Aus dem Institut für Neuropathologie

(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchung der Phagozytosefähigkeit humaner Vollblutleukozyten in Abhängigkeit von der Stimulation durch Gummi arabicum

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christin Freibrodt

aus Dessau

Göttingen 2025

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. R. Nau……

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. H. Eiffert……

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. R. Nau...…….

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer.nat. C. Lüder…….

Drittreferent/in: …..…….

Datum der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2025……

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der Phagozytosefähigkeit humaner Vollblutleukozyten in Abhängigkeit von der Stimulation durch Gummi arabicum" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Baien SH, Seele J, Henneck T, **Freibrodt C**, Szura G, Moubasher H, Nau R, Brogden G, Mörgelin M, Singh M, et al. (2020): Antimicrobial and Immunomodulatory Effect of Gum Arabic on Human and Bovine Granulocytes Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Front Immunol 10, 3119

Freibrodt C, Baien S, von Köckritz-Blickwede M, de Buhr N, Nau R, Seele J (2024): Gum Arabic Increases Phagocytosis of Escherichia coli by Blood Leukocytes of Young and Old Healthy Volunteers. Antibiotics 13, 482

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Phagozyten im Vollblut 1
1.1.1 Neutrophile Granulozyten 1
1.1.2 Monozyten und Makrophagen 2
1.1.3 Dendritische Zellen (DC) 3
1.2 Induktion des angeborenen Immunsystems 4
1.2.1 Praktische Anwendung im Versuch 8
1.3 Seneszenz des innaten Immunsystems 8
1.3.1 Altersassoziierte Erkrankungen 11
1.3.2 Sepsis 12
1.4 Gummi arabicum (GA) 13
1.5 Zielsetzung der Arbeit 15

2 Material und Methoden **17**

2.1 Geräte 17
2.2 Verbrauchsmaterialien 18
2.3 Chemikalien und Reagenzien 18
2.3.1 Bakterienstämme 21
2.3.2 Stimulanzien 22
2.4 Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden 22
2.4.1 Probengewinnung 23
2.4.2 Phagozytose-Assay 23
2.4.3 Färbung der lebenden und toten Zellen nach Ko-Inkubation mit Bakterien 27
2.4.4 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) 27
2.4.5 Statistik 31
2.4.6 Ethische Stellungnahme 31

3 Ergebnisse **32**

3.1 Unterschiede zwischen den Immunreaktionen junger und alter Probanden 32
3.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsinhibierung von *E. coli* K1 durch GA 32
3.3 Vitalitätsprüfung eukaryotischer Zellen nach GA-Zugabe 33
3.4 Stimulation der Phagozytose von Leukozyten junger Probanden durch GA 35
3.4.1 Intrazelluläre Gesamtzahl von *E. coli* K1 nach Abtötung extrazellulärer Bakterien 36
3.4.2 Einfluss von GA auf die intrazelluläre Abtötung von *E. coli* K1 36
3.4.3 Veränderung des Überlebensfaktors durch die Stimulation 37
3.4.4 Messung der Zytokinfreisetzung 38
3.5 Phagozytose Gram-positiver Bakterien nach GA-Stimulation 40
3.5.1 Gesamtzahl intrazellulärer Bakterien nach Stimulation 40

3.5.2 Einfluss von GA auf die Abtötung von *S. aureus* 42
3.5.3 Veränderung des ÜF von *S. aureus* durch GA 43
3.5.4 Darstellung des Einflusses von GA auf die Phagozytose 44
3.6 Reaktion von Leukozyten isoliert aus dem Blut alter Probanden auf die Stimulation mit GA 44
3.6.1 Phagozytose von *E. coli* K1 durch Leukozyten alter Probanden 45
3.6.2 Intrazelluläre Abtötung von *E. coli* 46
3.6.3 Einfluss der Stimulatoren auf den ÜF von *E. coli* 47
3.6.4 Ermittlung der Zytokinfreisetzung 48

4 Diskussion 50
4.1 Getestete Konzentrationen zeigen dosisabhängige Wirkung 50
4.2 Phagozytose-Assay gibt erste Anhaltspunkte 51
4.3 CpG als Positivkontrolle im jungen Probanden 52
4.4 GA beeinflusst die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von *E. coli* 53
4.5 Extrazelluläre Abtötung von *S. aureus* durch GA beeinflusst 54
4.6 Bisherige Erkenntnisse, zukunftsträchtige und vielversprechende Ideen 55

5 Zusammenfassung 57

6 Literaturverzeichnis 58
6.1 Literaturquellen 58
6.2 Internetquellen 64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Phagozytose-Assays 24
Abbildung 2: Darstellung der einzelnen Mittelwerte phagozytierter Bakterien durch Blutleukozyten junger Probanden unter Verwendung unterschiedlicher GA-Konzentrationen (n=10)....33
Abbildung 3: prozentuale Darstellung der vitalen eukaryoten Zellen nach Präinkubation mit 0,9% NaCl (Kontrolle) und 20mg/ml GA und anschließender Ko-Inkubation mit Bakterien....34
Abbildung 4: Morphologie lebender, mit GA stimulierter, Leukozyten, in PBS aufgenommen und mit Trypanblau angefärbt 34
Abbildung 5: Phagozytose von *E. coli* nach 30minütiger Gentamicinbehandlung, 2h Präinkubation mit 0,9% NaCl als Kontrolle, 10µg/ml CpG als Positivkontrolle und 20mg/ml GA (n=11, Probanden 20-35 Jahre) 35
Abbildung 6: Intrazelluläre Gesamtzahl der Bakterien 60min nach Zugabe von Gentamicin (n=11, Probanden 20-35 Jahre) 36
Abbildung 7: Abtötung von *E. coli* 30min nach Gentamicinzugabe nach vorheriger Stimulation. 37
Abbildung 8: Überlebensfaktor von *E. coli* nach Stimulation berechnet t_{30}/t_0. t_0 als Zeitpunkt, an dem *E. coli* zum Blut hinzugefügt wurde, t_{30} nach 30min Ko-Inkubation 38
Abbildung 9: ELISA Standardkurve bei der Messung von IL-1ß 39
Abbildung 10: Intrazelluläre KBE/ml von *S. aureus* USA300 nach Gentamicinbehandlung durch GA-vorbehandelte Vollblutleukozyten (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre)....41
Abbildung 11: Intrazelluläre KBE/ml von *S. aureus* Newman nach Gentamicinbehandlung durch GA-vorbehandelte Vollblutleukozyten (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre)....41
Abbildung 12: Abgetötete Bakterien nach Ko-Inkubation mit *S. aureus* USA300 und Behandlung mit Gentamicin (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre) 42
Abbildung 13: Abgetötete Bakterien nach Ko-Inkubation mit *S. aureus* Newman und Behandlung mit Gentamicin (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre). 43
Abbildung 14: Überlebensfaktor von *S. aureus* nach GA-Vorbehandlung, wie folgt berechnet ÜF=t_{30}/t_0. t_0 als Zeitpunkt an dem *S. aureus* zum Blut hinzugefügt wurde, t_{30} nach 30min Ko-Inkubation 43
Abbildung 15: Prozentuale Phagozytose-Rate von *S. aureus*....44
Abbildung 16: Phagozytose von *E. coli* nach 30minütiger Gentamicinbehandlung, 2h Präinkubation mit 0,9% NaCl als Kontrolle, 10µg/ml CpG als Positivkontrolle und 20mg/ml GA (n=12, Probanden >80 Jahre) 45
Abbildung 17: intrazelluläre Konzentration von *E. coli* in 30-210min nach Gentamicinzugabe nach vorheriger GA-Inkubation....46
Abbildung 18: Überlebensfaktor *E. coli*....47
Abbildung 19: IL-6 Konzentration in pg/ml im ELISA gemessen (n=10, alte Probanden >80 Jahre) 48
Abbildung 20: TNF-α Konzentration in pg/ml im ELISA gemessen (n=10, alte Probanden >80 Jahre)....49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: innate Immunabwehr durch TLRs (Murphy und Weaver 2018) 5
Tabelle 2: Effekte des Alterungsprozesses auf das innate Immunsystem 11
Tabelle 3: Geräte 17
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien 18
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien 18
Tabelle 6: Bakterienstämme 21
Tabelle 7: Stimulanzien 22
Tabelle 8: ELISA-Messung TNF-α im Serum junger Probanden nach Stimulation 39
Tabelle 9: ELISA-Messung IL-6 im Serum junger Probanden nach Stimlation 39
Tabelle 10: ELISA-Messung IL-6 im Serum alter Probanden 48
Tabelle 11: ELISA-Messung TNF-α im Serum alter Probanden 49

Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
AIM	*absent-in-melanoma*
ALRs	*absent-in-melanoma-like receptors*
ANOVA	Varianzanalyse
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ARG	*autophagy-related gene*
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BE	Blutentnahme
BHI	*brain heart infusion*
CD	*cluster of differentiation*
CLRs	*c-type lectin-like receptors*
COS	*coloumbia sheep blood-agar*
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin-Dinukleotid
DAMPs	*damage-associated molecular patterns*
DC	Dendritische Zellen
DMEM	*dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	*dulbecco's phosphate buffered saline*
E. coli	*Escherichia coli*
eCB	endocannabinoid
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FCS	*fetal calf serum*
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
GA	Gummi arabicum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILCs	angeborene lymphatische Zellen
iNKT	invariante *natural killer t-cell*
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	*interferon response factor*

KBE	koloniebildende Einheiten
cDCs	konventionelle (klassischen) dendritische Zellen
LB	*lysogeny broth*
LBA	*Lactobacillus acidophilus*
LBP	*Lactobacillus plantarum*
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	leucinreiche Wiederholungen
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MAL	*My88 adaptor-like*
MDA5	*melanoma differentiation antigen 5*
MHC-II	*major histocompatibility cmplex* Klasse-II
MIP	*macrophage inflammatory protein*
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleäres Phagoztensystem
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
MyD88	myeloischer Differenzierungsfaktor 88
NaCl	Natriumchlorid-Lösung
NETs	*neutrophil extracellular traps*
NF-κB	*nuclear factor* κB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLRs	*NOD-like receptors*
NOD	*nucleotide-binding and oligomerization domain*
ODN	Oligodesoxynucleotid
Pam_3CSK_4	$Pam_3CysSerLys_4$
PAMPs	*pathogen-associated molecular patterns*
PBMC	*peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*phosphate buffered saline*
pDCs	Plasmacytoide dendritische Zellen
PEA	Palmitoylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PGE_2	Prostaglandin E_2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Poly I:C	*polyinosinic:polycytidylic acid*
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-α
PRR	*pattern recognition receptors*
RANTES	*regulated and normal T cell expressed and secreted*
RIG-I	*retinoic acid inducible gene-I*

RLR	*retinoic acid inducible gene-I-like receptor*
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SASP	*senescence-associated secretory phenotype*
SIRS	systemisch inflammatorische Wirtsreaktion
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TIRAP	*TIR-containing adaptor protein*
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*
TRIF	*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β*
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
ÜF	Überlebensfaktor
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Phagozyten im Vollblut

Phagozyten sind spezialisierte Zellen, welche nach dem Eindringen von Mikroorganismen und der Vermehrung dieser im Wirtsgewebe die *first line of defence* darstellen und eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen und Pilzerkrankungen spielen. Monozyten und Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen bilden hierbei, als Teil des angeborenen Immunsystems, die Hauptgruppen (Murphy und Weaver 2018). Ihre Aufgaben gliedern sich in die Rekrutierung anderer Zellen zum Ort der Infektion durch direkten Kontakt oder die Sekretion von Cytokinen, die Erkennung und Aktivierung durch Antigene, die Phagozytose und die Zerstörung der Mikroorganismen auf (Abbas et al. 2015).

1.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet, bilden die größte Gruppe der Leukozyten und zeigen die stärkste phagozytotische Aktivität aller Granulozyten. Stimuliert vom Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und vom Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) werden bei einem Erwachsenen bis zu $1x10^{11}$ Neutrophile pro Tag im Knochenmark produziert, welche dann entweder für einige Stunden bis Tage im Blut zirkulieren oder im Rahmen einer Infektion in das Gewebe migrieren. Dort bleiben sie für ein bis zwei Tage funktionstüchtig (Abbas et al. 2015) und werden nach der Apoptose von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert (Kolaczkowska und Kubes 2013). Während des Reifungsprozesses bilden sich ab dem Stadium des Promyelozyten im Zytoplasma drei unterschiedliche Typen von neutrophilen Granula, welche jeweils mit unterschiedlichen pro-inflammatorischen Proteinen gefüllt sind. Die azurophilen (primären) Granula beinhalten Myeloperoxidase (MPO) und mikrobizide Substanzen wie Defensin und Cathelicidin; spezifische (sekundäre) Granula enthalten Lactoferrin, Lysozyme, Kollagenase, Elastase und Gelatinase, und (tertiäre) Granula Matrix Metalloproteinase 9, auch Gelatinase B genannt (Kolaczkowska und Kubes 2013; Abbas et al. 2015). Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, Pathogene mittels der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), einem NADPH-Oxygenase-abhängigen Mechanismus, antibakterieller Proteine, wie Cathepsin, Defensin, Lactoferrin und Lysozyme, und der Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) zu eliminieren (Kolaczkowska und Kubes 2013). Während die ROS

intrazellulär im Phagolysosom wirken, können die antibakteriellen Proteine gleichfalls sowohl nach intrazellulär als auch nach extrazellulär abgegeben werden. NETs werden von aktivierten neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum freigesetzt, um Pathogene zu immobilisieren und somit deren Ausbreitung zu verhindern und die anschließende Phagozytose dieser zu erleichtern. NETs besitzen einen Kern aus DNA neutrophiler Granulozyten, an dem Histone und Proteine mit enzymatischer Aktivität wie Lactoferrin und Cathepsin G anhängen, mit welchen sie Pathogene angreifen und abtöten (Kolaczkowska und Kubes 2013).

1.1.2 Monozyten und Makrophagen

Frei zirkulierende Monozyten und gewebespezifische Makrophagen bilden gemeinsam mit den dendritischen Zellen das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) (Lavoie und Levy 2017). Makrophagen können entweder aus Vorläuferzelle, welche während der Embryonalentwicklung im Dottersack, in der fetalen Leber oder in der Region des Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) ihren Ursprung haben, oder aus zirkulierenden Monozyten entstehen (Murphy und Weaver 2018). Abhängig vom Organ, in das sie einwandern, vermutet man bei Makrophagen organabhängige Spezialisierungen. Beispiele hierfür sind die Kupffer-Zellen in der Leber, sinusoidale Makrophagen in der Milz, Alveolarmakrophagen in der Lunge, Histiozyten im Bindegewebe und Mikrogliazellen im Gehirn (Abbas et al. 2015). Gewebemakrophagen haben mehrere wichtige Funktionen im innaten und adaptiven Immunsystem. Ihre Hauptfunktion besteht in der Verteidigung des Körpers gegen Mikroorganismen durch deren Erkennung, Phagozytose und Abtötung und der gleichzeitigen Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche und damit einhergehenden T-Zellaktivierung. Auch tote Wirtszellen nach Trauma oder Ischämie sowie neutrophile Granulozyten, welche am Ort der Infektion akkumulieren, werden im Rahmen des Aufräumprozesses ingestiert. Makrophagen fördern die Reparatur geschädigter Blutgefäße, erkennen apoptotische Zellen, bevor diese eine Immunreaktion verursachen, und sind durch Cytokinsekretion zur Leukozytenrekrutierung fähig (Abbas et al. 2015).

Stimuliert vom Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) reifen Monozyten im Knochenmark heran und zirkulieren im Blut in Form zweier Hauptpopulationen (Murphy und Weaver 2018). 90% der zirkulierenden Monozyten sind „klassische“ Monozyten, welche sich durch ihre CD14-Expression ($CD14^{++}CD16^{-}$), die Bindung von Lipopolysacchariden und ihr Einwandern ins Gewebe während einer Infektion und der dortigen Differenzierung zu aktiven Entzündungsmonozyten und Makrophagen auszeichnen. Sie produzieren große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies sowie die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 und das Chemokin CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) als Reaktion auf Pathogene. Der kleinere Anteil besteht aus „patrouillierenden“ Monozyten. Im Gegensatz zu den „klassischen“ Monozyten rollen sie das

Endothel entlang, um so Verletzungen zu detektieren. Sie exprimieren CD14 und CD16 ($CD14^{+}CD16^{+}$), verlassen die Blutbahn nicht und können sich nicht zu Gewebemakrophagen differenzieren (Murphy und Weaver 2018). Sie können in zwei weitere Subtypen unterschieden werden: den intermediären Monozyten mit hoher CD14 und niedriger CD16 Expression ($CD14^{++}CD16^{+}$), welche in hohem Maße reaktive Stickstoffspezies (RNS), IL-1β und TNFα produzieren, und den nicht-klassischen Monozyten mit niedriger CD14 und hoher CD16 Expression ($CD14^{+}CD16^{++}$), welche TNF-α, IL-1β und CCL3 als Reaktion auf Viren sekretieren (Metcalf et al. 2017, Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Monozyten unterscheiden sich in einigen Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten. So sind sie während ihrer gesamten Lebenszeit in der Lage, Granula durch stetige Proteinsynthese zu produzieren und migrieren langsamer zum Ort der Infektion, verbleiben dafür aber dort länger. Auch ist ihr oxidativer *Burst* weniger aggressiv, aber dafür mit einem breiteren Angriffsspektrum pathogener Keime. Unabhängig von einer inflammatorischen Reaktion des Immunsystems auf einen Stimulus exprimieren Monozyten permanent den IgG-Rezeptor FcγRI (CD64), welcher die Endozytose, Phagozytose, Antigenpräsentation, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung und die Bildung von Superoxiden reguliert (Human Fc gamma RI/CD64 Antibody 2022). Toll-like Rezeptoren (TLR), eine Klasse von Pattern-Recognition-Rezeptoren, treten im höheren Maße auf, als es bei Neutrophilen der Fall ist (Dale et al. 2008).

1.1.3 Dendritische Zellen (DC)

Wie gewebsspezifische Makrophagen und frei zirkulierende Monozyten sind dendritische Zellen Teil des MPS (Lavoie und Levy 2017). Durch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APC) spielen sie bei der Aktivierung von T-Zellen eine bedeutende Rolle (Abbas et al. 2015). Sie können Antigene aufnehmen, prozessieren und mittels MHC-Moleküle präsentieren (Bagadia et al. 2019). Es lassen sich zwei funktionelle Haupttypen unterscheiden, welche im Knochenmark aus Vorläuferzellen mit myeloischem Potenzial entstehen. Die konventionellen (klassischen) dendritischen Zellen (cDCs) stellen mit ihrer Fähigkeit der Peptidantigenproduktion prozessierter Mikroorganismen und der anschließenden T-Zellaktivierung ein Bindeglied zwischen dem innaten und humoralen Immunsystem dar (Murphy und Weaver 2018). Die Klasse der cDCs kann weiterhin in zwei Subpopulationen unterteilt werden. cDC1 aktivieren mittels proinflammatorischer Cytokine, wie z.B. IL-12, T_H1-Zellen und rufen somit eine Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger, wie z.B. *Toxoplasma gondii,* hervor. Ebenfalls unterstützen sie die IFN-γ Produktion durch die Aktivierung invarianter *Natural killer t-cells* (iNKT). cDC2 sind an der Bekämpfung parasitärer Organismen, extrazellulärer Erreger und Pilze beteiligt (Bagadia et al. 2019). Plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) hingegen spielen bei

Virusinfektionen eine wesentliche Rolle. Durch TLR-7 und 9 auf der Zelloberfläche und den intrazellulären *retinoic acid inducible gene-I-like receptors* (RLR) *retinoic acid inducible gene-I* (RIG-I) und *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5) sind sie in der Lage, Nukleinsäuren intrazellulärer Viren zu erkennen. Es kommt zur Produktion antiviraler Cytokine, sogenannter Typ-I-Interferone (Abbas et al. 2015), eine Antwort zytotoxischer T-Zellen wird unterstützt und NK-Zellen werden aktiviert (Bagadia et al. 2019).

1.2 Induktion des angeborenen Immunsystems

Das innate Immunsystem stellt die *first-line of defence* gegen mikrobielle Infektionen dar. Seine Aufgabe besteht in der Erkennung molekularer Strukturen und Zellbestandteile von Pathogenen, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) sowie körpereigener, intrazellulär vorkommender Moleküle, welche bei einer Zellschädigung in den Extrazellulärraum gelangen, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), und einer anschließenden inflammatorischen Immunantwort. Diese Fähigkeit ist mittels verschiedenster zellulärer *pattern recognition receptors* (PRR) möglich, welche sich an der Zelloberfläche, in Vesikeln oder frei im Zytosol innater Immunzellen wie neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen, aber auch bei nicht-spezialisierten Zellen wie Epithel- und Endothelzellen finden (Abbas et al. 2015). Derzeit sind fünf verschiedene PRR-Klassen bekannt. Tabelle 1 zeigt einen Überblick der größten Klasse, der TLRs, ihrer Verteilung unter hämatopoetischen Zellen und den zugehörigen Liganden mit Ursprung. Zu den vier anderen Klassen gehören die RLRs, *absent-in-melanoma* (AIM)*-like receptors* (ALRs) und *NOD-like receptors* (NLRs), alles intrazelluläre Rezeptoren, sowie die *C-type lectin-like receptors* (CLRs), welche ebenfalls wie die TLRs zu den Transmembranrezeptoren gehören (Kim et al. 2016).

Tabelle 1: innate Immunabwehr durch TLRs (Murphy und Weaver 2018)

TLRs	**Zellen**	**Ligand**	**Ursprung des Liganden**
TLR-1:TLR-2-Heterodimer TLR2:TLR6-Heterodimer	Monozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, Eosinophile und Basophile	Diacyllipoprotein, Triacyllipopretein, Lipomannane, Lipoteichonsäuren, β-Glucane, Zymosan, HSPs, HMGB1, Pam_3CSK_4	Bakterien, Viren, Parasiten, körpereigen
TLR-3	Makrophagen, dendritische Zellen, Darmepithel	dsRNA, Poly I:C	Viren
TLR-4 (mit MD-2 und CD14)	Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Eosinophile	LPS, Lipoteichonsäuren, HSPs, HMGB1	Bakterien, körpereigen
TLR-5	Makrophagen, dendritische Zellen, Darmepithel	Flagellin	Bakterien
TLR-7 TLR-8	Makrophagen, plasmacytoide dendritische Zellen, Neutrophile, Eosinophile, B-Zellen	ssRNA	Viren
TLR-9	plasmacytoide dendritische Zellen, Eosinophile, Basophile, B-Zellen	CpG-DNA	Bakterien, Viren
TLR-10	plasmacytoide dendritische Zellen, Eosinophile, Basophile, B-Zellen	Unbekannt	Unbekannt

Desoxyribunukleinsäure (DNA), doppelsträngige-RNA (dsRNA), einzelsträngige-RNA (ssRNA), Lipopolysaccharid (LPS), *heat shock proteins* (HSPs), *high-mobility group box 1* (HMGB1), Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid (CpG), *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly I:C), $Pam_3CysSerLys_4$ (Pam_3CSK_4)

TLRs sind Transmembranproteine, welche extrazellulär 18-25 leucinreiche Wiederholungen (LRR) und im Zytoplasma eine Toll-IL-1-Rezeptor-(TIR)Domäne besitzen, worüber durch eine ligandeninduzierte Dimerisierung die intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Die TIR-Domänen sind anschließend in der Lage mit den Domänen von Adaptermolekülen im Zytoplasma zu interagieren, welche die Signalübertragung auslösen. Es werden vier Adaptermoleküle unterschieden: myeloischer Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), *My88 adaptor-like* (MAL) bzw. *TIR-containing adaptor protein* (TIRAP), *TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Bis auf TLR-3, welches TRIF nutzt, treten alle TLRs mit MyD88 in Wechselwirkung, ob allein oder in Kombination mit MAL. TLR-4 interagiert zusätzlich noch mit TRIF/TRAM, welches für die endosomalen Signale verantwortlich ist. Die Signale der TLRs führen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor κB* (NF-κB) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) sowie des *interferon response factors* 3 (IRF3) und 7, welche die Transkription inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ-I-Interferone aktivieren (Abbas et al. 2015). Während die meisten TLRs über ihre Interaktion mit MyD88 NF-κB aktivieren und somit eine antibakterielle Reaktion auslösen, agiert TLR-3 über TRIF, was zu einer Phosphorylierung von IRF3 führt, welches wiederum durch die anschließende Expression von Typ-I-Interferonen eine antivirale Antwort zur Folge hat. Durch seine Bindung an TRIF aktiviert TLR-4 ebenfalls diesen Signalweg, aber die hervorgerufene Reaktion ist im Vergleich zu der von TLR-3 relativ schwach (Murphy und Weaver 2018). TLR-4 steht zusätzlich mit MyD88 in Kontakt. Ähnlich verhält es sich bei den endosomalen TLR-7 und TLR-9. Diese sind, neben dem MyD88-abhängingen Signalweg, über einen TRIF-unabhängigen Signalweg in der Lage, IRF7 zu phosphorylieren und somit gleichermaßen eine antivirale Immunreaktion zu induzieren (Lim und Staudt 2013).

