANG

Übersicht der in dieser Arbeit zitierten CD Moleküle

CD3	Komplex aus den invarianten Untereinheiten CD3 γ , δ oder ϵ und den dimeren ζ Ketten
CD4	Ko-Rezeptor für MHC Klasse II Moleküle
CD8	Ko-Rezeptor für MHC Klasse I Moleküle
CD11b/CD18	Untereinheiten von Mac-1, einem Komplement Rezeptor, welcher aus CD11b und CD18 besteht.
CD14	auf Monozyten exprimiertes Membranprotein, welches an LPS bindet
CD15	Adhäsionsmolekül, welches Phagozytose und Chemotaxis mediert
CD16	niedrig affiner Fc γ Rezeptor (Fc γ RIII), welcher u.a. auf Monozyten exprimiert wird
CD33	Marker mit unbekannter Funktion, welcher u.a. auf unreifen myeloiden Vorstufen exprimiert wird
CD36	Plättchen-assoziiertes Glykoprotein IV oder IIIb
CD45	Protein, welches auf allen hämatopoetischen Zellen ausser Erythrozyten exprimiert wird
CD64	Glykoprotein, welches als hoch-affiner Fc γ Rezeptor (Fc γ RI) an monomere IgG Antikörper bindet
CD80 und 86	Ko-stimulatorische Moleküle, welche auf Monozyten exprimiert werden und an das CD28 Molekül von T Zellen binden
CD206	C-Type Lektin Protein, welches im Rahmen der Pathogen Neutralisierung an komplexe Kohlehydratstrukturen bindet