

Philippe Fouchard
Dr. med.

„Von neutrophilen Granulozyten und *Staphylokokkus epidermidis* – oder wie das Immunsystem bakterielle Biofilme erkennt und zerstört“

Immunologie

Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Gertrud Maria Hänsch

Anders als jahrzehntlang angenommen liegt die überwiegende Anzahl der Bakterien in der Natur nicht in freischwimmender, planktonischer Form, sondern in organisierten und komplexen Gemeinschaften vor. Die in diesen Gemeinschaften existierenden Bakterien unterscheiden sich dabei durch ihre umfassend veränderte Gen-Expression von ihren planktonischen Verwandten. Diese als „Biofilm“ bezeichnete Gemeinschaft schützt enthaltene Bakterien auf besondere Art und Weise vor schädlichen Umwelteinflüssen, wie etwa Trockenheit, Desinfektionsmitteln und Antibiotika. Aufgrund dieser Vorteile ist es wenig überraschend, dass viele Bakterien, Pilze und auch Archaea zur Biofilm-Bildung befähigt sind.

Biofilme bestehen dabei aus Bakterien, die miteinander durch die von den Bakterien produzierte extrazelluläre polymerische Substanz verbunden ist. Diese stellen dabei eine heterogene, von den Umgebungsbedingungen abhängige Mischung aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, Teichonsäuren und extrazellulärer DNA dar. Im medizinischen Kontext spielt dabei vor allem die Besiedelung von künstlichen, in den Körper eingebrachten Fremdkörpern eine große Rolle. Diese Fremdkörper umfassen das ganze Spektrum an medizinischen Fremdkörpern und sind eine Prädispositionsstelle für Infektionen, die auch noch Jahre nach Einbringung in den Körper auftreten können. Im Biofilm sind Bakterien dabei nicht nur vor Antibiotika, sondern auch vor dem menschlichen Immunsystem geschützt, weswegen die Infektion von Implantaten häufig nur durch deren Entfernung erfolgreich therapiert werden kann.

Allerdings ist dieser Schutz der Bakterien vor dem Immunsystem nicht vollständig, unter anderem können polymorphkernige neutrophile Granulozyten Biofilme erkennen und bekämpfen. Diese Leukozyten stellen dabei die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems dar und können eindringende Mikroorganismen durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Phagozytose und die Freisetzung von in Granula gespeicherten antimikrobiellen Molekülen neutralisieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, polymorphkernige neutrophile Granulozyten aktivierende Entität(en) eines *S. epidermidis*-Biofilmes zu identifizieren. Nach Etablierung verschiedener Aktivitätsparameter konnte durch Verdauung mit Trypsin und Fällung mit Trichloressigsäure gezeigt werden, dass die Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten proteinvermittelt ist. Um die gesuchte Entität näher eingrenzen zu können, wurde anschließend versucht, durch Adsorptions-Experimente die Größe des Bindungspartners von biotinylierter extrazellulärer polymerischer Substanz einzugrenzen. Nachdem dieser Ansatz scheiterte, wurden verschiedene, in der Literatur für die Erkennung bakterieller Bestandteile beschriebene, Rezeptoren auf ihre Bedeutung für die Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten durch die verwendete extrazelluläre polymerische Substanz hin untersucht. Durch die Verwendung von blockierenden Antikörpern konnte dabei Toll-like-Rezeptor 4 als möglicher involvierter Rezeptor identifiziert werden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Lipopolysaccharid

auszuschließen, wurde die Menge an Lipopolysaccharid in der extrazellulären polymerischen Substanz bestimmt und anschließend gezeigt, dass die nachgewiesenen Mengen keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten hatten.

Im nächsten Schritt wurde versucht, verschiedene bekannte Toll-like Rezeptor 4 Liganden in der extrazellulären polymerischen Substanz nachzuweisen. So konnten GroEL und DnaK, beides bakterielle Hitzeschockproteine, nachgewiesen werden. Die Stimulation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten mit rekombinantem DnaK führte nicht zu einer bedeutenden Aktivierung, nach Immunadhäsion von DnaK kam es allerdings teilweise zu einem Anstieg der Aktivität. DnaK scheint also weniger aktivierend als vielmehr hemmend auf polymorphkernige neutrophile Granulozyten zu wirken. Für rekombinantes GroEL zeigte sich allerdings eine Dosis-abhängige Wirkung auf die CD11b-Expression und die Produktion von extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies, GroEL konnte polymorphkernige neutrophile Granulozyten also direkt aktivieren. GroEL stellt also eine aktivierende Entität für polymorphkernige neutrophile Granulozyten dar, DnaK scheint eher immunosuppressiv zu wirken.