Die CLRs als weitere Gruppe membrangebundener Rezeptoren erkennen Kohlehydrate auf der Oberfläche von Viren, Bakterien und Pilzen. Sie stimulieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine, unterstützen die Phagozytose oder hemmen TLR-vermittelte Immunkomplexe (Takeuchi und Akira 2010, Abbas et al. 2015).

Durch die Erfassung und Bindung viraler ssRNA, dsRNA und RNA-DNA-Heteroduplexe im Zytosol lösen RLRs als intrazellulär vorkommende PRRs die Aktivierung von IRF3, IRF7 und NF-κB aus. Die Produktion von Typ-I-Interferonen wird induziert und es kommt zur Förderung einer antiviralen Immunantwort (Abbas et al. 2015, Brisse und Ly 2019).

NLRs können in vier funktionale Gruppen eingeteilt werden: sie vermitteln die Fähigkeit zur Inflammasombildung, Signaltransduktion, Transkriptionsaktivierung und Autophagie. Die NLRs, welche als PRRs agieren, sind in der Lage, mikrobielle Produkte, wie z.B. Peptidogly-

kane, Flagellin und virale RNA, körpereigene, wie u.a. Adenosintriphosphat (ATP), Cholesterinkristalle und Uratkristalle, und körperfremde Substanzen bzw. Umwelteinflüsse, wie z.B. Asbest, Quarzstaub und UV-Einstrahlung, zu erkennen und entsprechend ihrer Funktion darauf zu reagieren (Kim et al. 2016). Im Rahmen der Pathogenese von Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, geht man bei gewissen *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD)2 Gen-Polymorphismen von einem erhöhten Risiko aus. Diese führen zu einem fehlerhaften Erkennen pathogener Keime, was eine fehlgesteuerte Immunreaktion im Darm auf Grund der natürlichen Darmflora zur Folge hat (Abbas et al. 2015).

Neben den genannten Rezeptoren gibt es eine Reihe weiterer Sensoren, welche auf verschiedensten Wegen bakterielle, virale oder fungoide Bestandteile erkennen und entsprechend ihrer Funktion darauf reagieren (Abbas et al. 2015).

Eine unmittelbare Reaktion des Immunsystems auf ein Pathogen ist die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Zytokine sind kleine Signalproteine, welche durch autokrine, parakrine und endokrine Sekretion die zelluläre Aktivität im Rahmen von Infektion, angeborener und adaptiver Immunantwort, Autoimmunität, Entzündung und Malignität stimulierend oder inhibierend beeinflussen. Abhängig vom Stimulus definieren sie so die Art der Immunantwort, ob humoral, zellvermittelt, zytotoxisch, immunsuppressiv oder allergisch (Baldo 2014). Zytokine können auf Grundlage ihrer Struktur in mehrere Familien eingeteilt werden: die Hämatopoetinsuperfamilie, IL-1- Familie, TNF-Familie und Interferone. Auch Chemokine, eine Gruppe chemotaktisch aktiver Zytokine, spielen in der ersten Phase einer Infektion eine große Rolle. Ebenso wie bei Zytokinen lassen sich strukturbedingte Gruppen unterscheiden: die CC-Chemokine und CXC-Chemokine. Durch den von ihnen induzierten Signalweg kommt es zu einer Veränderung der Zelladhäsion und des Zytoskeletts von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Sie ermöglichen so eine gerichtete Bewegung von Leukozyten entlang eines ansteigenden Chemokingradienten zum Infektionsherd hin. Außerdem stabilisieren sie durch eine Konformationsänderung der leukozytären Integrine die Rollbewegung entlang des Gefäßendothels, sodass die rekrutierten Zellen dieses passieren können. Abhängig von der örtlichen Begrenzung der Infektion und der einhergehenden Zytokinfreisetzung kommt es im Organismus zu einer akuten Immunantwort, welche entweder lokal begrenzt oder generalisiert abläuft, und gleichermaßen zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems führt. In der frühen Infektionsphase sind die angeborenen lymphatischen Zellen (ILCs), zu denen auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gehören, zu erwähnen, zu deren Aufgaben die Verstärkung der Signale der angeborenen Immunerkennung gehört (Murphy und Weaver 2018).

1.2.1 Praktische Anwendung im Versuch

In dieser Arbeit wird mit Stoffen gearbeitet, die als Stimulatoren auf das Immunsystem wirken. LPS, CpG, Poly I:C und Pam_3CSK_4 wurden bereits in Tabelle 1 aufgeführt, auf Gummi arabicum (GA) wird im Verlauf eingegangen.

Eine weitere Substanz, welche zum Einsatz kommt, ist Palmitoylethanolamin (PEA), ein bioaktives Lipidmolekül, das in tierischem und pflanzlichem Gewebe vorkommt (Impellizzeri et al. 2016) und für seine antiinflammatorischen, analgetischen und neuroprotektiven Eigenschaften bekannt ist (Esposito und Cuzzocrea 2013, Impellizzeri et al. 2017). Es wird als endocannabinoid (eCB)-ähnliche Verbindung gesehen, deren Effekte unter anderem durch die Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR)-α (Redlich et al. 2014) vermittelt sind. Außerdem kommt es durch seinen auto- und parakrinen Einfluss zu einer Herabregulation von Mastzellen (Impellizzeri et al. 2017). Heide et al. konnten 2018 in ihren Versuchen den prophylaktischen Nutzen PEAs bei Infektionen alter Mäuse nachweisen. Hierbei wurden 18-19 Monate alte Mäuse intraperitoneal mit PEA behandelt und anschließend intrazerebral mit *Escherichia coli (E. coli)* K1 (Serotyp O18:K1:H7) infiziert, um eine Meningitis hervorzurufen. Die mit PEA behandelten Mäuse zeigten eine längere Überlebenszeit, eine geringere Ausbreitung der Bakterien im gesamten Organismus und eine verringerte Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Arachidonsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur mit der Trägersubstanz, NaCl mit 0,47-0,55% DMSO, vorbehandelt wurde. Diese Publikation ist eine von mehreren, die die oben aufgelisteten Wirkungen von PEA beschreiben und somit zur Entscheidung beitrug, diesen Stimulator in die Arbeit mit einzubringen.

1.3 Seneszenz des innaten Immunsystems

Assoziiert mit dem Alterungsprozess des Menschen ist die verminderte Fähigkeit des Immunsystems, adäquat auf Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Viren zu reagieren. Dieser komplexe Prozess der Immunoseneszenz beeinflusst sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem gleichermaßen, wobei dieser Begriff primär in Bezug auf die veränderte Funktion von Lymphozyten genannt wird (Fulop et al. 2004). So kann ein Rückgang naïver T-Zellen auf Grund der Involution des Thymus, eine Verringerung von Gedächtnis-T-Zellen und der B-Zellproduktion auf Seiten des humoralen Arms beobachtet werden. Diese Veränderungen äußern sich in einer fehlerbehafteten Immunantwort auf einen Krankheitserreger (Butcher et al. 2001) und einem chronisch inflammatorischen Zustand, auch als „*inflamm-aging*“ bezeichnet (Gomez et al. 2008). Dieser Zustand entsteht, wenn seneszente Zellen ein proin-

flammatorisches Programm, einen sogenannten *senescence-associated secretory phenotype* (SASP), aktivieren, dessen Ziel die immun-vermittelte Säuberung alternder Zellen ist. Im alternden Organismus überträgt sich allerdings die Seneszenz gleichzeitig auf Nachbarzellen, wodurch es zum Status der geringgradigen chronischen Inflammation kommt (Prattichizzo et al. 2016).

Auf Seiten des angeborenen Immunsystems zeigten Butcher et al. 2001 einen Einfluss des Alters auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. Es konnte eine Reduktion der Phagozytoseleistung auf Grund einer geringeren Expression von CD16 auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten von Personen über 65 Jahren auch nach Infektion mit *E. coli* festgestellt werden. Des Weiteren war der prozentuale Anteil phagozytosefähiger neutrophiler Granulozyten im Vergleich zum Anteil junger Probanden (23-35 Jahre) um ca. 10% und der Phagozytose-Index um 50% reduziert. Ursächlich wird von einer verringerten intrazellulären Calcium-Konzentration nach Stimulation mit N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP), einem chemotaktischen Peptid (Abernathy et al. 1996), welches bei Prokaryonten (Aas et al. 1996), nicht aber bei Eukaryonten auftritt, ausgegangen. Neutrophile Granulozyten weisen im Alter eine erhöhte Anfälligkeit für einen spontanen apoptotischen Tod auf Grund der funktionellen Beeinträchtigung von Stimulatoren, wie Lipopolysacchariden, G-CSF, GM-CSF und Interleukin-6 (IL-6), auf, welche im gesunden Organismus für die Verzögerung der Apoptose zuständig sind. Ihre absolute Zahl im Blut bleibt unbeeinflusst (Castelo-Branco und Soveral 2014). Der Einfluss auf die Apoptose und das veränderte Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der bcl-2 Familie zusammen mit einer fehlerhaften Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs führen auch hierbei zum Zustand der chronischen Inflammation, welcher bei Personen des höheren Alters beobachtet werden kann (Gomez et al. 2008). Entgegen der erniedrigten Phagozytoseleistung stehen die Ergebnisse von Butcher et al. 2001, bei der die ROS-Bildung isolierter neutrophiler Granulozyten nach fMLP-Stimulation bei alten Probanden höhere Werte als bei jungen Probanden zeigte. Auf Grund der geringfügig erhöhten Werte konnten diese nicht durch ein *fMLP-priming* erklärt werden, sondern lediglich aufzeigen, dass ein wichtiger Mechanismus der Abtötung von Pathogenen im Alter nicht verloren geht. Andere Studien zeigen gegensätzliche Ergebnisse (Di Lorenzo et al. 1999). Unterschiedliche Stimulatoren und der Einsatz von entweder Gram-positiven oder Gram-negativen Bakterien können hierfür verantwortlich sein (Gomez et al. 2008). Xu et al. 2017 sehen insbesondere die verringerte ROS-Produktion als Ursache für eine niedrigere NETs Bildung sowohl nach Stimulation mit LPS als auch mit TLR2-Liganden. Eine Assoziation mit einer funktionseingeschränkten Autophagozytose auf Grundlage eines erniedrigten *Autophagy-Related Gene* (ARG) 5 und eines erhöhten *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Levels wird angenommen. Durch die reziproke Regulation von Autophagozytose und Apoptose kommt es mit der Herunteregu-

lation der ersten zur kompensatorischen Hochregulation der zweiten. Fulop et al. 2004 untersuchten auf Grund kontradiktorischer Daten den Einfluss des Alterns auf die Chemotaxis und konnten einen negativen Einfluss nach Stimulation mit fMLP und GM-CSF auf Grund der veränderten Membranfluidität beweisen.

Weitere Studien zeigen altersbedingte Veränderungen in Makrophagen. Während die Anzahl an frei zirkulierenden Monozyten unverändert bleibt, kommt es bei Makrophagen im Knochenmark zu einer Verringerung der Zellularität mit erhöhter Apoptoserate (Gomez et al. 2008). Herrero et al. 2002 beobachteten eine reduzierte Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche von Makrophagen alter Mäuse nach Ko-Inkubation mit Interferon (IFN) –γ, wodurch die Antigenpräsentation eingeschränkt ist. Ursächlich geht man von einer Überproduktion von Prostaglandin E_2 (PGE_2) als Konsequenz einer erhöhten Cyclooxygenase (COX)-Aktivität aus (Wu et al. 2001). Entgegen der Annahme, dass sich die Cytokinproduktion verringert, zeigten sich in einigen *in vitro*-Studien gegenteilige Ergebnisse. Trotz einer fehlerbehafteten TLR1/2-induzierten TNF-α und IL-6 Produktion waren die im Immunoassay gemessenen Level dieser und anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8, *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES) und *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP) 1α nach Stimulation mit LPS erhöht, IL-1β, CCL8 und CCL20 hingegen zeigten niedrigere Werte (Metcalf et al. 2017). Dies führt unter anderem zur reduzierten Migration der Immunzellen zum Ort der Infektion. Unterschiede zu Ergebnissen im Tiermodell können auf Differenzen in Spezies, Reifegrad der untersuchten Zellen oder des Versuchsaufbaus beruhen. *In vivo* zeigten sich gleiche Resultate im Sinne eines *„inflamm-aging"* sowohl im Menschen als auch im Tier (zusammengefasst in Gomez et al. 2008). Wie neutrophile Granulozyten sind Makrophagen ebenfalls in der Lage, pathogene Keime mittels reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen des oxidativen Bursts und der Produktion zytotoxischer reaktiver Stickstoffspezies zu eliminieren. Während die Leistung des oxidativen Bursts geringer wird, somit die intrazelluläre Abtötung abnimmt und sich der Zeitraum der Infektion verlängert, gibt es bei der Stickstoffproduktion gegensätzliche Erkenntnisse. Durch unterschiedliche Versuchsaufbauten konnten in alten Mäusen sowohl erniedrigte als auch erhöhte PCR-gemessene mRNA induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Makrophagen nach LPS- und IFN-γ-Stimulation festgestellt werden (Chen et al. 1996, Khare et al. 1996).

Ebenfalls zeigen sich bei dendritischen Zellen altersbedingte Veränderungen. Diese sind durch veränderte Cytokin- und Chemokinsekretion, verringerte PRR-Expression auf der Zelloberfläche und die Unfähigkeit der Hochregulation ko-stimulatorischer Proteine nicht mehr in der Lage, T-Zellen optimal zu aktivieren (Plowden et al. 2004). Vielfache Publikationen zeigten die unterschiedlichen Alterationen dendritischer Zellen im Alter auf (Plackett et al. 2004, Agrawal

et al 2007a, Agrawal et al. 2007b, Agrawal et al. 2008, Agrawal und Gupta 2011, Gardner et al. 2017).

Tabelle 2: Effekte des Alterungsprozesses auf das innate Immunsystem

Beeinträchtigung der anatomischen Barrieren
↓ Anzahl der Langerhans-Zellen in der Epidermis
↓ Antigenerkennung durch DC
↑ Anzahl geringfunktionaler natürlicher Killer (NK) Zellen
↓ Überleben neutrophiler Granulozyten nach Stimulus
↓ Phagozytosefähigkeit und oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten
↓ Cytokinproduktion durch Makrophagen
↓ T-Zell Aktivierung durch Makrophagen

(Castelo Branco und Soveral 2014)

1.3.1 Altersassoziierte Erkrankungen

Der kombinierte Effekt aus dysfunktionalem Immunsystem, den Veränderungen des Hormonhaushalts, der Genetik und umweltbedingten Einflüssen beeinflusst die Kapazität des Organismus, auf Infektionen zu reagieren. Während die genetische Ausstattung nicht verändert werden kann, können hormonelle Veränderungen beeinflusst werden, um somit das gealterte Mikromilieu zu verändern. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Wandel der Sekretion von Sexualhormonen. Östrogen und Progesteron in geringen Dosen z.B. zeigten sich in Studien mit einem potenten anti-inflammatorischen Effekt, einer Verbesserung der systemischen und zellulären Immunantwort nach Traumata und einem verringerten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen einerseits. Andererseits sah man bei postmenopausalen Frauen mit einer Östrogenersatztherapie einen Anstieg jener kardiovaskulären Erkrankungen und einer erhöhten Prävalenz für Krebserkrankungen (North American Menopause Society 2007).

Der Zustand des *„inflamm-againg“*, charakterisiert durch einen geringgradigen chronisch-inflammatorischen Status, assoziiert mit einer erhöhten Mortalität und Invalidität alter Personen, ist ebenfalls als Ursache einer veränderten Immunantwort zu berücksichtigen (zusammengefasst in Gomez et al. 2008). Mit dem Wandel von Phagozyten des innaten Immunsystems und der Erhöhung zirkulierender pro-inflammatorischer Zytokine im Alter steigt die Anfälligkeit für akute und chronische Erkrankungen sowie die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Augenmerk dieser Arbeit liegt vor allem auf den akuten bakteriellen Infektio-

nen im höheren Lebensalter. Neben der Seneszenz des Immunsystems spielt auch die subtile oder atypische Präsentation der Symptome vieler lebensgefährdender Erkrankungen eine Rolle. Eine asymptomatische Bakteriurie ($\geq 10^5$ Keime/ml Urin), fehlendes Fieber oder eine nicht-spezifische bzw. atypische Klinik z.B. einer schweren Pneumonie stellen mit steigenden Lebensjahren keine Seltenheit dar. Durch die nachlassende Effektivität physikalischer Barrieren und Schutzreflexe, altersbedingter physiologischer Veränderungen und den Einsatz medizinischer Produkte, wie z.B. Blasendauerkatheter, zentraler- und peripherer Venenkatheter oder künstlicher Gelenkendoprothesen, können Pathogene eindringen und Infektionen in vorher geschützten Gebieten hervorrufen. In Kombination mit weiteren Komorbiditäten und Prädispositionen kommt es somit zu einem Grundzustand der Immunsuppression im alten Menschen (Liang 2016).

1.3.2 Sepsis

Die Deutsche Gesellschaft für Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin definiert Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird (Singer et al. 2016). Um per Definition von einer Sepsis sprechen zu können muss der Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation, sowie einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS) erfolgt sein. Entsprechend dessen muss weiterhin eine infektionsbezogene Organdysfunktion bestehen. Kommt es im Rahmen des Krankheitsbildes für mindestens 2 Stunden zu einem systolischen Blutdruck <90mmHg oder einem mittleren arteriellen Blutdruck <70mmHg, oder zum Einsatz von Vasopressoren, um den systolischen Blutdruck >90mmHg oder den arteriellen Mitteldruck >70mmHg zu halten, wird der Zustand als septischer Schock gewertet (Deutsche Sepsis-Gesellschaft: Sepsisdefinition).

Es wird nicht mehr zwischen einer Sepsis und einer schweren Sepsis unterschieden, da eine Sepsis per definitionem bereits ein schweres Krankheitsgeschehen darstellt. Ursächlich können Erregerbestandteile, wie Endo- und Exotoxine oder Zellwandkomponenten, und/oder Faktoren auf Patientenseite, wie z.B. Komorbiditäten, Immundysfunktion oder Fremdkörper, sein (Suerbaum et al. 2016). Der Großteil aller Sepsisfälle wird durch nosokomial erworbene bakterielle Infektionen ausgelöst, Pilzinfektionen und virale Infektionen stehen eher im Hintergrund. Abwehrlage und Grunderkrankung des Patienten sowie die Lokalisation des Sepsisherdes beeinflussen hierbei das Erregerspektrum. Während bei einer gesunden Immunabwehr die Infektion meist durch eine Keimart verursacht wird, kommt es bei immunsupprimierten Personen oft zu einer polymikrobiellen Infektion (Marre et al. 2000). Häufig besteht ein pulmonaler Fokus, gefolgt von Bakteriämien klaren Fokusses, z.B. ausgehend von den Harnwe-

gen, Gallenwegen oder zentralen bzw. peripheren Venenkatheter. Auch Bakteriämien ohne erkennbaren Fokus, besonders bei Asplenikern oder Patienten mit Agranulozytose oder sonstigen Immundefekten, stellen sich als klinische Herausforderung dar (Suerbaum et al. 2016).

Bei einer Sepsis kommt es zur Gewebeschädigung im Rahmen einer überschießenden, aber unzureichenden Immunreaktion des Organismus mit der Folge von Mikrozirkulationsstörungen und, im Extremfall, Nekrosen. Lokale Eiterherde können sich im Rahmen der Infektion ausbreiten und Mikroembolien verursachen oder sich als sekundäre Eiterherde manifestieren. Über das Gefäßendothel kommt es zur Gefäßdilatation und Gerinnungsaktivierung, welche den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, Protein C und S und das Entstehen von Blutungen zur Folge hat, was sich schlussendlich als Verbrauchskoagulopathie äußert. Parallel werden proinflammatorische Zytokine wie TNF-α und IL-1β freigesetzt, was im zweiten Schritt, etwas zeitversetzt, den Anstieg der Zytokine IL-6 und IL-8 nach sich zieht. IL-6 ist hierbei Teil der Akutephasereaktion, zu der auch weitere Proteine wie Procalcitonin, C-reaktives Protein, Fibrinogen, Ferritin und Serum-Amyloid-A gehören, welche bei einer allgemeinen Entzündungsreaktion erhöht messbar sind (Suerbaum et al. 2016).

Durch die Seneszenz des Immunsystems, die verlängerte Immunreaktion auf Pathogene und erhöhte Anfälligkeit gegenüber mikrobiellen Bestandteilen steigen die Inzidenz, der Schweregrad der Erkrankung und die einhergehende Mortalität der Sepsis bei Personen über 65 Jahren überproportional an. Lokale Entzündungsreaktionen generalisieren schneller und mit fulminanterem Verlauf für den Patienten. Das relative Risiko, an einer generalisierten Infektion zu erkranken, ist bei dieser Altersgruppe, verglichen mit Personen jüngeren Alters, um das 13fache erhöht. Das Alter des Patienten ist hierbei ein unabhängiger Risikofaktor, der die Mortalität beeinflusst. Diese liegt bei einer Sepsis zwischen 12,1 und 25,6%, bei einem septischen Schock zwischen 30 und 50% (Liang 2016).

1.4 Gummi arabicum (GA)

GA ist eine klebrige Flüssigkeit, welche aus dem Stamm und den Ästen von Acacia-Bäumen *(Acacia senegal* und *Acacia seyal)* im Sudan aus der Sahelzone, gewonnen wird. Das GA für die folgenden Versuche wurde aus *A. senegeal* im Kordofan im Westsudan gesammelt (Baien et al. 2020). Das Exsudat, ein komplexes Polysaccharid bestehend aus Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Uronsäure, ist eine Stressreaktion des Baumes auf äußere Einflüsse wie Hitze, Dürre oder Verletzungen. Auf Grund seines molekularen Aufbaus dient GA in der Lebensmittelindustrie als Emulgator zur Stabilisierung von Öl-in-Wasser-Emulsionen und Geschmackskonzentraten in Soft Drinks, als Stabilisator sprühgetrockneter Aromen in Trocken-

produkten sowie Tütensuppen oder Fertigbackmischungen (Gao et al. 2016c) und als Zusatzstoff u.a. in Süßwaren oder Rotwein (E 414 Gummi arabicum - Lexikon der Zusatzstoffe).

Auch im Bereich der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung präsentierte GA bereits positive gesundheitsbeeinflussende Effekte. So wurde bei einer Studie 2008 der probiotische Einfluss GAs auf gesunde Probanden untersucht und nachgewiesen. Bei einer täglichen Zufuhr von 10g GA in einem Zeitraum von 4 Wochen zeigte sich hier eine signifikante Zunahme von Bifidobakterien und Laktobazillen im Stuhl der jeweiligen Probanden, während die absolute Zahl von *Bacteroides species pluralis, Clostridioides difficile* und *Enterococci species pluralis* unbeeinflusst blieb (Calame et al. 2008). Des Weiteren zeigte GA eine hepatoprotektive Wirkung bei Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität durch die Verminderung der Bildung von Stickstoffmonoxid durch Paracetamol (Gamal el-din et al. 2003) und eine Verbesserung der Nierenfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz bei Ratten durch eine Verringerung der inflammatorischen Reaktion und des oxidativen Stresses (Al Za'abi et al. 2018), welches sich auch bei Sichelzellanämiepatienten bestätigte (Kaddam et al. 2017). Nicht nur bei einigen metabolischer Erkrankungen hat GA einen Einfluss auf den Verlauf, sondern auch das Wachstum von Bakterien im Rahmen von bakteriellen Besiedlungen und Infektionen wird beeinflusst. Auf Grund des Gebrauchs von GA bei vielen Völkern in Teilen Afrikas für die Mundhygiene untersuchte Clark et al. 1993 den Effekt auf das in *vitro*-Wachstum und die Proteaseaktivität periodontopathischer Bakterien. Hierbei zeigte sich bei einigen der genutzten Bakterienstämmen sowohl eine Wachstumshemmung als auch eine Reduktion der Proteaseaktivität durch ultraschallbehandeltes GA. Auch nach der Zugabe von GA zu Sauermilch in Anwesenheit von entweder *Lactobacillus acidophilus* (LBA) oder *Lactobacillus plantarum* (LBP) konnte insbesondere bei *S. aureus* und *Bacillus subtilis* die Wachstumsinhibition bestätigt werden (Chechan 2014). Saini et al. 2008 konnten diesen Effekt ebenfalls bei *Candida albicans* und *Aspergillus niger* nachweisen und somit eine fungizide Wirkung von GA dokumentieren. Im Rahmen der Malariastudie von Ballal et al. 2011 zeigte sich ein verlängertes Überleben infizierter Tiere nach Behandlung mit GA durch Beeinflussung der Parasitämie und Erhöhung der Eryptose bereits infizierter Erythrozyten. Diese Wirkungen auf bakterielle und parasitäre Infektionen und Mykosen kann durch die modulatorischen Eigenschaften GAs auf das Immunsystem erklärt werden. Bovo et al. 2016 untersuchten den Effekt von GA auf das Komplementsystem und konnten hierbei dessen aktivierenden Charakter belegen, welcher sich auch bei dendritischen Zellen nachweisen lies. Es zeigte sich, dass GA die Reifung dendritischer Zellen positiv beeinflusst, die Expression von *Major histocompatibility complex* Klasse-II (MHC-II) hochreguliert und die Bildung von IL-6, IL-10 und IL-12p70 sowie des Tumornekrosefaktors α (TNF-α) steigert (Xuan et al. 2010).

Trotz bisheriger Publikationen ist dennoch nichts über den Einfluss GAs auf neutrophile Granulozyten als Teil der *first line of defence* bekannt, welcher im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen und bearbeitet wurde.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Fortschritt der modernen Medizin, der sozioökonomischen Entwicklung und neuer Strategien und Wege im Gesundheitsmanagement steigt die Zahl der alten Menschen weltweit. Während der Teil der Weltbevölkerung im Alter von 60 Jahren und älter erst 2050 22% der Gesamtbevölkerung ausmachen soll (Dorshkind et al. 2009), waren bereits 2022 laut Statistischen Bundesamt 22% der deutschen Bevölkerung 65 Jahre und älter (Ältere Menschen). In Anbetracht dieser Entwicklung werden geriatrische Erkrankungen, altersassoziierte Infektionserkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Yung und Julius 2008) eine immer größere Rolle im klinischen Alltag spielen. Mit steigendem Alter sinkt allerdings die Fähigkeit des Immunsystems adäquat auf Infektionen jeglicher Art reagieren zu können. Es kommt zu einer höheren Morbidität und Mortalität auf Grundlage von Infektionserkrankungen als Konsequenz des normalen Alterungsprozesses (Butcher et al. 2001, Nikolich-Žugich 2018). Mit Blick auf die steigende Zahl bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiokatherapien gerät auch hier die Medizin, im Rahmen der Antibiotikabehandlung, an die Grenzen ihrer Möglichkeiten. Bereits heutzutage geht man von ungefähr 700 000 Patienten weltweit aus, welche auf Grund einer Infektion mit einem multiresistenten Erreger (MRE) versterben. (Home | AMR Review). Für einige Bakterienstämme, insbesondere aerobe Bakterien (Boyd et al. 2020), schwindet die Zahl der therapeutischen Wirkstoffe, z.B. *Acinetobacter baumannii* mit Resistenzen gegen Carbapeneme, Aminoglykoside, Polymyxine und Tigecycline oder ß-lactamase produzierende *Pseudomonas aeruginosa* (Karakonstantis et al. 2020). In solchen Fällen sollten alternative Therapieansätze gefunden werden.

Diese Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob es möglich ist, insbesondere das innate Immunsystem mittels GA in dem Maße zu stimulieren, dass die unspezifische Immunantwort im Alter gesteigert werden kann. Hierzu soll die Phagozytosefähigkeit humaner Leukozyten im Vollblut junger (20-35 Jahre) und alter (über 80 Jahre) gesunder Probanden in Anwesenheit eines Stimulators bei Ko-Inkubation mit Gram-positiven oder Gram-negativen Bakterien untersucht und verglichen werden. Um die Situation in vivo weitestgehend zu imitieren, werden die neutrophilen Granulozyten, welche zur *first line of defence* (The body's first line of defence) gehören, nicht aufgereinigt, sondern im Vollblut belassen. Zum einen soll so die Qualität des innaten Immunsystems der unterschiedlichen Altersklassen bestimmt, zum anderen aber auch

die mögliche Reaktion auf einen zur Pathogenerkennung und –abtötung stimulierenden Stoff getestet werden. Ziel ist es, einen Stimulator zu finden, welcher zuverlässig die Phagozytoserate humaner Leukozyten steigert, um kompetent bakterielle Infektionen bekämpfen zu können. Zudem wird mittels Färbung und lichtmikroskopischen Auszählens die Quantität lebender Leukozyten überprüft.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können somit als zusätzliches Wissen dienen, welches bei der Entwicklung von Strategien zur Prävention und Therapie bakterieller Infektionen im Alter oder bei immunsupprimierten Personen nützlich sein kann.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

HeraSafe Werkbank	Heraeus, Hanau, Germany
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Germany
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Germany
Thermoshake	C.Gerhardt GmbH&Co.KG, Königswinter, Germany
Vacusafe Comfort Sicherheits-Absaugsystem	Integra Bioscience, Biebertal, Germany
Eppendorf Research Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Germany
Eppendorf Research Pipette 10-100µl	Eppendorf, Germany
Eppendorf Research Pipette 0,5-10µl	Eppendorf, Germany
Mehrkanalpipette Research 30-300µl	Eppendorf, Germany
Mehrkanalpipette 5-50µl	CAPP, Odense, Denmark
Neubauer Zählkammer; 0,1mm Tiefe; 0,0025mm^2	Laboroptik Ltd, Lancing, GB
Mikrotiterplatten- Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Germany
Floureszenzmikroskop	Olympus Scientific Solutions, Tokyo, Japan
Digitale Mikroskopkamera DP71	Olympus Scientific Solutions, Tokyo, Japan

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Mikrotestplatten 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Nunc MaxiSorp *flat-bottom* Mikrotestplatten 96-Well	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Safe-Lock Tubes 0,5ml; 1,5ml; 2ml	Eppendorf, Germany
Pasteurpipetten Glas	
Pipettenspitzen für Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Germany
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
COS-Platten *(Coloumbia sheep blood-agar)*	Institut für Mikrobiologie, Göttingen, Germany
LB-Agarplatten (*Lysogeny broth*)	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Laboratory film (Parafilm)	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Aqua Bidest	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
0,2%; 0,9%; 1,6% Natriumchlorid-Lösung (NaCl)	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Gibco by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamicin solution, G1272	Sigma-Aldrich Life Science, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco by ThermoFisher Scientific, Wal-

	tham, MA, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Gibco by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphate buffered saline (PBS) PBS-Puffer (10X Dulbecco's)-Pulver in Aqua Dest	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
PBS-Puffer (10X Dulbecco's)-Pulver	PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany
4% Paraformaldehyd (PFA) PFA *prilled*, 95% in PBS	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
PFA *prilled,* 95%	Sigma-Aldrich Life Science, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Fetal calf serum (FCS)	SAFC by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Lysepuffer (hergestellt aus 500ml DPBS und 10ml FCS)	Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany
ELISA MAX Standard Set Human IL-6 - Human IL-6 ELISA MAX *Capture Antibody* (200X) - Human IL-6 ELISA MAX *Detection Antibody* (200X) - Human IL-6 Standard - Avidin-HRP (1000X)	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
ELISA MAX Standard Set Human TNF-α - Human TNF-α ELISA MAX *Capture Antibody* (200X) - Human TNF-α ELISA MAX *Detection Antibody* (200X) - Human TNF-α Standard	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

- Avidin-HRP (1000X)	
Coating Buffer: 8,4g $NaHCO_3$, 3,56g Na_2CO_3, bis zu 1l Aqua Dest bis pH 9.5	Merck, Darmstadt, Germany
Assay Diluent: 1% BSA in PBS	SERVA, Heidelberg, Germany
Waschpuffer: PBS + 0.05% Tween-20	Merck, Darmstadt, Germany
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) *Substrate solution*	MOSS, Inc., Pasadena, Maryland, USA
Stop solution: 95-97% H_2SO_4 + Aqua Dest	Merck, Darmstadt, Germany
ELISA MAX Deluxe Set Human IL-1ß - Human IL-1ß ELISA MAX *Capture Antibody* (200X) - Human IL-1ß ELISA MAX *Detection Antibody* (200X) - Human IL-1ß Standard - Avidin-HRP (1000X) - *Substrate Solution F* - *Coating Buffer A* (5X) - *Assay Diluent A* (5X) - *Assay Buffer D*	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

Als Antibiotikum wurde Gentamicin gewählt, da es vor allem auf Gram-negative Bakterien, wie das verwendete *E. coli* K1, bakterizid wirkt und zusätzlich schlecht gewebegängig ist.

2.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 6: Bakterienstämme

E. coli K1 lebend in NaCl + 15% Glycerol	Dr. G. Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Düsseldorf, Germany
Staphylococcus aureus (S. aureus) USA300, MRSA gelöst in *Phosphate buffered saline* (PBS)	Institut für Physiologische Chemie, Stiftung tierärztliche Hochschule Hannover, Germany
Staphylococcus aureus (S. aureus) Newman, MSSA gelöst in *Phosphate buffered saline* (PBS)	Institut für Physiologische Chemie, Stiftung tierärztliche Hochschule Hannover, Germany

2.3.1.1 *Escherichia coli (E. coli)*

Ein bekapselter humanpathogener *E. coli* K1-Stamm (Serotyp O18:K1:H7, zur Verfügung gestellt von Dr. Gregor Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie Düsseldorf, Germany), isoliert von einem an Meningitis erkranktem Kind, bis zu einer OD_{600} in *Brain Heart Infusion* (BHI) kultiviert, anschließend in 0,9% NaCl gewaschen, mit 15% Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren (Spreer et al. 2006).

2.3.1.2 *Staphylococcus aureus (S. aureus)*

S. aureus USA300, gewonnen aus Wunden infizierter universitärer Footballspieler aus den USA, ist ein ambulant erworbener oxacillin-resistenter Bakterienstamm (Begier EM et al. 2004). *S. aureus* Newman ist ein oxacillin-sensitiver S. aureus, welcher 1952 von einem Tuberkulosepatienten isoliert wurde, der sich im Rahmen der Tuberkuloseerkrankung mit dem Stamm infizierte (Baba et al. 2008). Beide Bakterienstämme wurden schwenkend bei 200rpm für 18h bei 37°C in *Brain Heart Infusion* (BHI) kultiviert, in BHI 1:50 verdünnt und unter denselben Bedingungen bis OD_{600nm}=0,5 wachsen gelassen. Die Inokula wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen, in PBS gelöst, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden durch Ausplattieren von seriellen 1:10-Verdünnungen bestimmt.

2.3.2 Stimulanzien

Tabelle 7: Stimulanzien

Stimulator	Lagerkonzentration	Konzentration im Versuch	Bezugsquelle
CpG Oligodesoxynucleotid (ODN) 1668 (TCC ATG ACG TTG CTG ATG CT) gelöst in Aqua Bidest	3000µg/ml	10µg/ml	TIB Molbiol, Berlin, Germany
Gummi arabicum (GA) gelöst in 0,9% NaCl	Pulver	0,3mg/ml; 1,25mg/ml; 5mg/ml; 20mg/ml	*Acacia Senegal*, Kordofan, West Sudan
LPS von *E. coli* O26:B6 gelöst in Aqua Bidest	1mg/ml	0,1µg/ml	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
PEA gelöst in DMSO	20mM	3µM	Tocris Bioscience, Bristol, GB
Pam_3CSK_4 gelöst in Aqua Bidest	1mg/ml	1µg/ml	EMC microcollections, Tübingen, Germany
Poly I:C gelöst in NaCl	5mg/ml	1µl/ml	InvivoGen, San Diego, CA, USA

2.4 Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden

Zum Einschluss der Probanden in die Studie mussten folgende Punkte erfüllt werden:

- Alter zwischen 20 und 35 Jahre oder über 80 Jahre
- keine Krebserkrankung und Chemotherapie in der Anamnese
- keine Autoimmunerkrankung
- kein operativer Eingriff und/oder Knochenbruch bis zu einem Jahr vor Blutentnahme (BE)

- keine akute Infektionserkrankung (bis zu vier Wochen vor BE)
- keine Impfung bis zu drei Monate vor BE
- keine aktuelle immunmodulatorische Medikation
- Hämoglobin ≥11g/dl
- Leukozyten 4 000-10 000/µl

Die Nichterfüllung eines der Kriterien führte zum Ausschluss des Probanden.

Probanden mit einer regelmäßigen Einnahme von Medikamenten, welche keine Auswirkungen auf das Immunsystem haben, mit einer Einnahme von Statinen und chronischen Erkrankungen wie ein arterieller Hypertonus oder ein eingestellter Diabetes mellitus Typ II wurden nicht von der Studie ausgeschlossen.

2.4.1 Probengewinnung

In die Studie wurden 29 Probanden eingeschlossen, 17 Personen in der Altersspanne von 20 – 35 Jahren (26/20-35) und zwölf Personen 80 Jahre oder älter (86,5/80-93). Die Gruppen teilten sich in sechs junge Männer, elf junge Frauen, sieben ältere Damen und fünf ältere Herren. Allen Personen wurde Blut mittels peripherer Venenpunktion entnommen und anschließend durch ein Differentialblutbild analysiert. Alle Proben wurden innerhalb von 2h nach Entnahme weiterverarbeitet.

2.4.2 Phagozytose-Assay

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Aufbau eines Phagozytose-Assays zur Veranschaulichung. Entsprechend der jeweiligen protokollspezifischen Fragestellungen wurden die Volumina und Bakterienstämme angepasst.

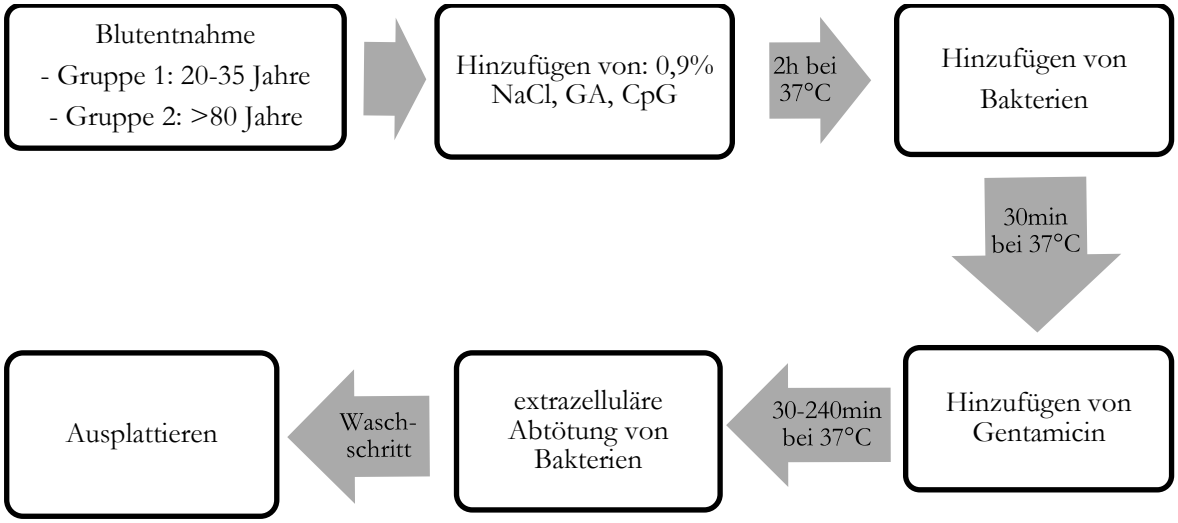


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Phagozytose-Assays

2.4.2.1 Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve von GA

Die verwendete Konzentration von GA wurde in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern der Tierärztlichen Hochschule Hannover festgelegt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Kooperationspartner wurden Versuche zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve durchgeführt (Baien et al. 2020).

Alle Ansätze mit den jeweiligen Konzentrationen und die Kontrolle wurden als Triplettansätze angesetzt und in den Versuchen genutzt. Pro Ansatz wurden 700µl menschliches Vollblut benötigt, die Abnahme erfolgte in Lithium-Heparinat-Monovetten und durfte nicht älter als 2h bei Beginn des Versuchs sein, um das Überleben und die volle Aktivität der Neutrophilen zu gewährleisten. Das abgenommene Vollblut wurde in einer 50ml-Zentrifugenröhre gesammelt und von dort in die 1,5ml *Safe-Lock-Tubes* überführt.

Weiterhin wurden im Versuch folgende GA-Konzentrationen verwendet:

0,3mg/ml; 1,25mg/ml; 5mg/ml und 20mg/ml. Für die Kontrolle wurden 50µl einer 0,9% NaCl-Lösung genutzt.

Es folgte eine Präinkubation des humanen Blutes mit GA für 2h schwenkend bei 37°C. Anschließend wurden je $2{,}5 \times 10^7$ KBE *E. coli* K1 lebend zum Vollblut hinzugefügt und zum Zeitpunkt t_0 2x20µl in einer 10^{-4} Verdünnung auf COS-Platten ausplattiert. Nach 60min Inkubation erfolgte ein erneutes Ausplattieren einer 10^{-4} Verdünnung auf COS-Platten. In Vorversuchen zeigte sich diese Verdünnungsstufe als optimal zum späteren Auszählen der KBE. Dies entsprach dem Gesamtüberleben nach 60 Minuten Inkubationszeit. Danach erfolgte die Zent-

rifugation der Safe-Lock Tubes bei 800g, 20°C für 5min und Absaugen des Überstands. Vor der Antibiotikagabe erfolgte ein Waschschritt mit 600µl 0,9% Natriumchloridlösung mit erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstands. Es folgte die Aufnahme des Pellets in ein DMEM/Gentamicin Gemisch, pro Probe 150µl. Die Ausgangskonzentration des Gentamicins bei Ansatz des Gemisches betrug 200µg/ml, die finale Konzentration nach dem Mischen mit dem Blut 100µg/ml. Eine weitere Inkubationszeit von 60min schwenkend bei 37°C schloss sich an. Die Suspensionen wurden in zwei Waschschritten mit jeweils 600µl NaCl-Lösung 0,9% gewaschen, anschließend bei 20°C, 800g für 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das finale Pellet wurde in 500µl Aqua bidest aufgenommen und ausplattiert, 2x20µl. Die Inkubation der COS-Platten erfolgte daraufhin für 24h bei Zimmertemperatur.

2.4.2.2 Stimulation des Vollbluts junger Probanden mit GA und LPS und anschließender Ko-Inkubation mit *E. coli*

Alle Ansätze mit den jeweiligen Stimulatoren und die Kontrolle wurden als Triplettansätze angesetzt und in den Versuchen genutzt. Pro Ansatz wurde 1000µl menschliches Vollblut benötigt, die Abnahme erfolgte in Lithium-Heparinat-Monovetten und durfte nicht älter als 2h bei Beginn des Versuchs sein, um eine gleichbleibende Blutqualität zu gewährleisten. Das abgenommene Vollblut wurde in einer 50ml-Zentrifugenröhre gesammelt und von dort in die 1,5ml *Safe-Lock-Tubes* überführt.

Zu dem Kontrolltriplett wurde das gleiche Volumen 0,9% NaCl hinzugefügt, welches an GA-Lösung für einen weiteren Triplettansatz genutzt wurde, um die finale Konzentration von 20mg/ml erhalten. Lipopolysaccharide *E.coli* O26:B6 (LPS) sollte mit der Konzentration von 0,1 µg/ml) genutzt werden. Nach Mischung wurden alle *Tubes f*ür 2h schwenkend im Thermoshaker (60rpm) bei 37°C präinkubiert.

Pro Stimulator wurden jeweils ein zusätzliches *Safe-Lock-Tube* präinkubiert, um im Anschluss den Überstand abzunehmen und bei -80°C für zukünftige Messungen aufzubewahren.

Anschließend wurden je 15µl *E. coli* K1 lebend zum Vollblut hinzugefügt (ca. 2,5 x 10^7 CFU/ml) und nach dem Mischen (Zeitpunkt t_0) in sequentiellen 1:10-Verdünnungen (10^{-4}-Verdünnung wurde ausplattiert; 2x20µl) auf Blutagar-Agar ausplattiert. Die Verdünnungsstufe zeigte sich Vorversuchen als optimal zum späteren Auszählen der KBE.

Nach 30min Inkubation im Thermoshaker (60rpm) folgte ein erneutes Ausplattieren einer 10^{-4}-Verdünnung auf Blutagar-Agar. Dies entsprach den insgesamt (extra- und intrazellulär) überlebenden Bakterien nach 30 Minuten Inkubationszeit (ÜF=t_{30}/t_0).

Die hypotone Lyse der Erythrozyten zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens wurde wie folgt durchgeführt: Zentrifugation der *Safe-Lock-Tubes* bei 4°C, 1500g für 5min, Absaugen

des Überstandes mit dem Sicherheits-Absaugsystem bzw. Abnehmen mit anschließender Aufbewahrung bei -80°C, Aufnahme des Blutpellets in 400µl 0,2% NaCl, Lyse für 30sec, dann Isotonisierung mit 400µl 1,6% NaCl, erneute Zentrifugation und Absaugen des Überstandes. Der Vorgang wurde 3-Mal wiederholt, um eine möglichst hohe Reduktion der Erythrozyten zu erreichen.

Es folgte die Aufnahme des Pellets in 550µl RPMI 1640/Gentamicin-Gemisch. Die Ausgangskonzentration bei Ansatz des Gemisches betrug 200µg/ml, die finale Konzentration nach dem Mischen mit dem Blut 100µg/ml.

Die weiteren Inkubationszeiten nach Aufnahme in Suspension betrugen 30, 60, 120, 180, 240min schwenkend bei 37°C.

Zu den jeweiligen Zeiten wurden 100µl der Bakterien-Blut-RPMI/Gentamicin-Suspension entnommen, in ein 1,5ml Safe-Lock Tube überführt und mit 600 µl 0,9% NaCl-Lösung gemischt, anschließend bei 4°C, 1500g für 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das finale Pellet wurde in 100µl Aqua bidest aufgenommen und 100 µl unverdünnt ausplattiert.

Zusätzlich wurden bei den Inkubationszeiten 30min, 60min und 120min 10^{-1}-Verdünnungen (20µl Probe + 180µl 0,9% NaCl), 2x20µl, ausplattiert. Die Verdünnungsstufe ergab sich aus Vorversuchen, wobei stets 20-200 KBEs gezählt werden konnten. Die Inkubation der Blutagar-Platten erfolgte für 24h bei 37°C.

2.4.2.3 Stimulation humanen Vollbluts junger Probanden mit GA und PAM_3CSK_4 und Ko-Inkubation mit *S. aureus*

Für den Versuch mit den jeweiligen Staphylokokkenstämmen wurden die Stämme *S. aureus* USA300 (stock: ca. $3{,}725 \times 10^8$ CFU/ml; final: ca. $2{,}5 \times 10^7$ CFU/ml) und *S. aureus* Newman (stock: ca. 464 583 333,3 CFU/ml; final: ca. $2{,}5 \times 10^7$ CFU/ml) genutzt. Als Positivkontrolle dienten 10µl PAM_3CSK_4 in einer finalen Konzentration von 1µg/ml. Alle weiteren Schritte und Volumina gleichen dem Phagozytose-Assay mit *E. coli* als Bakterienstamm und LPS als Stimulator.

2.4.2.4 Testung unterschiedlicher Stimulatoren zur Ermittlung einer Positivkontrolle für den Vollblut-Phagozytose-Assay

Das Protokoll entspricht dem des Phagozytose-Assays mit GA und LPS. Es wurden *E. coli* als Bakterienstamm (ca. $2{,}5 \times 10^7$ CFU/ml) und GA (20mg/ml), CpG (10µg/ml), Poly I:C (1µg/ml) und PEA (3µM) als Stimulantien verwendet. Alle Stocklösungen wurden in 0,9% NaCl gelöst. Für die Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen 0,9% NaCl, wie GA-Lösung in den weiteren *Tubes* genutzt. Nach Behandlung mit dem Gentamicin/RPMI-

Gemisch wurden die Blutproben für 30min und 60min schwenkend bei 37°C im Thermoshaker inkubiert und anschließend unverdünnt und in einer sequentiellen 1:10-Verdünnung (10^{-1} Verdünnung) ausplattiert.

2.4.3 Färbung der lebenden und toten Zellen nach Ko-Inkubation mit Bakterien

Pro Bakterienstamm, es wurden *E. coli*, *S. aureus USA300* und *S. aureus Newman* verwendet, wurde ein Ansatz mit 1ml Vollblut und 0,9% NaCl als Kontrolle, bzw. mit GA als Stimulator für 2h präinkubiert. Die Abnahme des Blutes erfolgte in Lithium-Heparinat-Monovetten und durfte nicht älter als 2h bei Beginn des Versuchs sein, um eine gleichbleibende Blutqualität zu gewährleisten. Das Blut wurde in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt, zu jeweils 1ml in 2ml *Safe-Lock-Tubes* überführt und anschließend ein identisches Volumen 0,9% NaCl wie GA-Lösung (20mg/ml) hinzugefügt. Die Präinkubationszeit, die Zeit des Hinzufügens der Bakterienstämme, die folgende Inkubationszeit, sowie die hypotone Lyse sind gleich dem Protokoll des Phagozytose-Assays.

Zur besseren Sichtbarkeit der Granulozyten in der Zählkammer wurden die Erythrozyten durch eine weitere Lyse mit einem FACS-Lysepuffer lysiert. Hierzu wurde der Lysepuffer 1:10 in Aqua bidest verdünnt. 350µl wurden jeweils zu 50µl der Suspension in den *Safe-Lock-Tubes* hinzugefügt, nach 3min die Reaktion mit 750µl PBS abgestoppt und die *Tubes* bei 4°C bei 1500g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Dieser Vorgang wiederholte sich dreimal.

Das finale Pellet wurde in 80µl PBS aufgenommen. Davon wurden 20µl mit 10µl unverdünntem Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierbei wurden sowohl die toten als auch die lebenden Leukozyten gezählt.

Die Vorgehensweise zur fotomikroskopischen Darstellung der lebenden und toten Leukozyten basierte auf dem genannten Protokoll, jedoch ohne Ko-Inkubation mit Bakterien. Zusätzlich wurde ein weiteres Pellet in 4% PFA aufgenommen. Die lebenden, in PBS aufgenommenen, und toten, in PFA aufgenommenen Leukozyten wurden in einer 400-fachen Vergrößerung fotomikroskopisch abgebildet. Als nicht membrangängiger Farbstoff bindet Trypanblau an Zellproteine, wodurch sich nur tote Zellen fotomikroskopisch blau darstellen.

2.4.4 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist eine plattenbasierte Technik zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen, Peptiden, Antikörpern und Hormonen (Overview of ELISA | Thermo Fisher Scientific - IE). Die folgenden Protokolle basierten auf den Angaben des Herstellers BioLegend. Die genutzten ELISA MAX Standard Set Human IL-6, Human

TNF-α ELISA MAX Standard Set und ELISA MAX Deluxe Set Human IL-1ß wurden den hiesigen Laborbedingungen angepasst und danach modifiziert. Die Methode beruht auf der Quantifizierung der zu untersuchenden Substanz zwischen zwei Antikörperschichten; dem *Capture Antibody* und dem *Detection Antibody*. Diese binden und immobilisieren die Substanz, detektieren sie und können damit in einem weiteren Schritt, durch einen dritten Antikörper, als Signal gemessen und quantifiziert werden. Daher handelte es sich hierbei um ein Sandwich ELISA. Die antigenspezifischen Antikörper müssen an nicht-überlappende Epitope des Antigens binden, um sich nicht gegenseitig zu hemmen (Aviva Systems Biology Corporation). In folgenden Versuchen wurden die Zytokine IL-6, TNF-α und IL-1ß gemessen, welche im Rahmen einer Sepsis erhöht messbar sind (siehe 1.3.2).

2.4.4.1 ELISA Human IL-6

Alle Volumenangaben entsprachen der Menge, welche für eine 96-Mikrotestplatte benötigt wurden. Die Reagenzien wurden wie folgt hergestellt: 60µl *Capture Antibody* + 12ml *Coating Buffer*, 60µl *Detection Antibody* + 12ml *Assay Diluent*, 12µl Avidin-HRP + 12ml *Assay Diluent*. Der lyopholisierte humane IL-6 Standard wurde in 0,2ml *Assay Diluent* gelöst (stock: 80ng/ml), bei Raumtemperatur für 15-20min gelagert und anschließend kurz gemischt, um verbleibende Pulverreste zu lösen. Von dieser Suspension wurden 6,3µl zu 993,7µl *Assay Diluent* hinzugefügt, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 500pg/ml entstand. Es folgten sechs 1:2 Verdünnungen im Sinne einer geometrischen Verdünnung in *Assay Diluent*. Die Standardreihe bestand somit aus sieben Verdünnungsstufen mit den Konzentrationen 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6pg/ml und 7,8pg/ml. Der *Assay Diluent* mit 0pg/ml war ebenfalls Teil der Reihe und diente als *blank*. Vor Beginn des Versuchs wurden alle Lösungen vorbereitet und auf Raumtemperatur gebracht. Das gesammelte Plasma aus den Phagozytose-Assays wurde von -80°C auf Eis transportiert und schonend zwischen 2°C und 8°C aufgetaut, anschließend für 10min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues *Safe-lock-Tube* überführt. Der Standard wurde in Triplikaten aufgetragen. Die Proben wurden in den Vorversuchen in einer 1:1,5, 1:2, 1:5 und 1:10 Verdünnung aufgetragen, um so die ideale Verdünnungsstufe zu eruieren. Diese entsprach für die Kontrollproben und diejenigen, welche mit GA, CpG, Poly I:C, PEA und Pam_3CSK_4 stimuliert wurden einer 1:1,5 Verdünnung, für das LPS-stimulierte Plasma einer 1:10 Verdünnung.

Der ELISA teilte sich auf drei Tage auf. An Tag 1 wurden 100µl des verdünnten *Capture Antibody* in jedes Well der Mikrotestplatte gegeben, die Platte mit Parafilm überzogen und zwischen 2°C und 8°C über Nacht inkubiert. An Tag 2 wurde die Mikrotestplatte viermal mit

mindestens 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Der verbleibende Puffer wurde jeweils kräftig auf sauberem saugfähigem Material ausgeklopft. Anschließend wurden 200µl *Assay Diluent* zu jedem Well hinzugefügt, die Platte mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur für 1h schwenkend bei 200rpm inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschritt aus viermaligem Waschen und der Zugabe der Standardverdünnungen und Probenverdünnungen zu den Wells zu jeweils 100µl. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und zwischen 2°C und 8°C über Nacht inkubiert. Tag 3 begann mit einem Waschschritt. Danach wurden 100µl *Detection Antibody* zu jedem Well hinzugefügt. Die Platte wurde verschlossen, inkubierte für 2h schwenkend bei 200rpm bei Raumtemperatur und die Wells wurden anschließend wieder gewaschen. Es wurden 100µl verdünntes Avidin-HRP zu den Wells hinzugegeben, die Platte geschlossen und für 30min lichtgeschützt inkubiert. Avidin ist ein Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Glykoprotein, welches biotinylierte Antikörper detektieren kann (HRP-Avidin). Im letzten Waschschritt wurde die Platte fünfmal gewaschen, wobei der Waschpuffer jedes Mal 30sec bis 1min einwirkte. 100µl TMB *Substrate solution* wurden im folgenden Schritt jeweils hinzugefügt. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation für 15-30min bzw. bis ein Farbumschlag zu Blau erkennbar war und die gewünschte Intensität erreicht wurde. Darauf wurden 100µl *stop solution* gegeben. Es folgte ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Innerhalb der folgenden 15min wurden die Extinktionen bei 450 und 540nm gemessen. Die Extinktion bei 540nm wurde von jener bei 450nm subtrahiert.

2.4.4.2 ELISA Human TNF-α

Das Protokoll für den TNF-α ELISA entspricht dem des IL-6 ELISA (3.4.1). Vorbereitungen und Aufbau sind hierbei identisch.

Als Unterschied sind die Volumina zur Herstellung der Standardlösung mit einer Konzentration von 500pg/ml hervorzuheben. Für 1000µl der Lösung werden 10µl der Stock-Standardlösung zu 990µl *Assay Diluent* hinzugefügt. Alle folgenden Schritte sind wieder dem IL-6 ELISA Protokoll (3.4.1) zu entnehmen.

2.4.4.3 ELISA Human IL-1ß

Die Volumina der Reagenzien entsprachen der Menge, welche zur Messung einer 96-Well Platte benötigt wurden. Sie wurden wie folgt hergestellt:

2,4ml des *Coating Buffer A* (5X) verdünnt in 9,6ml Aqua Dest, 60µl *Capture Antibody* in 12ml 1X *Coating Buffer A*, 12ml *Assay Diluent A* (5X) in 48ml PBS, 60µl *Detection Antibody* (200X) in 12ml 1X *Assay Diluent A*, 12µl Avidin-HRP (1000X) in 12ml 1X *Assay Diluent A*.

Der lyopholisierte Human IL-1ß-Standard wurde in 0,2ml des 1X *Assay Diluent A* gelöst *(stock*: 90ng/ml), bei Raumtemperatur für 15-20min gelagert und anschließend gemischt, um verbleibende Pulverreste zu lösen. Zur Herstellung der 125pg/ml-Standardlösung wurde eine initiale 1:10 Verdünnung, 10µl des *stock* in 90µl 1X *Assay Diluent A*, hergestellt. Anschließend wurden 13,9µl der 1:10-Verdünnung in 986,1µl 1X *Assay Diluent A* verdünnt und sechs 1:2-Verdünnungen im Sinne einer geometrischen Verdünnungsreihe in 1X *Assay Diluent A* durchgeführt. Die Standardreihe bestand somit aus sieben Verdünnungsstufen mit den Konzentrationen 125pg/ml, 62,2pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml, 3,9pg/ml und 1,95pg/ml. Der *Assay Diluent A* mit 0pg/ml IL-1ß war ebenfalls Teil der Reihe und diente als *blank*. Vor Beginn des Versuchs wurden alle Lösungen vorbereitet und auf Raumtemperatur gebracht. Das gesammelte Plasma aus den Phagozytose-Assays wurde von -80°C auf Eis transportiert und schonend zwischen 2°C und 8°C aufgetaut, anschließend für 10min bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Safe-lock Tube überführt. Der Standard wurde in Triplikaten aufgetragen, sodass zu jedem Versuch eine Standardkurve erstellt werden konnte. Die Proben wurden in den Vorversuchen in einer 1:1,5-, 1:2-, 1:5- und 1:10-Verdünnung aufgetragen, um so die ideale Verdünnungsstufe zu eruieren. Diese entsprach für die Kontrollproben und diejenigen, welche mit GA, CpG, Poly I:C, PEA und Pam_3CSK_4 stimuliert wurden, einer 1:1,5-Verdünnung, für das LPS-stimulierte Plasma einer 1:10-Verdünnung.

Der ELISA teilte sich auf drei Tage auf. An Tag 1 wurden 100µl des verdünnten *Capture Antibody* in jedes Well der Mikrotestplatte gegeben, die Platte mit Parafilm überzogen und zwischen 2°C und 8°C über Nacht inkubiert. An Tag 2 wurde die Mikrotestplatte viermal mit mindestens 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Der verbleibende Puffer wurde jeweils kräftig auf sauberem, saugfähigem Material ausgeklopft. Anschließend wurden 200µl *Assay Diluent A* zu jedem Well hinzugefügt, die Platte mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur für 1h schwenkend bei 200rpm inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschritt aus viermaligem Waschen. 50µl *Assay Buffer D* wurden in die Wells gegeben, welche anschließend 50µl Standardlösung oder Probe aufnahmen. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und zwischen 2°C und 8°C über Nacht inkubiert. Tag 3 begann mit einem Waschschritt. Danach wurden 100µl *Detection Antibody* zu jedem Well hinzugefügt. Die Platte wurde verschlossen, 2h schwenkend bei 200rpm bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Es wurden 100µl Avidin-HRP zu den Wells hinzugegeben, die Platte geschlossen und für 30min lichtgeschützt inkubiert. Im letzten Waschschritt wurde die Platte fünfmal gewaschen, wobei der Waschpuffer jedes Mal 30sec bis 1min einwirkte. 100µl *Substrate solution F* wurden im folgenden Schritt jeweils hinzugefügt, es folgte eine lichtgeschützte Inkubation für 15-30min bzw. bis ein Farbumschlag zu Blau erkennbar war und die gewünschte Intensität er-

reicht wurde. Darauf wurden 100µl *stop solution* gebracht, es folgte ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Innerhalb der folgenden 15min wurden die Extinktionen bei 450 und 540nm gemessen. Die Extinktion bei 540nm wurde von jener bei 450nm subtrahiert.

2.4.5 Statistik

Jeder Ansatz jedes Versuchs der einzelnen Versuchsreihen wurde in Triplikaten angesetzt. Nach Bestimmung der Mediane und Hochrechnung auf die KBE pro Milliliter mithilfe von Excel 2016 (Microsoft Office) wurden die Daten mittels *GraphPad Prism 6 Software* (San Diego, CA, USA) statistisch ausgewertet. Die Daten zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve wiesen eine Normalverteilung auf, weswegen diese parametrisch mittels eines gepaarten t-Tests ausgewertet wurden. Es wurden die jeweiligen Konzentrationen gegen die Negativkontrolle getestet.

Bei allen weiteren Daten erfolgte eine nicht-parametrische Analyse. Zur Testung signifikanter Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde ein Friedman-Test, eine Rangvarianzanalyse, angewandt. Zur Testung der Werte, welche nach derselben Inkubationszeit erhoben wurden, kam ein zweiseitiger *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit anschließender manueller Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen zur Anwendung. Die Stichprobengröße ließ die Annahme einer Normalverteilung nicht zu, auf Grund des ungerichteten Wirkungszusammenhangs wurde zweiseitig getestet.

Ein p-Wert von $p \leq 0{,}05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet (*$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$).

2.4.6 Ethische Stellungnahme

Auf Grund der Arbeit mit personenbezogenen Daten und humanem Vollblut wurde ein Antrag auf Prüfung der ethischen Unbedenklichkeit gestellt. Dieser wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen, Germany, unter der Nummer 3/5/15 registriert und bewilligt. Die schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, nach Aufklärung über die damit verbundenen Risiken, wurde eingeholt und liegt für jeden einzelnen Probanden vor.

3 Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen den Immunreaktionen junger und alter Probanden

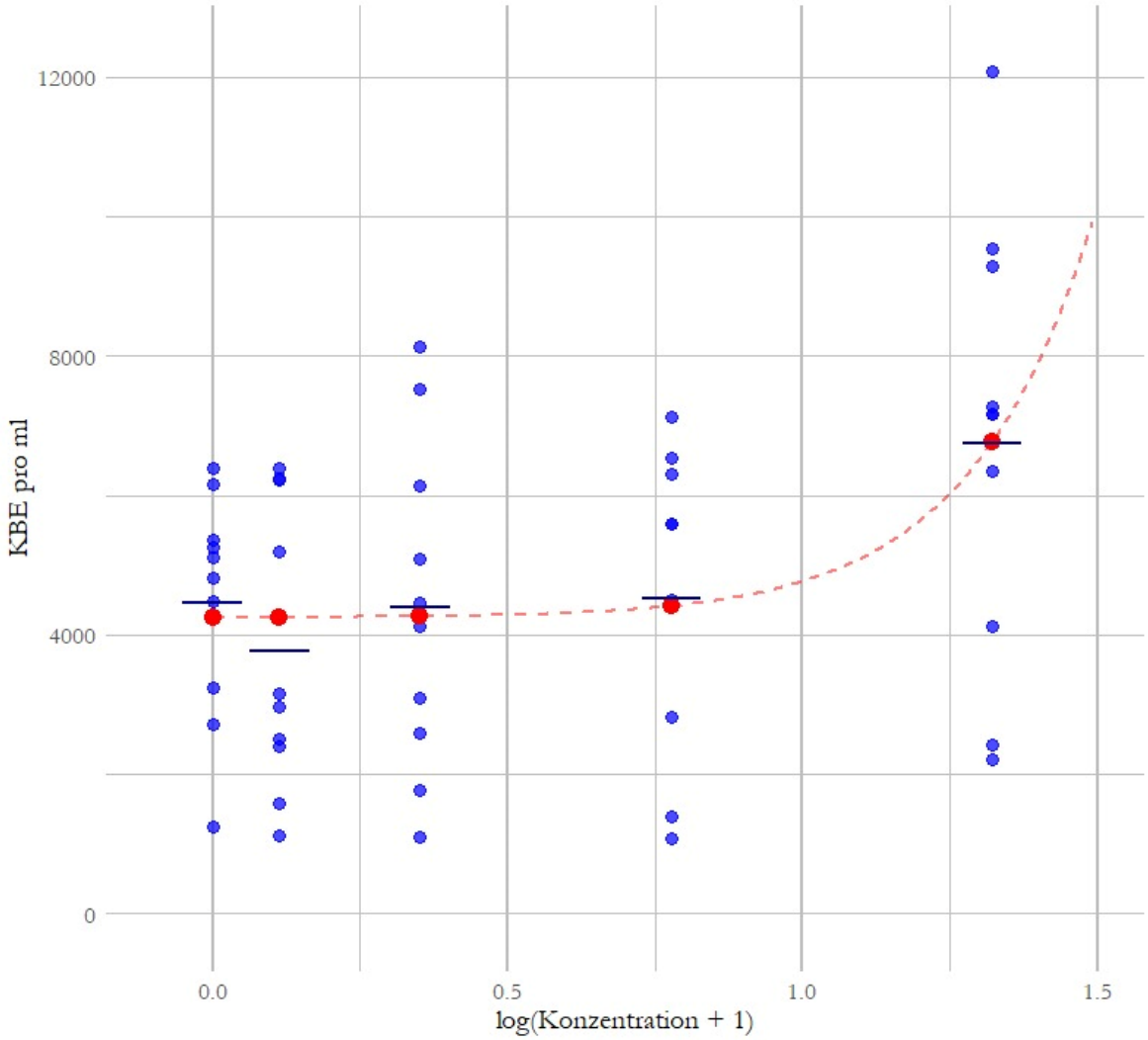
Zur Evaluierung der sich verändernden Immunreaktion im Laufe des Alterungsprozesses, zur Darstellung der größtmöglichen Differenz bei den Ergebnissen und zur Simulation einer *in vivo* Situation wurde mit dem Vollblut gesunder, junger Personen in einer Altersspanne von 20 – 35 Jahren und gesunder, alter Personen über 80 Jahren gearbeitet, die Ergebnisse statistisch ausgewertet und verglichen. Die Stimulantien wurden auf Grund ihrer Funktion als TLR-Liganden oder aber ihrer nachweislich immunmodulatorischen Wirkung ausgewählt. Des Weiteren wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-1ß mittels ELISA gemessen, um zu überprüfen, ob es zu einer Aktivierung und Reaktion des Immunsystems kam. Diese zeigen besonders während eines Infektionsgeschehens starke Anstiege und sind in gewissem Maße Teil der Akutephasereaktion.

Die Versuche, auf denen die folgenden Ergebnisse fußen, basieren auf einer zweistündigen Präinkubationszeit in Anwesenheit der Kontrollsubstanz und der zu untersuchenden Stimulationsstoffen mit einer anschließenden 30minütigen Ko-Inkubation mit den jeweiligen Bakterienstämmen, an die sich die Zugabe von Gentamicin anschließt. Die Zeitpunkte des Ausplattierens sind in den Grafiken dargestellt. Folgt der Versuch diesem Protokoll, findet dies keine Erwähnung. Auf jedwede Abweichung wird hingewiesen.

3.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsinhibierung von *E. coli* K1 durch GA

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration zur Stimulation der Phagozytose im Vollblut wurden vier unterschiedliche Konzentrationen von GA zur Prästimulation des Blutes eingesetzt. Es bestätigte sich die konzentrationsabhängige Steigerung der Phagozytose. Eine statistisch signifikante Korrelation ($p=0{,}0033$) mit einer moderaten positiven Beziehung ($r=0{,}4077$) zwischen den unterschiedlichen GA-Konzentrationen (Abbildung 2) wurde nachgewiesen und bekräftigte die genutzte GA-Konzentration für die nachfolgenden Experimente. Die höchste eingesetzte Konzentration (20mg/ml) zeigte die größte Steigerung der Phagozytose. Eine höhere Konzentration als 20mg/ml konnte aufgrund der Löslichkeit von GA nicht eingesetzt werden.

Abbildung 2: Darstellung der einzelnen Mittelwerte phagozytierter Bakterien durch Blutleukozyten junger Probanden unter Verwendung unterschiedlicher GA-Konzentrationen (n=10)



Logarithmus der Konzentrationen +1 zur grafischen Darstellung der x-Achse, Berechnung der Kurve auf Grundlage der exponentiellen Regression; r=0,4077, p=0,0033**, *Pearson-Correlation,* exponentielle Regression

3.3 Vitalitätsprüfung eukaryotischer Zellen nach GA-Zugabe

Mittels Färbung mit Trypanblau sollte nachgewiesen werden, ob GA auf eukaryotische Zellen einen schädigenden Einfluss hat. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit mit den angegebenen Stoffen folgte die 30minütige Ko-Inkubation mit den jeweiligen Bakterienstämmen, anschließend die Färbung, Zählung und bildliche Darstellung der vitalen Leukozyten. Die Ergebnisse nach Präinkubation mit 0,9% NaCl als Kontrolle und GA zeigten bei *E. coli* K1, *S. aureus* USA300 und *S. aureus* Newman vergleichbare Ergebnisse. GA wirkte auf humane Leukozyten nicht zytotoxisch.

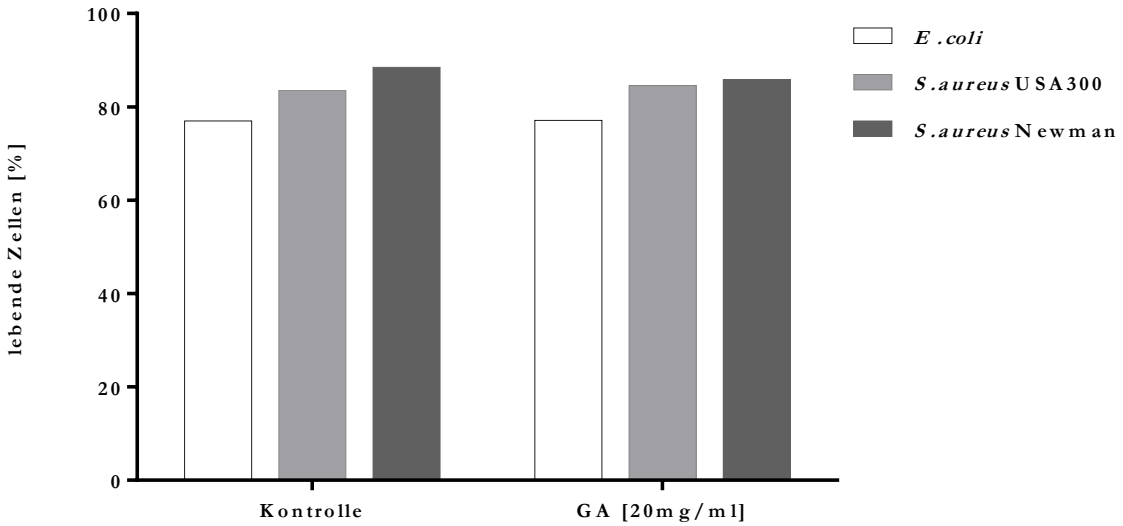


Abbildung 3: prozentuale Darstellung der vitalen eukaryoten Zellen nach Präinkubation mit 0,9% NaCl (Kontrolle) und 20mg/ml GA und anschließender Ko-Inkubation mit Bakterien.

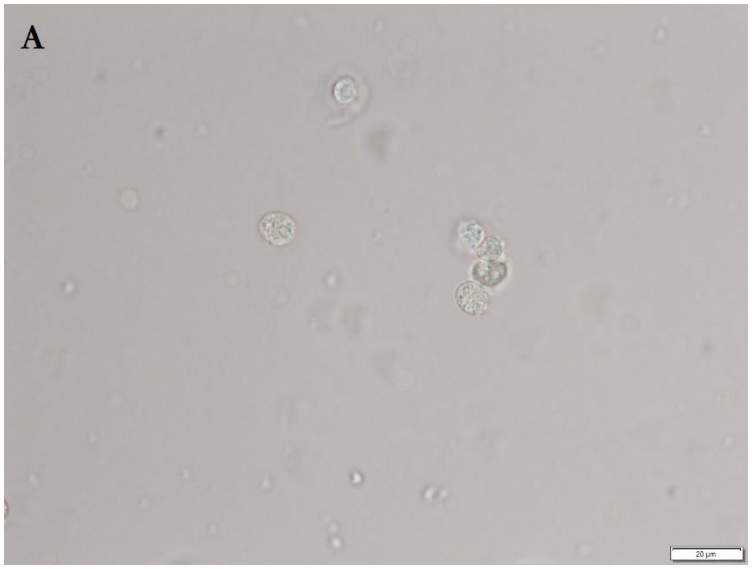
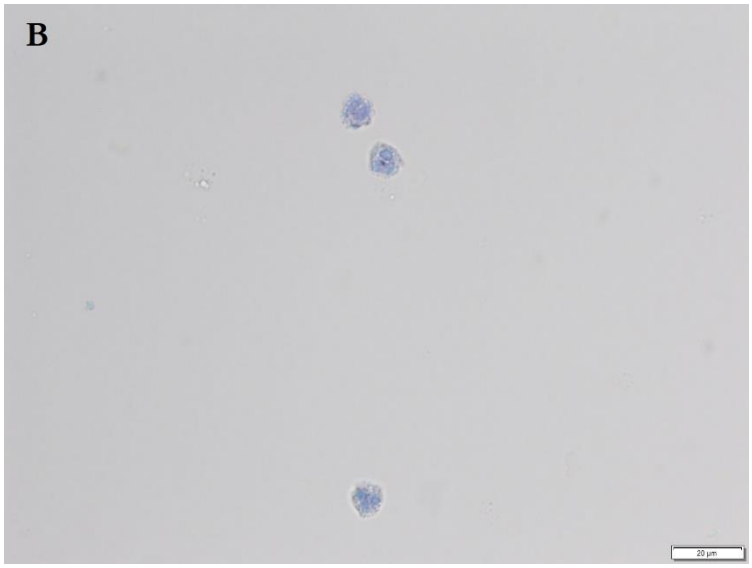


Abbildung 4: Morphologie lebender, mit GA stimulierter, Leukozyten, in PBS aufgenommen und mit Trypanblau angefärbt

- 400-fache Vergrößerung (A); Morphologie toter Leukozyten, mit GA stimuliert, in 4% PFA aufgenommen und mit Trypanblau angefärbt, 400-fache Vergrößerung (B)

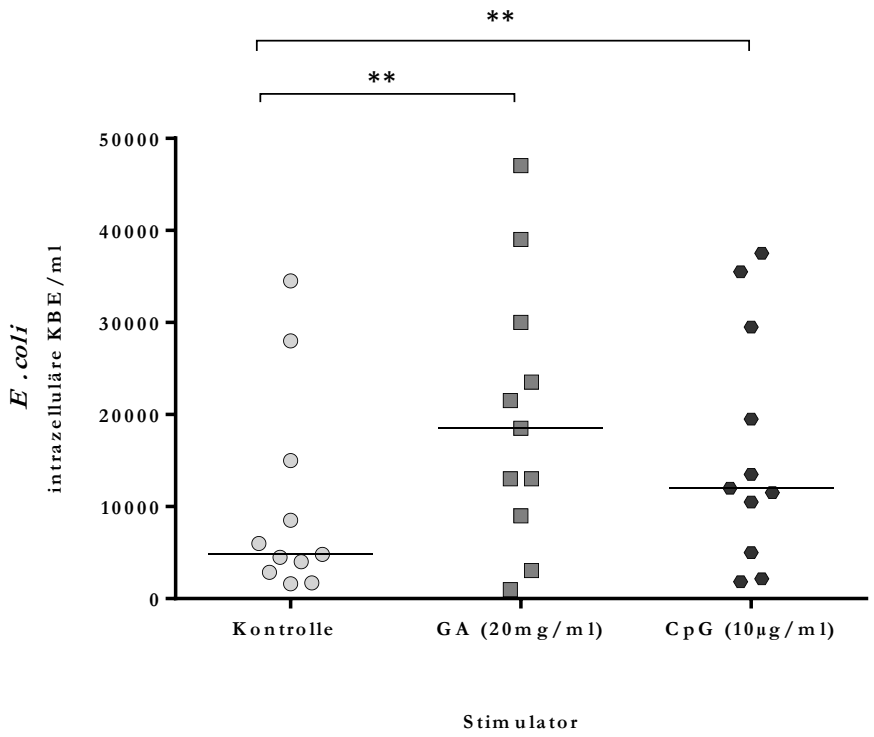


3.4 Stimulation der Phagozytose von Leukozyten junger Probanden durch GA

Die GA-Konzentration (20 mg/ml) mit dem höchsten phagozytosesteigernden Effekt (Abbildung 2) wurde für weitere Untersuchungen verwendet. Als Positivkontrolle für die Stimulation der Phagozytose wurde CpG 1668 eingesetzt. Hierbei wurde das entnommene Blut mit den jeweiligen Stimulationsstoffen präinkubiert, nachfolgend *E. coli* K1 hinzugefügt und abschließend die Gesamtzahl der KBE ausplattiert. So konnten Ergebnisse zu Phagozytose, Überleben und Abtötung von *E. coli* K1 generiert werden.

30 Minuten nach Gentamicinbehandlung war die Zahl der phagozytierten Bakterien nach Stimulation mit GA (p=0,008) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. CpG zeigte durch eine statistisch signifikante Differenz zur Kontrollgruppe einen vergleichbaren Effekt (p=0,002) (Abbildung 5).

Abbildung 5: Phagozytose von *E. coli* nach 30minütiger Gentamicinbehandlung, 2h Präinkubation mit 0,9% NaCl als Kontrolle, 10µg/ml CpG als Positivkontrolle und 20mg/ml GA (n=11, Probanden 20-35 Jahre)

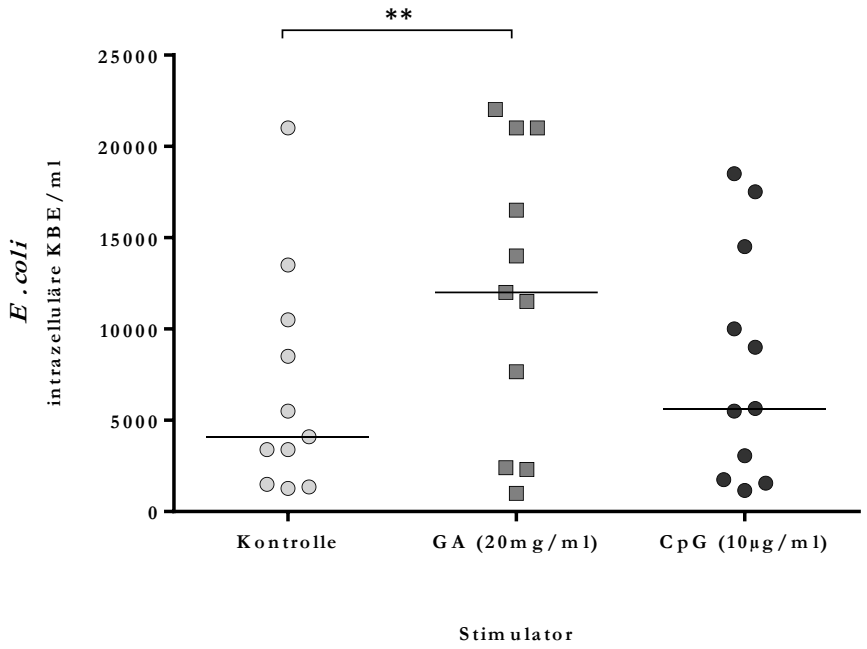


Darstellung der Einzelwerte mit Median; **p<0,01, *Friedman-Test*, anschließend *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

3.4.1 Intrazelluläre Gesamtzahl von *E. coli* K1 nach Abtötung extrazellulärer Bakterien

Die signifikant erhöhte intrazelluläre Gesamtzahl der KBE in GA-stimuliertem Blut (p=0,008) bestätigte sich auch nach 60minütiger Inkubation mit Gentamicin. CpG zeigte zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Steigerung der Phagozytose (Abbildung 6). Durch die Zugabe des Antibiotikums wurden die extrazellulär vorkommenden Bakterien abgetötet, sodass nach der Ausplattierung lediglich die intrazellulär vorkommenden Bakterien gezählt werden konnten. Es wurde hierbei die absolute Zahl der KBE betrachtet, welche im Laufe der Inkubationszeit abnimmt.

Abbildung 6: Intrazelluläre Gesamtzahl der Bakterien 60min nach Zugabe von Gentamicin (n=11, Probanden 20-35 Jahre)

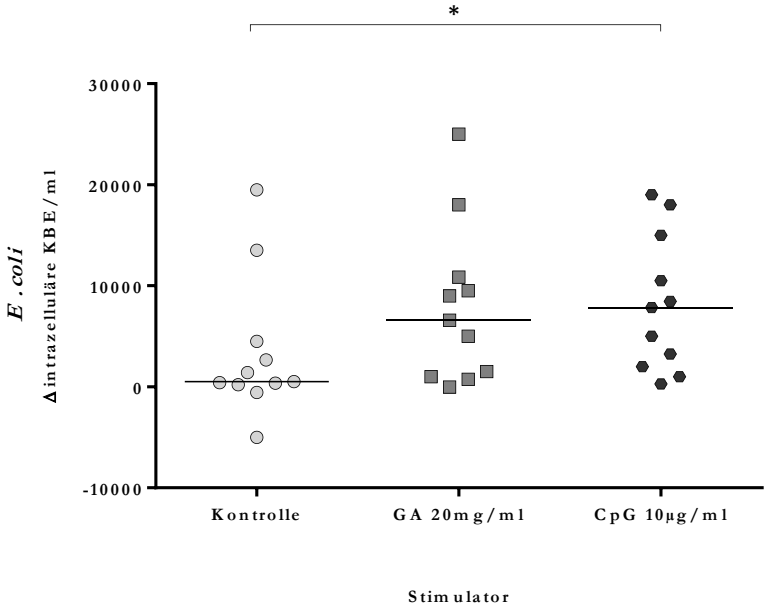


Darstellung der Einzelwerte mit Median; **p<0,01, *Friedman-Test*, anschließend *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

3.4.2 Einfluss von GA auf die intrazelluläre Abtötung von *E. coli* K1

Zur Evaluierung der Abtötung der KBE durch stimulierte Leukozyten wurde die Differenz aus den KBE/ml nach 30min und 60min errechnet. Diese ergaben die Anzahl der abgetöteten Bakterien. GA (p=0,051) verpasste hierbei knapp die Signifikanzgrenze, während CpG (p=0,029) als Positivkontrolle signifikant zur Abtötung intrazellulärer Bakterien stimulierte.

Abbildung 7: Abtötung von *E. coli* 30min nach Gentamicinzugabe nach vorheriger Stimulation.

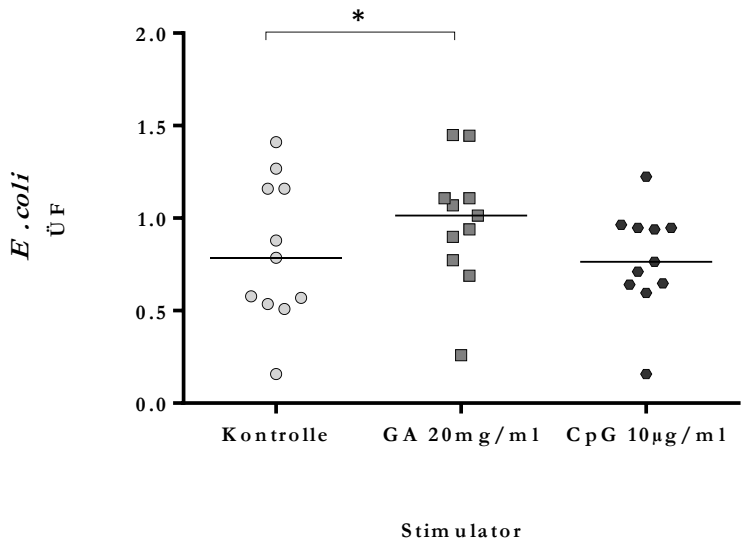


Darstellung der Einzelwerte mit Median (n=11, junge Probanden 20-35 Jahre); *p<0,05, *Friedman-Test*, anschließend *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm-Korrektur für wiederholtes Testen

3.4.3 Veränderung des Überlebensfaktors durch die Stimulation

Der Quotient aus den Zählungen der KBE/ml zum Zeitpunkt t_{30}, 30min nach Hinzufügen von *E. coli*, und t_0 ergab den Überlebensfaktor (ÜF) der Bakterien. In der Betrachtung des Gesamtüberlebens (intra- und extrazellulär) wies *E. coli* in mit GA stimuliertem Blut einen signifikant höheren ÜF (Median 1,014) auf als es bei der Kontrolle (Median 0,7865) oder CpG (Median 0,7639) der Fall war.

Abbildung 8: Überlebensfaktor von *E. coli* nach Stimulation berechnet t_{30}/t_0. t_0 als Zeitpunkt, an dem *E. coli* zum Blut hinzugefügt wurde, t_{30} nach 30min Ko-Inkubation



ÜF<1: Phagozytose>Vermehrung, ÜF=1: Phagozytose=Vermehrung, ÜF>1: Phagozytose<Vermehrung. Darstellung der Einzelwerte mit Median; *p≤0,05, *Friedman-Test*, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

3.4.4 Messung der Zytokinfreisetzung

Die Messung der Zytokine folgte den jeweiligen Protokollen der Kits, welche von BioLegend erworben wurden. Mittels ELISA wurden die Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-1ß gemessen. TNF-α und IL-6 zeigten keine signifikanten Veränderungen im Plasma nach Stimulation mit GA, IL-1ß war vorwiegend unterhalb der Nachweisgrenze und somit nicht auswertbar. Abbildung 9 zeigt exemplarisch eine Standardkurve, welche parallel zu jedem ELISA angefertigt wurde.

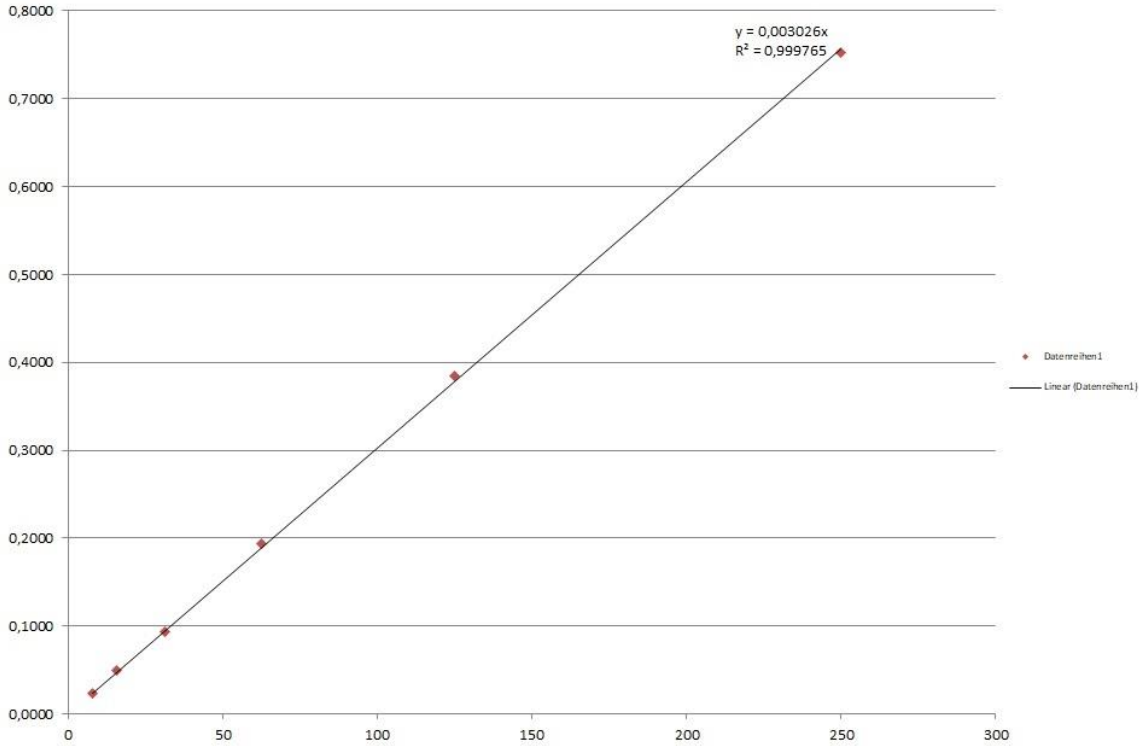


Abbildung 9: ELISA Standardkurve bei der Messung von IL-1ß

Tabelle 8: ELISA-Messung TNF-α im Serum junger Probanden nach Stimulation

	Kontrolle	GA 20mg/ml	CpG 10µg/ml
25% Perzentile	7,000	7,000	7,000
Median	26,73	40,16	18,04
75% Perzentile	76,51	74,53	240,1

Tabelle 9: ELISA-Messung IL-6 im Serum junger Probanden nach Stimlation

	Kontrolle	GA 20mg/ml	CpG 10µg/ml
25% Perzentile	7,000	10,43	7,000
Median	20,41	33,87	18,56
75% Perzentile	305,8	251,9	646,3

3.5 Phagozytose Gram-positiver Bakterien nach GA-Stimulation

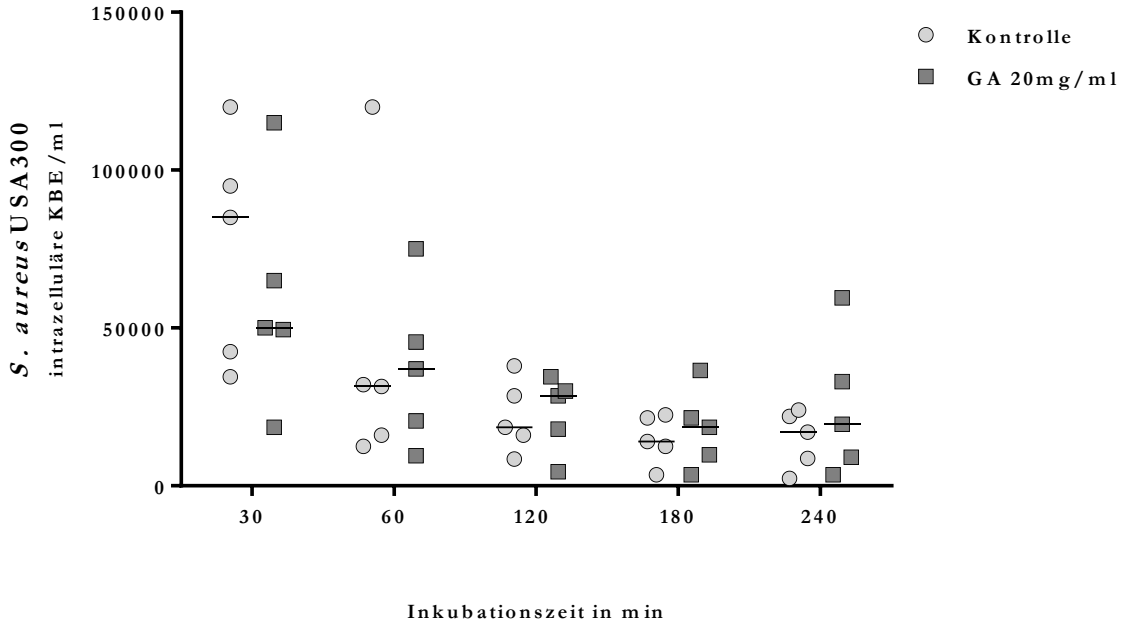
Zur Evaluierung des Effekts von GA auf Gram-positive Bakterien wurden weiterführend Phagozytose-Assays nach demselben Protokoll durchgeführt. Hierbei wurde das entnommene Blut mit den jeweiligen Stimulationsstoffen präinkubiert, nachfolgend einer der beiden *S. aureus*-Stämme (*S. aureus* USA300, *S. aureus* Newman) hinzugefügt und abschließend die Gesamtzahl der KBE bestimmt. So konnten ebenfalls Ergebnisse zu Phagozytose, Überlebensfaktor und Abtötung generiert werden.

Beide Stämme zeigten intrazellulär weniger KBE als die Kontrolle, allerdings zeigten sich keine signifikanten Differenzen (Abbildung 10, Abbildung 11).

3.5.1 Gesamtzahl intrazellulärer Bakterien nach Stimulation

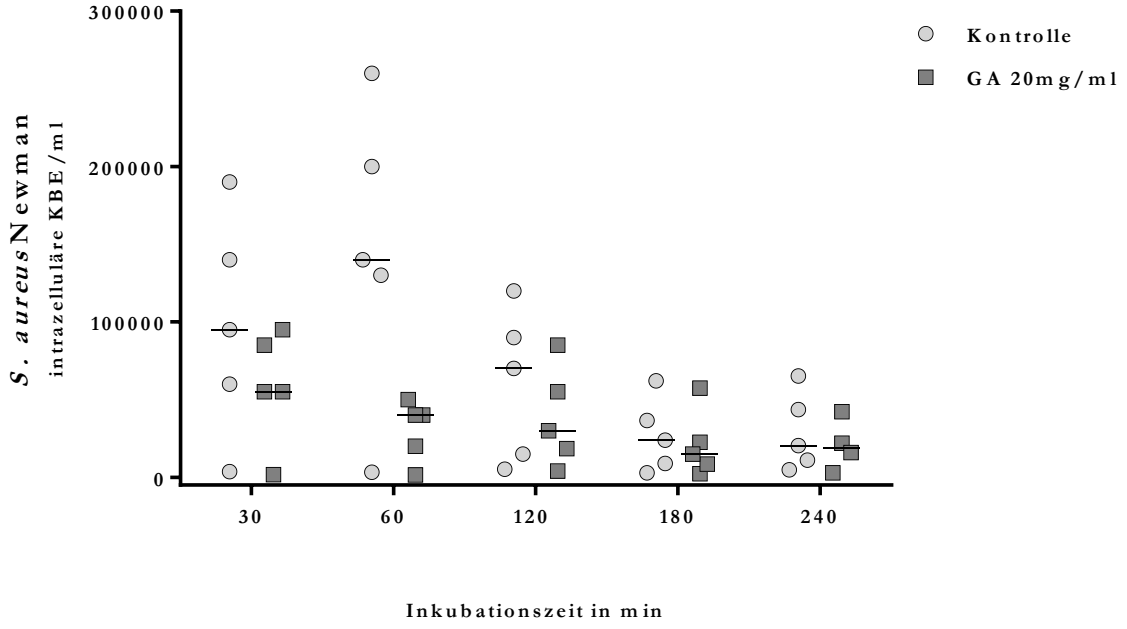
Abbildung 10 zeigt die Zahl der intrazellulären KBE/ml von *S. aureus* USA300 zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Zugabe von Gentamicin zum Vollblut. Abbildung 11 zeigt die Gesamtzahl der ausplattierten KBE/ml des MRSA-Stamms *S. aureus* Newman. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte dieser Bakterienstamm zu jeder Inkubationszeit eine niedrigere Gesamtzahl der KBE, bei *S. aureus* USA300 hingegen konnte dies nur nach 30min Inkubationszeit gemessen werden. Ansonsten zeigte sich hier die Gesamtzahl der KBE höher. Die Werte der Kontrollproben und GA-stimulierten Proben unterscheiden sich jedoch nicht signifikant.

Abbildung 10: Intrazelluläre KBE/ml von *S. aureus* USA300 nach Gentamicinbehandlung durch GA-vorbehandelte Vollblutleukozyten (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre)



Darstellung der Einzelwerte mit Medianen; p≥0,05, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

Abbildung 11: Intrazelluläre KBE/ml von *S. aureus* Newman nach Gentamicinbehandlung durch GA-vorbehandelte Vollblutleukozyten (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre)

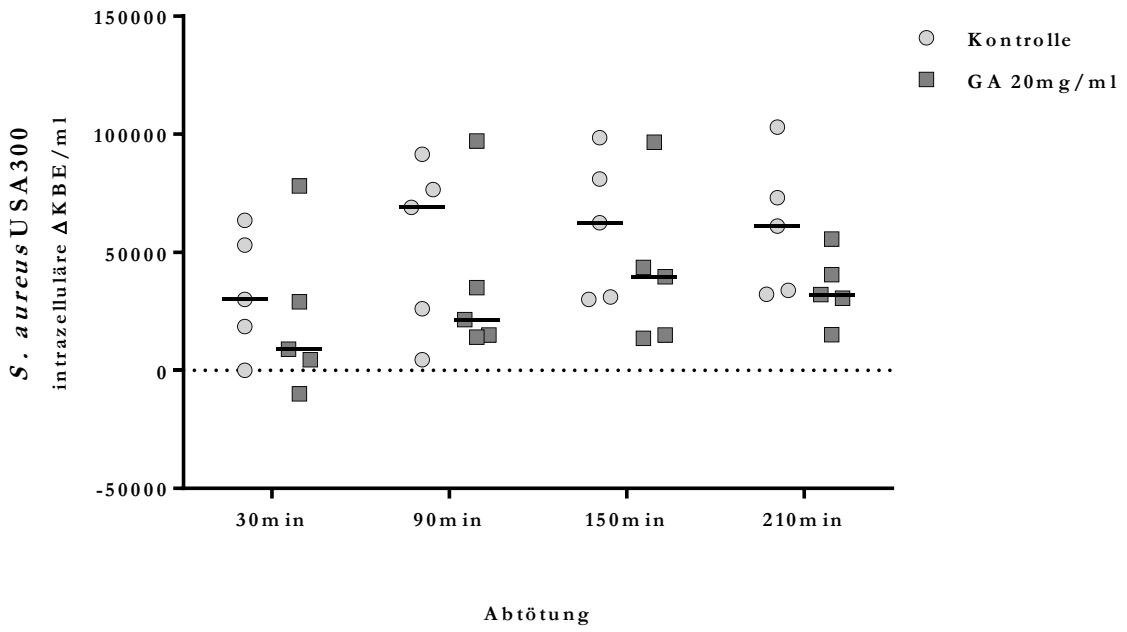


Darstellung der Einzelwerte mit Medianen; p≥0,05, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

3.5.2 Einfluss von GA auf die Abtötung von *S. aureus*

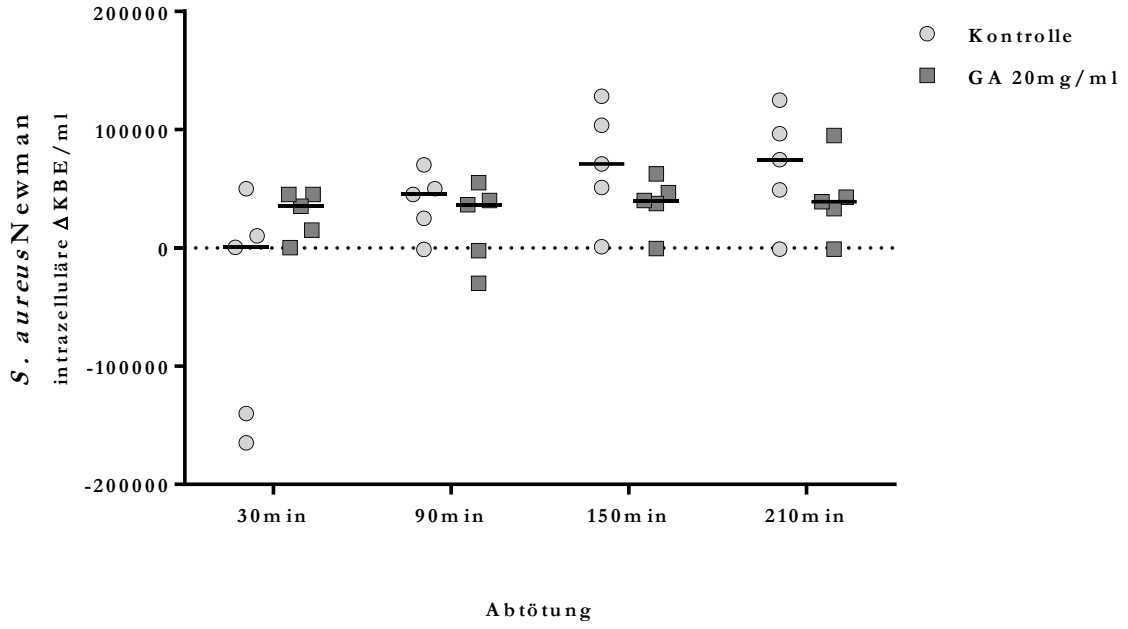
Die Zahl der abgetöteten Bakterien wird aus den Inkubationszeiten 30min und den jeweilig folgenden berechnet (t_{30}-t_x). Gemäß der Reihenfolge sind *S. aureus* USA300 in Abbildung 12 und *S. aureus* Newman in Abbildung 13 dargestellt. Bei beiden Stämmen ist die Zahl der abgetöteten KBE nach Inkubation mit GA weitestgehend geringer als bei der Kontrolle. *S. aureus* Newman bildet nach 30min Inkubationszeit die Ausnahme.

Abbildung 12: Abgetötete Bakterien nach Ko-Inkubation mit *S. aureus* USA300 und Behandlung mit Gentamicin (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre)



Darstellung der Einzelwerte mit Medianen; p≥0,05; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*

Abbildung 13: Abgetötete Bakterien nach Ko-Inkubation mit *S. aureus* Newman und Behandlung mit Gentamicin (n=5, junge Probanden 20-35 Jahre).

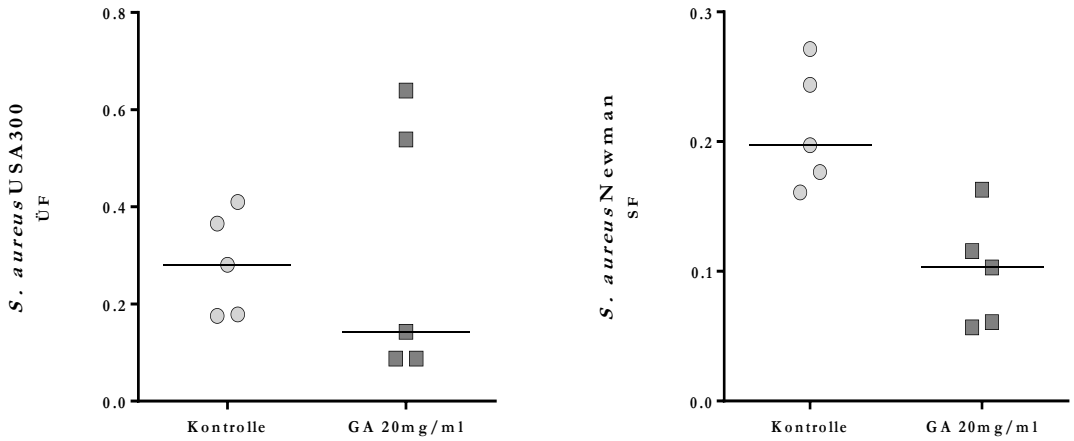


Darstellung der Einzelwerte mit Medianen; p≥0,05; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*

3.5.3 Veränderung des ÜF von *S. aureus* durch GA

Bei beiden Stämmen sind die ÜF bei der Kontrolle und GA unter 1. Bei *S. aureus* USA300 liegt der Median der Kontrolle bei 0,2807, der Median von GA bei 0,1429. Bei *S. aureus* Newman liegen die Mediane bei 0,1973 (Kontrolle) und 0,1029 (GA). Es findet somit eine Abtötung der Bakterien statt.

Abbildung 14: Überlebensfaktor von *S. aureus* nach GA-Vorbehandlung, wie folgt berechnet ÜF=t_{30}/t_0. t_0 als Zeitpunkt an dem *S. aureus* zum Blut hinzugefügt wurde, t_{30} nach 30min Ko-Inkubation



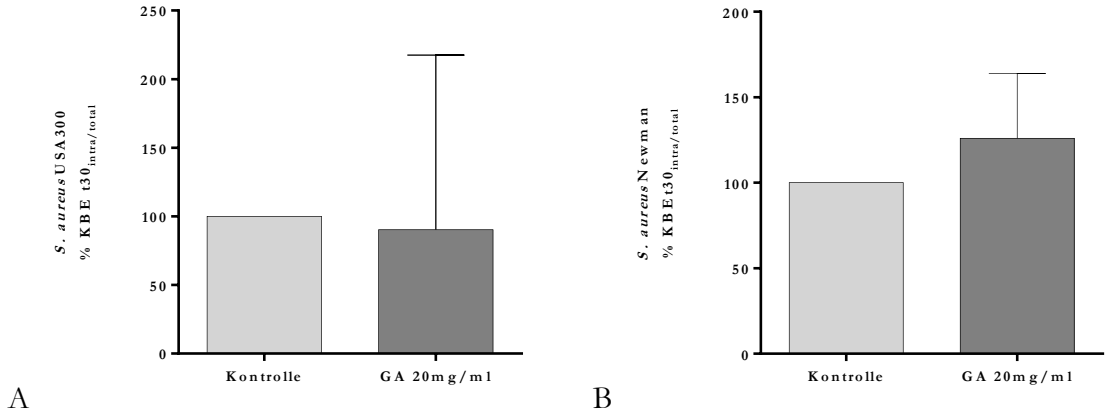
S. aureus USA300 (A) und *S. aureus* Newman (B), ÜF<1: Phagozytose>Vermehrung, ÜF=1: Phagozytose=Vermehrung, ÜF>1: Phagozytose<Vermehrung. Darstellung der Einzelwerte mit Median; p>0,05, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*

3.5.4 Darstellung des Einflusses von GA auf die Phagozytose

Auf Grundlage der vorher dargestellten Ergebnisse kann die Frage, inwiefern GA die Phagozytose beeinflusst, nicht sicher beantwortet werden. Die Zahl der intrazellulär gemessenen KBE, nach Inkubation mit GA, stellt sich bei *S. aureus* USA300 nach 30min Gentamicingabe, bei *S. aureus* Newman im Gesamten, im Vergleich zur Kontrolle als verringert dar. Der ÜF mit einem Wert unter 1 bei beiden Stämmen indiziert eine deutlich gesteigerte Abtötung. Somit besteht die Vermutung, dass innerhalb der ersten 30 Minuten vermehrt extrazelluläre Bakterien abgetötet wurden.

Beim Vergleich der normalisierten gesamt KBE nach GA-Behandlung mit den intrazellulären KBE nach 30-minütiger Gentamicinbehandlung wird deutlich, dass ähnlich viele lebende Bakterien durch die Kontroll- und die GA-behandelten Phagozyten aufgenommen wurden. Die Abtötung von Bakterien durch GA in den ersten 30 Minuten der Inkubationszeit wird hierbei berücksichtigt, da die Anzahl an KBE nach GA-Inkubation als Ausgangswert verwendet wird (Abbildung 15).

Abbildung 15: Prozentuale Phagozytose-Rate von *S. aureus*



berechneter Median der Quotienten aus den KBE t_{30} und t_{30} intrazellulär normalisiert zur Kontrolle von *S. aureus* USA300, Kontrolle = 100%, GA = 90,28% (A), berechneter Median der Quotienten aus den KBE t_{30} und t_{30} intrazellulär normalisiert zur Kontrolle von *S. aureus* Newman, Kontrolle = 100%, GA = 126% (B)

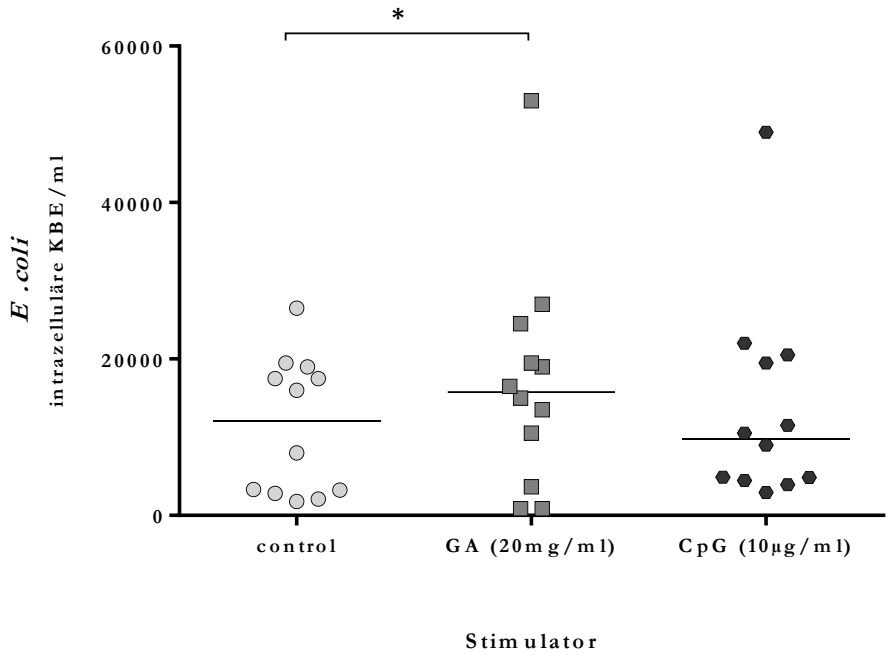
3.6 Reaktion von Leukozyten isoliert aus dem Blut alter Probanden auf die Stimulation mit GA

Zur Evaluation und Untersuchung des Einflusses von GA auf Leukozyten des alten Menschen wurden Phagozytose-Assays, dem Protokoll folgend, mit Vollblut gesunder Probanden über 80 Jahren, durchgeführt. Es wurden Daten zur Phagozytose, der Abtötung, dem Überlebensfaktor und der Zytokinfreisetzung gesammelt.

3.6.1 Phagozytose von *E. coli* K1 durch Leukozyten alter Probanden

Auch bei Probanden, welche älter als 80 Jahre alt sind, zeigte GA eine signifikante Steigerung (p=0,0302) der Phagozytoseleistung. CpG stimulierte bei diesen die Phagozytose nicht (Abbildung 16).

Abbildung 16: Phagozytose von *E. coli* nach 30minütiger Gentamicinbehandlung, 2h Präinkubation mit 0,9% NaCl als Kontrolle, 10µg/ml CpG als Positivkontrolle und 20mg/ml GA (n=12, Probanden >80 Jahre)

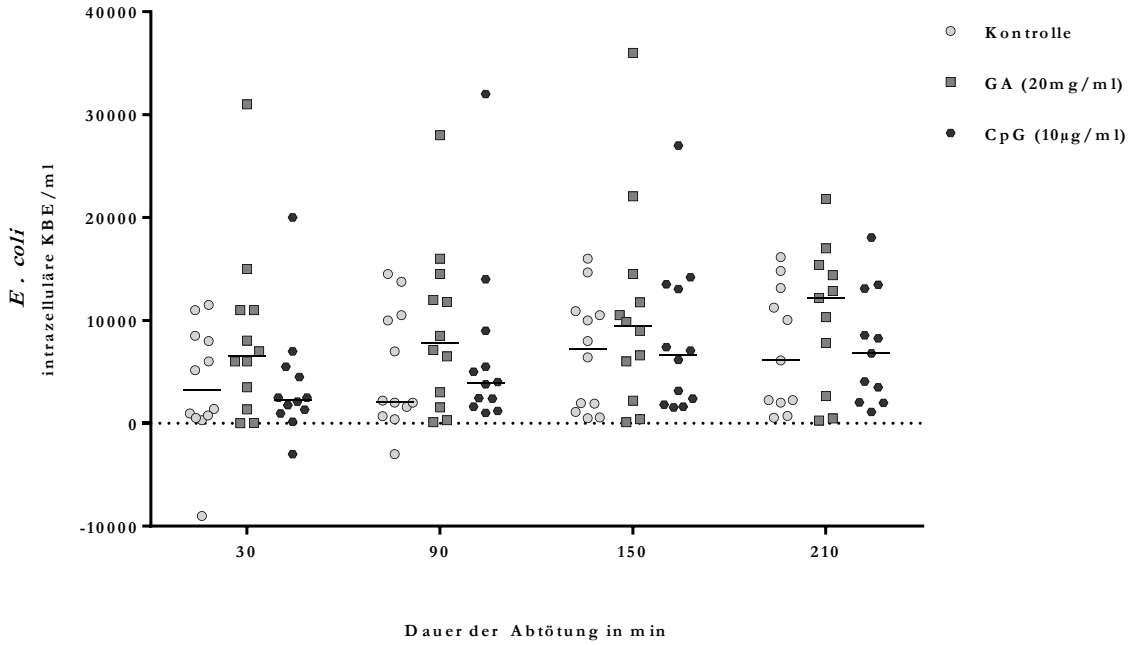


Darstellung der Einzelwerte mit Median; *p<0,05, *Friedman-Test*, anschließender *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur für wiederholtes Testen

3.6.2 Intrazelluläre Abtötung von *E. coli*

Die Ergebnisse zeigen in diesem Versuch keine signifikante Abtötung intrazellulärer Pathogene. Allerdings ist nach 210min intrazellulärer Abtötung eine statistische Relevanz mit einem p=0,0621 zu vermerken (Abbildung 17).

Abbildung 17: intrazelluläre Konzentration von *E. coli* in 30-210min nach Gentamicinzugabe nach vorheriger GA-Inkubation.

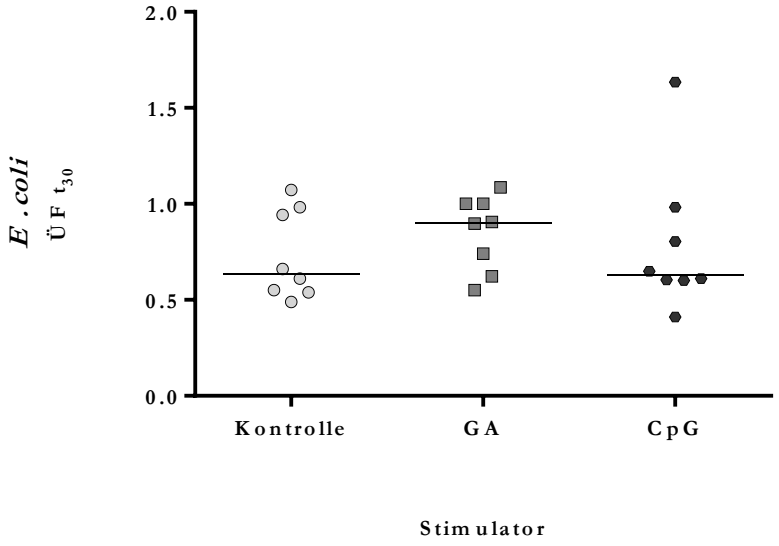


Darstellung der Einzelwerte mit Medianen (n=12, alte Probanden >80 Jahre); p≥0,05, *Friedman-Test*

3.6.3 Einfluss der Stimulatoren auf den ÜF von *E. coli*

Abbildung 18 stellt vergleichend die Mediane der Überlebensfaktoren von *E. coli* ohne Zusatz von GA, nach Präinkubation mit GA oder als Kontrolle mit CpG dar. Während der Median der Kontrolle (0,7437) und der Bakterien, die mit CpG (0,6471) inkubiert wurden, annähernd gleich ist, wiesen die Bakterien, die mit GA vorbehandeltem Blut ko-inkubiert wurden, einen deutlich höheren Faktor auf (0,9015). Eine statistisch signifikante Differenz wurde nicht beobachtet.

Abbildung 18: Überlebensfaktor *E. coli*

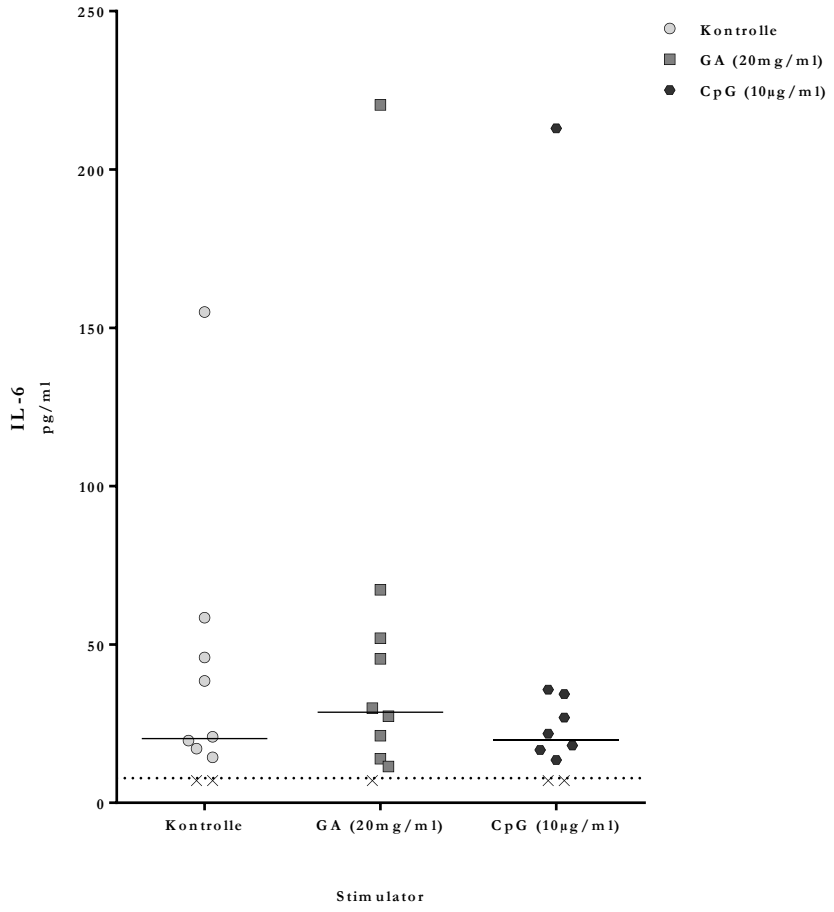


Der Überlebensfaktor von *E. coli* wurde wie folgt berechnet: ÜF= t_{30}/t_0. t_0 als Zeitpunkt an dem *E. coli* zum Blut hinzugefügt wurde, t_{30} nach 30min Ko-Inkubation. ÜF<1: Abtötung>Vermehrung, ÜF=1: Abtötung=Vermehrung, ÜF>1: Abtötung<Vermehrung. Darstellung der Einzelwerte mit Median; $p \geq 0{,}05$, *Friedman-Test*

3.6.4 Ermittlung der Zytokinfreisetzung

Während sich bei der mit ELISA gemessenen IL-6 Konzentration keine signifikanten Differenzen ergaben (Abbildung 19), konnte eine signifikant höhere TNF-α Konzentration nach GA-Stimulation (p=0,0078) gemessen werden (Abbildung 20).

Abbildung 19: IL-6 Konzentration in pg/ml im ELISA gemessen (n=10, alte Probanden >80 Jahre)

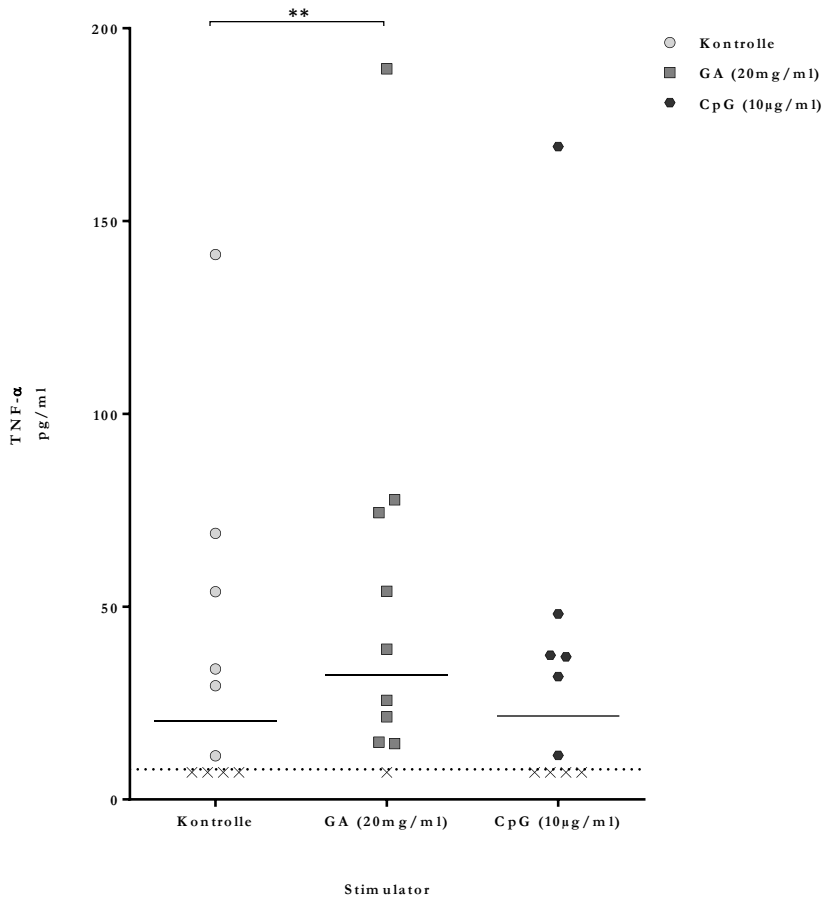


Darstellung der Einzelwerte, der Mediane und der Detektionsgrenze von 7,8pg/ml; p≥0,05, *Friedman-Test*, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur

Tabelle 10: ELISA-Messung IL-6 im Serum alter Probanden

	Kontrolle	GA 20mg/ml	CpG 10µg/ml
25% Perzentile	12,54	13,30	11,88
Median	20,27	28,64	19,96
75% Perzentile	49,06	55,79	34,68

Abbildung 20: TNF-α Konzentration in pg/ml im ELISA gemessen (n=10, alte Probanden >80 Jahre)



Darstellung der Einzelwerte, der Mediane und der Detektionsgrenze von 7,8pg/ml; **p≤0,01, *Friedman-Test*, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* mit Bonferroni-Holm Korrektur

Tabelle 11: ELISA-Messung TNF-α im Serum alter Probanden

	Kontrolle	GA 20mg/ml	CpG 10µg/ml
25% Perzentile	7,000	14,78	7,000
Median	20,41	32,36	21,65
75% Perzentile	57,65	75,19	40,08

Messungen von IL-1ß im ELISA ergaben keine Messwerte oberhalb der Nachweisgrenze. Die Daten konnten nicht ausgewertet werden und werden nicht gezeigt.

4 Diskussion

Die Veränderung der Organfunktion im Laufe des Lebens, einhergehend mit dem Wandel der Funktionsweise des Immunsystems, ist Bestandteil dieser Arbeit. Ältere Patienten weisen somit eher eine höhere Anzahl an Grunderkrankungen auf, welche klassische Symptome hin zu eher schleichenden, atypischen oder unspezifischen Darstellungen abweichen lässt (Samiy 1983). In diesem Zusammenhang steigt die Inzidenz von Infektionskrankheiten (Butcher et al. 2001), welche im schlimmsten Fall tödlich enden können. Die wesentliche Fragestellung war nun, ob das innate Immunsystem von Personen hohen Alters (>80 Jahre) durch immunmodulatorische Substanzen positiv beeinflusst werden kann, damit eine bakterielle Infektion unbeschadeter überstanden und effektiver bekämpft werden kann. Die genutzten Stoffe waren vor allem TLR-Agonisten, welche entsprechend ihres spezifischen Liganden eine äquivalente Immunreaktion induzieren. Vorangegangene Publikationen der Arbeitsgruppe apl. Prof. Dr. Roland Nau – Experimentelle Neuroinfektiologie dienten in diesem Fall als ideengebend. Des Weiteren kam GA als vielversprechender Naturstoff zum Einsatz. Die Ergebnisse, welche im Zuge dieser Arbeit entstanden, werden nachfolgend diskutiert.

4.1 Getestete Konzentrationen zeigen dosisabhängige Wirkung

Zur Evaluierung der ideal nutzbaren Konzentration von GA, war die Arbeit von Baien et al. 2020 richtungsweisend. So konnten sie nach 11,5h, in Abwesenheit eukaryoter Zellen, bei einer Konzentration von 5mg/ml und 20mg/ml eine zeitabhängige Wachstumsinhibierung des untersuchten *E. coli* K1 feststellen. Auch der *oxidative Burst* bei dieser Konzentration war vergleichbar mit dem, welcher nach einer Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) detektierbar war. PMA als Phorbolester mit potentiell neoplastischem Effekt (PubChem) wurde in diesen Versuchen als Positivkontrolle zur Untersuchung der NETs Bildung genutzt. Parallel wurde auch der Effekt auf Gram-positive Bakterien, hier *S. aureus* USA300 und *S. aureus* Newman, in Abwesenheit eukaryoter Zellen, geprüft. Konzentrationen größer 5mg/ml konnten durch die Messung der optischen Dichte eine Wachstumsinhibierung nachweisen, welche sich elektronenmikroskopisch als bakteriostatische Eigenschaft bestätigen ließ. Auch 40mg/ml zeigten im Versuch mit *S. aureus* USA300 eine wachstumsinhibierende Wirkung, welche sich allerdings im Laufe der Inkubationszeit als inkonstant darstellte. In eigenen Vorversuchen sowie nach Rücksprache mit Baien et al. als Kooperationspartner musste außerdem festgestellt werden, dass es bei höheren Konzentrationen des polysacchariden Pulvers zu größer werdenden Schwierigkeiten der Löslichkeit kam. Resultierend wurden 20mg/ml als maximale Konzentration in der Untersuchung einer dosisabhängigen Wirkung

von GA festgelegt. Vitalitätsuntersuchungen bestätigten keine toxische Wirkung auf eukaryote Zellen.

Nach Erhebung der Daten und der Berechnung einer Korrelation nach Pearson ergab sich eine moderate positive Beziehung zwischen der Phagozytose und der GA-Konzentration. Schlussfolgernd hypothetisierten wir den Beginn einer Sigma-Kurve mit Vorhandensein eines exponentiellen Zusammenhanges. Abbildung 2 zeigt die Messwerte in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration. Zur optimaleren Darstellung der x-Achse wurden die Konzentrationen nach Addition mit 1 logarithmiert. Die Abbildung 2 zeigt einen eindeutigen Unterschied ab einer Konzentration von 20mg/ml, im Bereich der niedrigeren Werte ist dieser nicht zu beobachten. Diese Beobachtung stützt die Hypothese eines exponentiellen Zusammenhanges, obschon weitere Messungen im höher konzentrierten Bereich notwendig wären, um dies sicher zu belegen. Bei Annahme eines exponentiellen Zusammenhanges lässt sich folgende Regression schätzen: $y_{KBE/ml} = 6{,}290 * x_{mg/ml}^2 + 4257$.

Eine stärkere Korrelation wäre bei höheren Konzentrationen GAs anzunehmen, was allerdings mit der erschwerten Löslichkeit in Konflikt geraten könnte. Die Entscheidung für ein parametrisches Verfahren bei der Ermittlung des Korrelationskoeffizienten wurde bewusst getroffen, um die quantitativen Unterschiede, besonders im Bereich der niedrigen Konzentrationen, zu berücksichtigen.

4.2 Phagozytose-Assay gibt erste Anhaltspunkte

Ein Vollblut-Assay wurde gewählt, um *ex vivo* ein Modell zu simulieren, welches einem *in vivo* Modell nahekommt, um so mögliche Rückschlüsse auf eine *in-vivo*-Situation ziehen zu können (Cooper et al. 2019), sei es, um eine Bestandsaufnahme der aktuellen Situation zu erhalten oder um Möglichkeiten zu simulieren und zu untersuchen (Durhuus et al. 2021, Vollrath et al. 2021). Des Weiteren können induzierte *in vivo* Zytokinfreisetzungen im Vollblut-Assay präziser als in etablierten Versuchen mit *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) prognostiziert werden (Coch et al. 2013). Neutrophile stellen die größte Gruppe phagozytierender Zellen dar, sodass bei der *ex vivo*-Untersuchung humaner Leukozyten im Vollblut vor allem diese mit ihrer verhältnismäßig kurzen Lebenszeit beachtet werden müssen. Studien wiesen hier auf die *ex-vivo*-Halbwertszeit humaner Neutrophile von ca. 8 Stunden hin (Pillay et al. 2010). Hu 2012 und Reiné et al. 2020 empfahlen im Zuge ihrer Arbeiten, das peripher entnommene Blut von Probanden innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme zu verarbeiten, um z.B. neutrophile Granulozyten aufzureinigen. Die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe Talla et al. 2019 wiesen im Rahmen ihrer Untersuchungen allerdings einen bis zu 50%igen Verlust der Zellintegrität erst

nach einer 24stündigen Inkubationszeit und einen vollständigen Verlust nach 48 Stunden nach, sodass die deutliche Verlängerung der untersuchten *ex vivo*-Lebensdauer neutrophiler Granulozyten eine gewisse Stabilität mit geringerer zeitlicher Anfälligkeit der Vollblut-Assays bedeutet. Die Proben sollten dennoch weiterhin zügig verarbeitet werden, aber Apoptose und Funktionsverlust nehmen somit einen geringeren Stellenwert an.

Das Protokoll des Phagozytose-Assays beruht auf der etablierten Vorgehensweise seiner Art (Santecchia et al. 2022). Gentamicin wurde als Antibiotikum verwendet, das in den eingesetzten Konzentrationen nur geringfügig die eukaryotische Zelle penetriert (Kaneko et al. 2016).

4.3 CpG als Positivkontrolle im jungen Probanden

Faktoren wie Antibiotikaresistenzen, Immunoseneszenz, ein immer höheres Lebensalter oder Immundysfunktion haben einen stetig wachsenden Einfluss auf die Ökonomie und das Gesundheitssystem. Neben der Suche nach neuen Antibiotika (Boyd et al. 2020), Adjuvantien und Impfstoffen (Crooke et al. 2019) gewinnen auch Phytotherapeutika an Bedeutung und erscheinen als recht nebenwirkungsarm vielversprechend (Jiang et al. 2021). Als polysaccharider Komplex war GA Schwerpunkt dieser Arbeit.

CpG als TLR-9 Agonist diente als Positivkontrolle zu GA im *in-vitro*-Experiment. CpG (ODN) 1668 gehört zu der sogenannten B-Klasse der CpG (ODN) und enthält ein optimiertes murines Motiv für die TLR-9 Stimulation (Jurk und Vollmer 2007). In vorangegangen Studien zeigte es eine dosisabhängige Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und die damit einhergehende supprimierte IFN-α Sekretion (Waibler et al. 2008). Des Weiteren stimuliert CpG die Phagozytose von *E. coli* K1 durch aufgereinigte murine Mikroglia (Ribes et al. 2009). Auch in unseren Versuchen konnten wir die gesteigerte Phagozytose von *E. coli* K1 im jungen Probanden bestätigen (Abbildung 5). Nach einer zweistündigen Präinkubationszeit, einer 30 minütigen Ko-Inkubation mit dem gram-negativen Bakterienstamm und einer anschließend folgenden Inkubationszeit von 30min mit Gentamicin in Lösung konnte bei den Personen im Alter von 20 bis 35 Jahren eine erhöhte intrazelluläre Zahl koloniebildender Einheiten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 5). Zwar war die intrazelluläre Abtötung der phagozytierten Bakterien nicht signifikant erhöht, aber die Signifikanzgrenze wurde nur knapp verfehlt (

Abbildung 7). Bei einer größeren Stichprobe könnte diese hin zu einem eindeutigeren Ergebnis beeinflusst werden.

Auch im ELISA bei der Messung von TNF-α und IL-6 kam es zu keiner vermehrt messbaren Sekretion, was an der Zeitspanne der Inkubation liegen könnte. Ribes et al. 2009 und Dieselberg et al. 2018 inkubierten ihre murinen Mikrogliazellen jeweils für 24 Stunden mit den jeweiligen TLR-Agonisten, darunter CpG. Waibler et al. 2008 inkubierten ihre Zellen in Teilversuchen für eine Stunde mit CpG, ließen die Zellen im Anschluss allerdings für weitere 23 Stunden in frischem Medium ruhen. Alle Publikationen arbeiteten im murinen Modell mit aufgereinigten Zellen. Die Möglichkeit der Freisetzung dieser pro-inflammatorischen Zytokine im humanen Vollblut-Assay kann somit nicht ausgeschlossen werden, bedürfte allerdings einer Modifikation des Protokolls mit einer deutlichen Verlängerung der Präinkubationszeit auf bis zu 24h, was allerdings in Konflikt mit dem *ex vivo* Überleben der neutrophilen Granulozyten gerät, sodass ein Kompromiss zwischen der Überlebenszeit neutrophiler Granulozyten und der Messung von Zytokinen gefunden werden sollte. Zusätzlich stellt die Nutzung eines humanen CpG-Motivs eine weitere Variable dar.

Beachtet man den natürlichen Alterungsprozess des Immunsystems, stellen sich die Ergebnisse der Altersgruppe über 80 Jahre als nicht außerordentlich überraschend dar. Zwar steigt die Zahl hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark, welche sich eher in myeloische Progenitorzellen differenzieren, sodass letztendlich die Zahl der Immunzellen des innaten Immunsystems steigt, allerdings geht dies mit der stetigen Abnahme ihrer Funktionalität einher. Resultierend kann dieser Teil des Immunsystems zum einen nicht mehr adäquat auf Pathogene reagieren und zum anderen nicht mehr angemessen mit dem adaptiven Immunsystem kommunizieren (Bulut et al. 2020). Konträr zu den Ergebnissen der jungen Probandengruppe konnten die Proben der Gruppe über 80 Jahre nach Stimulation mit CpG keine Signifikanzen erreichen (Abbildung 16). Die altersabhängige Abnahme der Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen steht hierbei im Fokus (Weiskopf et al. 2009). Auch im ELISA konnten keine signifikanten Erhöhungen der Zytokine TNF-α und IL-6 gemessen werden (Abbildung 19, Abbildung 20).

4.4 GA beeinflusst die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von *E. coli*

GA führte zu einer signifikanten Zunahme der ROS-Produktion nach Zugabe, was resultierend die Phagozytose steigerte (Baien et al. 2020). In beiden Probandengruppen steigerte GA die Phagozytose von *E. coli* durch die Vollblutleukozyten signifikant (Abbildung 5, Abbildung 16); die intrazellulären Bakterien wurden effektiver abgetötet

Abbildung 7). Hervorzuheben sei, dass es in beiden Probandengruppen zu keiner signifikanten Abtötung in den gemessenen Zeiträumen kam und somit GA keinen signifikanten Effekt zeigte

Abbildung 7, Abbildung 17). Allerdings weisen die p-Werte bei jungen Probanden nach 30min (p=0,051) und bei alten Probanden nach 210min (p=0,0621) Annäherungen an die Signifikanzgrenze p<0,05 auf.

Auch 60min nach Beginn der Antibiotikatherpie mit Gentamicin beim jungen Probanden konnten intrazellulär, im Vergleich zur Kontrolle und dem mit CpG stimulierten Blut, signifikant mehr koloniebildende Einheiten gezählt werden. Grund könnte der hohe Zuckergehalt GAs sein, welcher *E. coli* als ideale Grundlage der Vermehrung dient, was sich in der Betrachtung des Überlebensfaktors offenbart (Abbildung 8). Die erhöhte Bakterienzahl wurde somit direkt durch die gesteigerte Phagozytose der Leukozyten beeinflusst.

Nichtsdestotrotz konnte im ELISA keine signifikante TNF-α und IL-6 Sekretion im Serum junger Probanden gemessen werden, was auch in diesem Fall an der Länge der Inkubationszeit liegen könnte (Xuan et al. 2010). Anders offenbart es sich in der zweiten Probandengruppe. Abbildung 20 zeigt die signifikant erhöhte Messung TNF-α im ELISA. Fraglich ist hierbei ist, ob dies im Zusammenhang mit GA gewertet werden kann oder ob es lediglich eine messbare Auswirkung des „*inflamm-aging*“ ist (Fülöp et al. 2019).

4.5 Extrazelluläre Abtötung von *S. aureus* durch GA beeinflusst

Im Gegensatz zum eher intrazellulär abgetöteten *E. coli* konnte bei den Gram-positiven *S. aureus* Stämmen USA300 und Newman keine erhöhte Phagozytose festgestellt werden (Abbildung 10, Abbildung 11). Durch deren vorwiegend extrazelluläre Bekämpfung durch Phagozyten untersuchten Baien et al. 2020 die dosisabhängige NETs-Bildung nach GA-Stimulation, welche sich nicht bestätigte. Weiterhin ist *S. aureus* USA300 in der Lage, Nukleasen zu bilden, welche den Mechanismus der extrazellulären Abtötung herunterregulieren und die neutrophile Destruktion fördern (Nizet 2010). Gegensätzlich dazu stellten sich die Überlebensfaktoren beider *S. aureus*-Stämme nach GA-Stimulation als erniedrigt dar, was einen Widerspruch zu den intrazellulär gemessenen KBEs darstellt (Abbildung 14); eine statistisch signifikante Differenz blieb aus. Um diese Gegensätzlichkeit zu erklären, wurden die extrazellulär gemessenen Bakterien nach einer 30minütigen Inkubationszeit mit GA mit den intrazellulären Messwerten nach 30 Minuten in ein Verhältnis gesetzt und normalisiert. Hierbei ergeben sich ähnliche Werte zwischen der Kontrolle und der Stimulation mit GA (Abbildung 15). In Zusammenschau mit den intrazellulär gemessenen KBEs, dem ÜF und dieser Berechnung kann

nachgewiesen werden, dass GA die Phagozytose von *S. aureus* nicht inhibierend beeinflusst, aber extrazellulär einen direkten antimikrobiellen Effekt zu haben scheint, wie es Baien et al. 2020 elektronenmikroskopisch festhielten.

4.6 Bisherige Erkenntnisse, zukunftsträchtige und vielversprechende Ideen

Für lange Zeit wurde vermutet, dass das Immungedächtnis ein Charakteristikum des adaptiven Schenkels des Immunsystems darstellt. Forschungen in diesem Bereich konnten in den letzten Jahren allerdings zeigen, dass auch innate Immunzellen und sogar organ- und gewebespezifische Stammzellen anpassungsfähige Eigenschaften zeigen, welche als *„trained immunity"* definiert wurden (Netea et al. 2020). Direkte Infektionen, PAMPs und die Zytokinfreisetzung im Rahmen einer Infektion beeinflussen die epigenetische, transkriptionelle und funktionelle Umprogrammierung von z.B. Phagozyten (Divangahi et al. 2021). Eine erhöhte Kapazität der Zytokinsekretion und der antimikrobiellen Eigenschaften als Folge schaffen so einen unspezifischen Schutz gegenüber neuen Infektionen. Bereits vorhandene Vakzine wie Bacillus Calmette-Guérin (BCG), die oralen Polio Vakzine oder der Masern-Impfstoff wurden z.B. bereits als protektiver Ansatz gegenüber COVID-19 bei älteren Personen vorgeschlagen. Daten der ACTIVATE-Studie belegten, dass eine Vakzinierung älterer Personen mit dem BCG-Impfstoff zu einer erniedrigten Inzidenz von Infektionserkrankungen, insbesondere respiratorischen Infekten, führte (Giamarellos-Bourboulis et al. 2020). Auch längst etablierte Medikamente wie der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen erweisen sich im *in-vitro*-Versuch als vielversprechend. Er steigert die NETs-Freisetzung und verstärkt so die bakterizide Funktion neutrophiler Granulozyten, insbesondere gegenüber *S. aureus* (Corriden et al. 2015). Als problematisch bei synthetischen Medikamenten können sich mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) darstellen. Naturstoffe könnten die Brücke zwischen Modulation und geringeren Nebenwirkungen schlagen.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir den immunmodulatorischen Effekt GAs im jungen und alten gesunden Probanden im *in-vitro*-Versuch belegen. Die Ergebnisse könnten als Grundlage kommender Forschungen dienen. Jiang et al. 2021 hoben in ihrer Publikation unterschiedlichste bioaktive Komponenten pflanzenbasierter Lebensmittel hervor. So wiesen Polysaccharide in Langzeitstudien eine äußerst geringe Toxizität mit wenigen Nebenwirkungen auf. Gesteigerte B- und T-Zellproliferation, erhöhte Serumkonzentrationen der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und IFN-γ sowie eine reduzierte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1ß und TNF-α konnten u.a. definiert werden. Monophosphoryl-Lipid A wirkt

über die Bindung an den TLR-4 Rezeptor virulent und immunologisch aktiv, was Polysaccharide als Adjuvantien in Impfstoffen zur Wirkverstärkung und Steigerung der natürliche Immunreaktion des Körpers interessant macht (Sun et al. 2018). Die Bestimmung der aktiven Komponenten GAs ist nun notwendig, um z.B. die intravenöse Anwendung möglich zu machen. Bereits in der topischen Anwendung als Mundspülung (62,5mg/ml) konnten ähnliche Ergebnisse zu Chlorhexidin, einer chemischen antibakteriellen Mundspüllösung, erzielt werden (Kamal et al. 2021). Neben echtem Süßholz (*Glycyrrhiza glabra)* zeigte GA im Vergleich zu Chlorhexidin keine UAWs wie brennende Missempfindungen, Geschmacksveränderungen, metallischen Geschmack und Pilzinfektionen. Pflanzen der Familie der *Ericaceae*, *Gaultheria procumbens,* wirken auf Grund ihres hohen Gehalts an natürlichen Salicylaten antioxidativ, antiinflammatorisch, senken die ROS-Level und beeinflussen die Zytokinsekretion. Sie dienen so als phytotherapeutische Alternative zur synthetisch hergestellten Acetylsalicylsäure (Michel et al. 2019). Weitere Studien belegten den inhibitorischen Effekt von NADPH Oxygenase-abhängigen Mechanismen durch Extrakte wie *Psidium guajavas, Tamarindus indicas* und *Calendula officinalis'* und die damit einhergehende ROS-Produktion mit PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten (Fernandes et al. 2014).

Vielversprechende Forschungsergebnisse zu natürlich vorkommenden Wirkstoffen in Pflanzen bieten Alternativen zu bereits etablierten Pharmazeutika. Die aktiven Komponenten, welche es herauszufinden gilt, ermöglichen Chancen auf eine *„trained immunity"* für die älteren Individuen der Gesellschaft. Morbidität und Mortalität durch bakterielle Infektionen können gesenkt, der Einsatz von Antibiotika reduziert und Resistenzbildungen im Patienten entgegengewirkt werden. Die Daten dieser Arbeit dienen als Grundlage und sollten durch zukünftige *in-vivo*-Versuche im murinen oder humanen Modell verifiziert werden.

5 Zusammenfassung

GA stimuliert humane Vollblutleukozyten junger (20-35 Jahre) und alter (>80 Jahre) gesunder Personen im *ex-vivo*-Modell, wodurch die Phagozytose gesteigert wird. Eine simultane Stimulation der intrazellulären Abtötung konnte in beiden Probandengruppen nicht bewiesen werden.

Da sich GA in der Literatur als erfolgreich in der topischen Anwendung erwies, ergab sich die Frage, ob sich diese Ergebnisse auf einen systemischen Einsatz übertragen lassen und GA ebenfalls eine antibakterielle Wirkung zeigt. Das Blut wurde gesunden Probanden in den Altersgruppen 20-35 Jahre und über 80 Jahre peripher entnommen, Ein- und Ausschlusskriterien wurden vor Beginn der Versuchsreihen festgelegt. Durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve konnte die Konzentration GAs bestimmt werden, welche eine Stimulation der Vollblutleukozyten erzielte. Restriktion war hierbei die Löslichkeit des polysacchariden Pulvers, sodass höhere Konzentrationen als 20mg/ml nicht getestet werden konnten. Mittels Trypanblaufärbung konnte nachgewiesen werden, dass GA auf eukaryote Zellen nicht zytotoxisch wirkt. Es wurden Daten durch Phagozytose-Assay für den Gram-negativen Stamm *E. coli* K1 und die Gram-positiven Stämmen *S. aureus* USA300 und Newman gesammelt. Als Positivkontrolle setzte sich der TLR-9 Agonist CpG (ODN) 1668 durch. Während GA im jungen und alten Probanden zu einer signifikant erhöhten Zahl phagozytierter KBE von *E. coli* führte, konnte bei *S. aureus* lediglich eine direkte antibakterielle Wirkung vermutet werden. Auf die Phagozytose der Gram-positiven Stämme hatte GA keinen Einfluss. In beiden Probandengruppen wurden nach 2-stündiger Präinkubation mit CpG (ODN) 1668 keine statistisch signifikanten Differenzen gemessen. Die Konzentrationsmessungen der Zytokine TNF-α und IL-6 ergaben lediglich bei TNF-α im alten Probanden eine signifikante Steigerung durch GA-Stimulation. Alle weiteren Messungen im ELISA wiesen keine signifikanten Ergebnisse auf. IL-1ß konnte in keiner Gruppe beweiskräftig gemessen und ausgewertet werden.

Zusammenfassend können im Rahmen dieser Arbeit die immunstimulatorischen Eigenschaften des polysacchariden Naturstoffes GA bestätigt werden. Gleichzeitig inhibiert GA das Wachstum einiger Bakterien. Sowohl diese Arbeit als auch bereits publizierte Daten bieten Grundlage zur Annahme, dass Naturstoffe und bereits vorhandene Impfungen den Weg zu einer fokussierten *„trained immunity"* bereiten könnten. Studien in murinen oder humanen *in-vivo*-Modell sollten zur Verifizierung der Hypothese folgen. Ebenso erweist sich die Suche nach der/den aktiven Komponente/n als zukunftsweisend.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturquellen

Aas V, Lappegård KT, Siebke EM, Benestad HB (1996): Modulation by Interferons of Human Neutrophilic Granulocyte Migration. J Interferon Cytokine Res 16, 929–935

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and Molecular Immunology; in: Cellular and Molecular Immunology, 8. Auflage; Elsevier Saunders, Canada 2015, 13–17; 53-63; 76–77

Abernathy VJ, Webster RO, Dahms TE (1996): C-reactive protein inhibits increased pulmonary vascular permeability induced by fMLP in isolated rabbit lungs. Am J Physiol Heart Circ Physiol 271, H507–H513

Agrawal A, Agrawal S, Gupta S (2007a): Dendritic Cells in Human Aging. Exp Gerontol 42, 421–426

Agrawal A, Agrawal S, Cao J-N, Su H, Osann K, Gupta S (2007b): Altered Innate Immune Functioning of Dendritic Cells in Elderly Humans: A Role of Phosphoinositide 3-Kinase-Signaling Pathway. J Immunol 178, 6912–6922

Agrawal A, Agrawal S, Tay J, Gupta S (2008): Biology of Dendritic Cells in Aging. J Clin Immunol 28, 14–20

Agrawal A, Gupta S (2011): Impact of Aging on Dendritic Cell Functions in humans. Ageing Res Rev 10, 336–345

Al Za'abi M, Al Salam S, Al Suleimani Y, Manoj P, Nemmar A, Ali BH (2018): Gum Acacia Improves Renal Function and Ameliorates Systemic Inflammation, Oxidative and Nitrosative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats with Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. Cell Physiol Biochem 45, 2293–2304

Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K (2008): Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. J Bacteriol 190, 300–310

Bagadia P, Huang X, Liu T, Murphy KM (2019): Shared Transcriptional Control of Innate Lymphoid Cell and Dendritic Cell Development. Annu Rev Cell Dev Biol 35, 381-406

Baien SH, Seele J, Henneck T, Freibrodt C, Szura G, Moubasher H, Nau R, Brogden G, Mörgelin M, Singh M, et al. (2020): Antimicrobial and Immunomodulatory Effect of Gum Arabic on Human and Bovine Granulocytes Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Front Immunol 10, 3119

Baldo BA (2014): Side Effects of Cytokines Approved for Therapy. Drug Saf 37, 921–943

Ballal A, Bobbala D, Qadri SM, Föller M, Kempe D, Nasir O, Saeed A, Lang F (2011): Anti-malarial effect of gum arabic. Malar J 10, 139

Begier EM, Frenette K, Barrett NL, Mshar P, Petit S, Boxrud DJ, Watkins-Colwell K, Wheeler S, Cebelinski EA, Glennen A, et al. (2004): A High-Morbidity Outbreak of Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus among Players on a College Football Team, Facilitated by Cosmetic Body Shaving and Turf Burns. Clin Infect Dis 39, 1446–1453

Bovo F, Lenzi RM, Yamassaki FT, Messias-Reason IJ, Campestrini LH, Stevan FR, Zawadzki-Baggio SF, Maurer JBB (2016): Modulating Effects of Arabinogalactans from Plant Gum Exudates on Human Complement System. Scand J Immunol 83, 314–320

Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW (2020): Metallo-β-Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. Antimicrob Agents Chemother 64, e00397-20, /aac/64/10/AAC.00397-20.atom

Brisse M, Ly H (2019): Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. Front Immunol 10

Bulut O, Kilic G, Domínguez-Andrés J, Netea MG (2020): Overcoming immune dysfunction in the elderly: trained immunity as a novel approach. Int Immunol 32, 741–753

Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM (2001): Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. J Leukoc Biol 70, 881–886

Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD (2008): Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. Br J Nutr 100, 1269–1275

Castelo-Branco C, Soveral I (2014): The immune system and aging: a review. Gynecol Endocrinol 30, 16–22

Chechan RA (2014): The effect of adding Arabic gum in different ratios on some probiotics fermented milk and studying the inhibitory ability against some pathogenic bacteria. Journal of Kerbala University 12, 261–269

Chen LC, Pace JL, Russell SW, Morrison DC (1996): Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. Infect Immun 64, 4288–4298

Clark DT, Gazi MI, Cox SW, Eley BM, Tinsley GF (1993): The effects of Acacia arabica gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. J Clin Periodontol 20, 238–243

Coch C, Lück C, Schwickart A, Putschli B, Renn M, Höller T, Barchet W, Hartmann G, Schlee M (2013): A Human In Vitro Whole Blood Assay to Predict the Systemic Cytokine Response to Therapeutic Oligonucleotides Including siRNA. PLoS ONE 8, e71057

Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, Gonzalez DJ, Nizet V (2015): Tamoxifen Augments the Innate Immune Function of Neutrophils Through Modulation of Intracellular Ceramide. Nat Commun 6, 8369

Crooke SN, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Poland GA (2019): Immunosenescence: A Systems-Level Overview of Immune Cell Biology and Strategies for Improving Vaccine Responses. Exp Gerontol 124, 110632

Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008): The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood 112, 935–945

Diesselberg C, Ribes S, Seele J, Kaufmann A, Redlich S, Bunkowski S, Hanisch U-K, Michel U, Nau R, Schütze S (2018): Activin A increases phagocytosis of Escherichia coli K1 by primary murine microglial cells activated by toll-like receptor agonists. J Neuroinflammation 15, 175

Divangahi M, Aaby P, Khader SA, Barreiro LB, Bekkering S, Chavakis T, van Crevel R, Curtis N, DiNardo AR, Dominguez-Andres J, et al. (2021): Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. Nat Immunol 22, 2–6

Di Lorenzo G, Balistreri CR, Candore G, Cigna D, Colombo A, Colonna Romano G, Colucci AT, Gervasi F, Listí F, Potestio M, Caruso C (1999): Granulocyte and natural killer activity in the elderly. Mech Ageing Dev 108, 25–38

Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RAJ (2009): The ageing immune system: is it ever too old to become young again? Nat Rev Immunol 9, 57–62

Durhuus JA, Rozing MP, Nielsen MK, Molbech CR, Keijzers G, Scheibye-Knudsen M, Rasmussen LJ, Westendorp RGJ, Sørensen TL (2021): EX-vivo whole blood stimulation with A2E does not elicit an inflammatory cytokine response in patients with age-related macular degeneration. Sci Rep 11, 8226

Esposito E, Cuzzocrea S (2013): Palmitoylethanolamide in homeostatic and traumatic central nervous system injuries. CNS Neurol Disord Drug Targets 12, 55–61

Fernandes MRV, Azzolini AECS, Martinez MLL, Souza CRF, Lucisano-Valim YM, Oliveira WP (2014): Assessment of Antioxidant Activity of Spray Dried Extracts of Psidium guajava Leaves by DPPH and Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils. Biomed Res Int 2014, 382891

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard K-P, Lesur O, Khalil A, Dupuis G (2004): Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. Aging Cell 3, 217–226

Fülöp T, Larbi A, Witkowski JM (2019): Human Inflammaging. Gerontology 65, 495–504

Gamal el-din AM, Mostafa AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM, Nagi MN (2003): Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Pharmacological Research 48, 631–635

Gardner JK, Mamotte CDS, Jackaman C, Nelson DJ (2017): Modulation of dendritic cell and T cell cross-talk during aging: The potential role of checkpoint inhibitory molecules. Ageing Res Rev 38, 40–51

Gao Z, Chen Z, Bandô Y, Golberg D, Serizawa T: Functionalization of boron nitride nanotubes for applications in nanobiomedicine. In: Elsevier eBooks. 2016c, 17–40

Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsilika M, Moorlag S, Antonakos N, Kotsaki A, Domínguez-Andrés J, Kyriazopoulou E, Gkavogianni T, Adami M-E, Damoraki G, et al. (2020): Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. Cell 183, 315-323.e9

Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ (2008): Innate immunity and aging. Exp Gerontol 43, 718–728

Heide EC, Bindila L, Post JM, Malzahn D, Lutz B, Seele J, Nau R, Ribes S (2018): Prophylactic Palmitoylethanolamide Prolongs Survival and Decreases Detrimental Inflammation in Aged Mice With Bacterial Meningitis. Front Immunol 9, 2671

Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A (2002): Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. Exp Gerontol 37, 389–394

Hu Y (2012): Isolation of human and mouse neutrophils ex vivo and in vitro. Methods Mol Biol 844, 101–113

Impellizzeri D, Cordaro M, Bruschetta G, Crupi R, Pascali J, Alfonsi D, Marcolongo G, Cuzzocrea S (2016): 2-pentadecyl-2-oxazoline: Identification in coffee, synthesis and activity in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation. Pharmacol Res 108, 23–30

Impellizzeri D, Cordaro M, Bruschetta G, Siracusa R, Crupi R, Esposito E, Cuzzocrea S (2017): N-Palmitoylethanolamine-Oxazoline as a New Therapeutic Strategy to Control Neuroinflammation: Neuroprotective Effects in Experimental Models of Spinal Cord and Brain Injury. J Neurotrauma 34, 2609–2623

Janeway Immunologie. Hrsg. v. Murphy K, Weaver C, 9. Aufl.; Springer Spektrum, Berlin 2018, 97-100; 108-128; 131-139; 145-155

Janský L, Reymanová P, Kopecký J (2003): Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by Borrelia. Physiol Res 52, 6

Jiang L, Zhang G, Li Y, Shi G, Li M (2021): Potential Application of Plant-Based Functional Foods in the Development of Immune Boosters. Front Pharmacol 12, 637782

Jurk M, Vollmer J (2007): Therapeutic Applications of Synthetic CpG Oligodeoxynucleotides as TLR9 Agonists for Immune Modulation: BioDrugs 21, 387–401

Kaddam L, Fadl-Elmula I, Eisawi OA, Abdelrazig HA, Salih MA, Lang F, Saeed AM (2017): Gum Arabic as novel anti-oxidant agent in sickle cell anemia, phase II trial. BMC Hematol 17, 4

Kaneko M, Emoto Y, Emoto M (2016): A Simple, Reproducible, Inexpensive, Yet Old-Fashioned Method for Determining Phagocytic and Bactericidal Activities of Macrophages. Yonsei Med J 57, 283–290

Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A (2020): Treatment options for K. pneumoniae, P. aeruginosa and A. baumannii co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. Infection 48, 835–851

Keppel Hesselink JM, de Boer T, Witkamp RF (2013): Palmitoylethanolamide: A Natural Body-Own Anti-Inflammatory Agent, Effective and Safe against Influenza and Common Cold. Int J Inflam 2013

Khare V, Sodhi A, Singh SM (1996): Effect of aging on the tumoricidal functions of murine peritoneal macrophages. Nat Immun 15, 285–294

Kim YK, Shin J-S, Nahm MH (2016): NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei Med J 57, 5–14

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

Kuai R, Sun X, Yuan W, Ochyl LJ, Xu Y, Najafabadi AH, Scheetz L, Yu M-Z, Balwani I, Schwendeman A, Moon JJ (2018): Dual TLR agonist nanodiscs as a strong adjuvant system for vaccines and immunotherapy. J Control Release 282, 131–139

Lavoie PM, Levy O: 125 - Mononuclear Phagocyte System; in: Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition); hrsg. v. Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW; Elsevier 2017, 1208-1216.e3

Liang SY (2016): Sepsis and other Infectious Disease Emergencies in the Elderly. Emerg Med Clin North Am 34, 501–522

Lim K-H, Staudt LM (2013): Toll-Like Receptor Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 5, a011247

Marre R, Mertens T, Trautmann M, Vanek E: Sepsis; in: Klinische Infektiologie, 1. Auflage; Urban&Fischer, München, Jena 2000, 859–861

Mašek K, Perlík F, Klíma J, Kahlich R (1974): Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin®) in acute respiratory tract infections. Eur J Clin Pharmacol 7, 415–419

Metcalf TU, Wilkinson PA, Cameron MJ, Ghneim K, Chiang C, Wertheimer AM, Hiscott JB, Nikolich-Zugich J, Haddad EK (2017): Human monocyte subsets are transcriptionally and functionally altered in aging in response to pattern recognition receptor agonists. J Immunol 199, 1405–1417

Michel P, Granica S, Magiera A, Rosińska K, Jurek M, Poraj Ł, Olszewska MA (2019): Salicylate and Procyanidin-Rich Stem Extracts of Gaultheria procumbens L. Inhibit Pro-Inflammatory Enzymes and Suppress Pro-Inflammatory and Pro-Oxidant Functions of Human Neutrophils Ex Vivo. Int J Mol Sci 20

Miró-Canturri A, Ayerbe-Algaba R, Vila-Domínguez A, Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Smani Y (2021): Repurposing of the Tamoxifen Metabolites to Combat Infections by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. Antibiotics (Basel) 10, 336

Nau R, Ribes S, Djukic M, Eiffert H (2014): Strategies to increase the activity of microglia as efficient protectors of the brain against infections. Front Cell Neurosci 8, 138

Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JWM, Mhlanga MM, Mulder WJM, et al. (2020): Defining trained immunity and its role in health and disease. Nat Rev Immunol 20, 375–388

Nikolich-Žugich J (2018): The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. Nat Immunol 19, 10–19

Nizet V (2010): Bacteria and Phagocytes: Mortal Enemies. J Innate Immun 2, 505–507

North American Menopause Society (2007): Estrogen and progestogen use in peri- and postmenopausal women: March 2007 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 14, 168–182

Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, Tesselaar K, Koenderman L (2010): In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood 116, 625–627

Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ (2004): Aging and innate immune cells. J Leukoc Biol 76, 291–299

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Gangappa S, Engleman C, Katz JM, Sambhara S (2004): Impaired antigen-induced CD8+ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. Cell Immunol 229, 86–92

Prattichizzo F, Bonafè M, Olivieri F, Franceschi C (2016): Senescence associated macrophages and "macroph-aging": are they pieces of the same puzzle? Aging 8, 3159–3160

Redlich S, Ribes S, Schütze S, Czesnik D, Nau R (2012): Palmitoylethanolamide stimulates phagocytosis of Escherichia coli K1 and Streptococcus pneumoniae R6 by microglial cells. J Neuroimmunol 244, 32–34

Redlich S, Ribes S, Schütze S, Nau R (2014): Palmitoylethanolamide stimulates phagocytosis of Escherichia coli K1 by macrophages and increases the resistance of mice against infections. J Neuroinflammation 11, 108

Reiné J, Rylance J, Ferreira DM, Pennington SH, Welters ID, Parker R, Morton B (2020): The whole blood phagocytosis assay: a clinically relevant test of neutrophil function and dysfunction in community-acquired pneumonia. BMC Res Notes 13, 203

Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch U-K, Hammerschmidt S, Nau R (2009): Toll-Like Receptor Prestimulation Increases Phagocytosis of Escherichia coli DH5α and Escherichia coli K1 Strains by Murine Microglial Cells. Infect Immun 77, 557–564

Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S (2011): LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. Crit Rev Immunol 31, 379–446

Saini ML, Saini R, Roy S, Kumar A (2008): Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). Journal of Medicinal Plants Research 2, 378–386

Samiy AH (1983): Clinical Manifestations of Disease in the Elderly. Med Clin North Am 67, 333–344

Santecchia I, Bonhomme D, Papadopoulos S, Escoll P, Giraud-Gatineau A, Moya-Nilges M, Vernel-Pauillac F, Boneca IG, Werts C (2022): Alive Pathogenic and Saprophytic Leptospires Enter and Exit Human and Mouse Macrophages With No Intracellular Replication. Front Cell Infect Microbiol 12, 936931

Sharma BK, Kakker NK, Bhadouriya S, Chhabra R (2020): Effect of TLR agonist on infections bronchitis virus replication and cytokine expression in embryonated chicken eggs. Mol Immunol 120, 52–60

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315, 801–810

Spreer A, Gerber J, Baake D, Hanssen M, Huether G, Nau R (2006): Antiinflammatory but no neuroprotective effects of melatonin under clinical treatment conditions in rabbit models of bacterial meningitis. J Neurosci Res 84, 1575–1579

Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF: Sepsis-schwere Sepsis-septischer Schock; in: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 8.Auflage; Springer, Heidelberg 2016, 807–810

Sun B, Yu S, Zhao D, Guo S, Wang X, Zhao K (2018): Polysaccharides as vaccine adjuvants. Vaccine 36, 5226–5234

Takeuchi O, Akira S (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell 140, 805–820

Talla U, Bozonet SM, Parker HA, Hampton MB, Vissers MCM (2019): Prolonged exposure to hypoxia induces an autophagy-like cell survival program in human neutrophils. J Leukoc Biol 106, 1367–1379

Vollrath JT, Klingebiel F, Bläsius FM, Greven J, Bolierakis E, Janicova A, Dunay IR, Hildebrand F, Marzi I, Relja B (2021): Alterations of Phagocytic Activity and Capacity in Granulocytes and Monocytes Depend on the Pathogen Strain in Porcine Polytrauma. Front Med (Lausanne) 8, 645589

Waibler Z, Anzaghe M, Konur A, Akira S, Müller W, Kalinke U (2008): Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-α responses by pDC. Eur J Immunol 38, 3127–3137

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009): The aging of the immune system. Transpl Int 22, 1041–1050

Williams LM, Ridley AJ (2000): Lipopolysaccharide Induces Actin Reorganization and Tyrosine Phosphorylation of Pyk2 and Paxillin in Monocytes and Macrophages. J Immunol 164, 2028–2036

Wu D, Hayek MG, Meydani SN (2001): Vitamin E and Macrophage Cyclooxygenase Regulation in the Aged. J Nutr 131, 382S-388S

Xu F, Zhang C, Zou Z, Fan EKY, Chen L, Li Y, Billiar TR, Wilson MA, Shi X, Fan J (2017): Aging-related Atg5 defect impairs neutrophil extracellular traps formation. Immunology 151, 417–432

Xuan NT, Shumilina E, Nasir O, Bobbala D, Götz F, Lang F (2010): Stimulation of mouse dendritic cells by Gum Arabic. Cell Physiol Biochem 25, 641–648

Yung RL, Julius A (2008): Epigenetics, aging, and autoimmunity. Autoimmunity 41, 329–335

6.2 Internetquellen

Aviva Systems Biology Corporation. https://www.avivasysbio.com/technicalresources/elisa/kit-types; abgerufen am 29.01.2024

Ältere Menschen. https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aeltere-Menschen/bevoelkerung-ab-65-j.html; abgerufen am 29.01.2024

Cooper C, II SS, Immunotoxicology, Immunology. https://ddblog.labcorp.com/2019/10/5-different-kinds-of-cytokine-release-assays-weathering-the-storm-cra-post-ii/; abgerufen am 29.01.2024

Deutsche Sepsis-Gesellschaft: Sepsisdefinition. https://www.sepsis-gesellschaft.de/sepsisdefinition/; Zugriff am 12.08.2019

E 414 Gummi arabicum - Lexikon der Zusatzstoffe. https://www.zusatzstoffmuseum.de/lexikon-der-zusatzstoffe/gummiarabicum.html; Zugriff am 03.06.2019

Home | AMR Review. https://amr-review.org/; Zugriff am 10.05.2021

HRP Avidin. https://www.biolegend.com/de-at/products/hrp-avidin-1492?GroupID=BLG3728; Zugriff am 04.06.2022

Human Fc gamma RI/CD64 Antibody MAB1257-100: R&D Systems. https://www.rndsystems.com/products/human-fcgamma-ri-cd64-antibody-101_mab1257; Zugriff am 11.07.2019

Overview of ELISA | Thermo Fisher Scientific - IE. https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa; Zugriff am 29.01.2024

PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/27924; Zugriff am 28.04.2021

The body's first line of defence. https://www.sciencelearn.org.nz/resources/177-the-body-s-first-line-of-defence; Zugriff am 24.05.2019

Danksagung

Dank geht an meinen Doktorvater Professor Roland Nau für den strengen Blick auf die Versuchsdaten inklusive der Auswertung mit stetigem Anspornen zu einer größeren Stichprobe und besserer Leistung. Auch meinem Zeitbetreuer Professor Helmut Eiffert möchte ich meinen Dank aussprechen. Die ruhige Kompetenz mit einem stetigen Lächeln auf den Lippen und der Beihilfe aus dem Hintergrund. Von der Erde gegangen – im Herzen geblieben. Ein Abschied, aber kein Vergessen.

Weiterhin mit größtem Dankgefühl meiner Betreuerin Dr. Jana Seele für ihre geduldige Unterstützung bei jeder Unsicherheit, zur Ausarbeitung der Details und für den letzten kritischen Blick auf die Arbeit. Ohne sie wäre die Arbeit mühsamer, ja fast unmöglich gewesen. Eine Bereicherung für jede Promotion, jedes Labor, jede Arbeitsgruppe. Liebe Jana, ich hätte mir niemand anderen wünschen können. Danke für alles!

Mit Hinblick auf die gemeinsamen Publikationen möchte ich auch der Arbeitsgruppe unter Maren von Köckritz-Blickwede der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover für die positive Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen.