

**Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Anästhesiologie
Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Michael Georgieff**

**Sektion Experimentelle Anästhesie
Prof. Dr. rer. nat. Marion Schneider**

**Subpopulationsanalyse dendritischer Zellen
bei Sepsis, septischem Schock
und Hyperinflammationssyndromen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**eingereicht von
Helena Berzaj
aus
Ludwigsburg
2012**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. E. Marion Schneider

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen M. Steinacker

Tag der Promotion: 24.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1 Dendritische Zellen.....	1
1.1.1 CD14.....	3
1.1.2 TLR-2 und TLR-4	3
1.1.3 CD83.....	4
1.1.4 CD163.....	4
1.1.5 CD1	4
1.1.6 HLA-DR.....	4
1.1.7 CD123.....	5
1.1.8 HLA-DR ⁺ /CD123 ⁺	5
1.1.9 BDCA-2.....	5
1.1.10 CD39.....	6
1.1.11 CD64.....	6
1.1.12 CD80 und CD86	6
1.1.13 PDL-2.....	7
1.1.14 CD40.....	7
1.2 Hämophagozytische Lymphohistiozytose	8
1.3 Sepsis	10
1.4 Tumor.....	15
1.5 Fragestellung	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Patientengut.....	17
2.2 Blutprobenaufbereitung	18
2.3 Durchflusszytometrie	19
2.4 Statistische Auswertung	22
3. Ergebnisse	23

3.1 Kruskal Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test für die einzelnen Marker	23
3.2 Relative Anteile von Monozyten in dem untersuchten Patientenmaterial	43
3.3 Relative Anteile von Lymphozyten in dem untersuchten Patientenmaterial	44
4. Diskussion.....	47
4.1 CD14.....	47
4.2 TLR-2 und TLR-4	48
4.3 CD83.....	50
4.4 CD163.....	51
4.5 CD1a.....	52
4.6 HLA-DR.....	53
4.7 CD123.....	54
4.8 HLA-DR ⁺ /CD123 ⁺	55
4.9 BDCA-2.....	55
4.10 CD39.....	56
4.11 CD64.....	56
4.12 CD80 und CD86.....	58
4.13 PDL-2.....	60
4.14 CD40.....	61
4.15 Relative Anteile von Monozyten und Lymphozyten in dem untersuchten Patientenmaterial	62
4.16 Schlussfolgerung.....	63
5. Zusammenfassung.....	64
6. Literaturverzeichnis	66
Danksagung.....	79

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige Zellvermittelte Zytotoxizität
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BDC	Blood Dendritic Cell
CA	Carcinom
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
CLP	lymphoide Vorläuferzelle
CMP	myeloide Vorläuferzelle
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FHL	familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulocyte-Makrophage-Colony Stimulating Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
ICOS	induzierbarer stimulatorischer Ligand
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	Inhibitor of Nuclear Faktor-KappaB-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase
LPB	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAS	Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom

mCD	membrangebundenes CD
MD-2	Lymphocyte antigen 96
mDC	myeloide dendritische Zelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NF-κB	Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood mononuclear cells
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PD-L	Programmed Death-Ligand
PE	Phycoerythrin
PEComa	Perivascular Epithelioid Cell Tumour
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
SAG	Super Antigen
sCD	soluble CD
sHLH	sekundäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
SRCR	Scavenger Receptor Cystein Rich
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
TH1	T-Helfer 1 Zelle
TH2	T-Helfer 2 Zelle
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Receptor Associated Factors
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. EINLEITUNG

1.1 DENDRITISCHE ZELLEN

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen. Diese sternförmigen Zellen wurden bereits im späten 19. Jahrhundert von Paul Langerhans, der sie in der Epidermis entdeckte, beschrieben. Er hielt sie damals für neuronale Hautzellen. 1973 wurden diese Immunzellen von Steinman und Cohn in der murinen Milz wieder entdeckt und aufgrund ihrer Morphologie dendritische Zellen (DC) benannt (Steinman et al. 1973). Sie sind die einzigen Zellen, welche in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren (Steinman et al. 1974) und sind aufgrund dessen und ihrer äußerst interessanten Aufgaben und Funktionen nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung.

Treffen dendritische Zellen, bzw. Vorläufer-DC auf angreifende Pathogene, werden diese aufgenommen und prozessiert. Sie wandern mit ihnen in die lymphatischen Organe und initiieren die primäre adaptive Immunantwort, indem sie kostimulatorische Moleküle exprimieren und Zytokine sezernieren. Von allen professionellen APC sind die dendritischen Zellen diejenigen, welche in der Lage sind, die meisten T-Zell-Antworten zu induzieren. Sie stellen durch die Verbindung von Antigenpräsentation und Phagozytose das Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr dar (Chauvin et al. 2008). Des Weiteren sind sie bedeutend in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen und die Initiatoren spezifischer Immunantworten (Rossi et al. 2005).

Es gibt weder im humanen noch im murinen System eine allgemein anerkannte Klassifikation dendritischer Zellen, auch hinsichtlich der Entwicklung und des Ursprungs der verschiedenen Subpopulationen gibt es diverse Modelle, aber keine einheitliche Meinung.

Im menschlichen Blut wurden anhand der CD11c - Expression zwei unterschiedliche Subpopulationen dendritischer Zellen beschrieben – die myeloiden CD11c⁺ - DC (mDC) und die plasmazytoiden CD11c⁻ - DC (pDC), welche entweder der myeloiden oder der lymphoiden Abstammungslinie entspringen (Penna et al. 2002).

1. Einleitung

Die Bildung dendritischer Zellen erfolgt aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die CD34⁺ hämatopoetische Stammzelle differenziert zur myeloiden (CMP) und lymphoiden Vorläuferzelle (CLP). Aus diesen entwickeln sich die myeloiden pre-DC1 und die lymphoiden pre-DC2. Nach Antigenkontakt erfolgt die Reifung und Differenzierung zu myeloiden DC1 und lymphoiden DC2 (Liu 2001). Durch in vitro-Kultivierung mit GM-CSF und TNF- α ist es aber auch möglich, aus Vorläuferzellen reife dendritische Zellen zu generieren (Robinson et al. 1999, Ryncarz et al. 1998).

Aus der CMP entwickeln sich auch späte CD34⁺CLA⁺ und CD34⁺CLA⁻ Progenitorzellen und differenzieren dann zu CD11c⁺CD1a⁺ Langerhans-Vorläufer, bzw. CD11c⁺CD1a⁻ interstitiellen dendritischen Vorläuferzellen und migrieren in die Epidermis, Dermis und ins interstitielle Gewebe. Myeloide DC zirkulieren im peripheren Gewebe, in den sekundären lymphatischen Organen und im Blut. Die Entwicklung bis dahin erfolgt unabhängig von Antigeneinfluss. Kommt es zu Antigenkontakt wandern die unreifen Langerhans-, bzw. interstitiellen DC in die Lymphknoten, initiieren die primäre Immunantwort (Liu 2001) und sezernieren dort große Mengen IL-12 (Banchereau et al. 1998).

Kushwah et al. klassifizieren dendritische Zellen in konventionelle und nicht-konventionelle dendritische Zellen. Die konventionellen DC's stammen von gemeinsamen DC-Progenitorzellen und pre-DC-Populationen ab und können ferner in Wander- und Lymphoide DC's unterteilt werden. Die nicht-konventionellen DC's werden in plasmazytoide DC's, welche von pre-DC-Populationen abstammen und in von Monozyten stammende DC's klassifiziert, welche in peripheren Geweben zu finden sind (Kushwah et al. 2011).

Plasmazytoide Zellen wurden aufgrund ihrer Morphologie so benannt. Sie machen nur etwa 0,2-1,5% zirkulierender weißer Blutzellen aus und sind im Knochenmark, im Blut, in der Milz, in den Lymphknoten, im Thymus sowie in der Leber zu finden. Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren, ebenso wie myeloide dendritische Zellen, MHC-II (O'Doherty et al. 1994). Des Weiteren ist die Expression der Oberflächenmarker BDCA2, BDCA4, CD4, CD45RA und CD123 charakteristisch für pDC (Romani et al. 2003). Werden pDC viral stimuliert, kommt es zur Sekretion von IFN- α und IFN- β (Siegal et al. 1999, Cella et al. 1999). Des Weiteren sind sie in der Lage auch andere Zytokine wie z.B. IL-6, IL-8, IL-12, IP-10 und TNF- α zu produzieren (Krug et al. 2001b, Hochrein et al. 2002).

Immunphäotypisierung mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometer und monoklonaler, fluoreszenzmarkierter Antikörper können Differenzierungsantigene (CD = Cluster of Differentiation = „Unterscheidungsgruppen“) auf der Zelloberfläche nachgewiesen und die Expression analysiert werden. Nachfolgend sind die von uns untersuchten Oberflächenmarker kurz beschrieben.

1.1.1 CD14

CD14 ist eine Komponente des angeborenen Immunsystems und wurde 1982 auf dem Leukozytenworkshop als erster Oberflächenrezeptor beschrieben. Die CD14-Expression ist auf Monozyten und Makrophagen besonders stark; Neutrophile Granulozyten exprimieren dieses Oberflächenantigen in wesentlich geringerem Maße.

Das Immunsystem erkennt Bakterien und deren Zellwandkomponenten mittels verschiedener Rezeptoren. CD14 wurde zunächst als Rezeptor für LPS Gram-negativer Bakterien entdeckt. Mittlerweile hat man jedoch herausgefunden, dass CD14 nicht nur LPS, sondern auch diverse andere mikrobielle Komponenten, wie z.B. Peptidoglykane (PGN) Gram-positiver Bakterien, Lipoproteine der Spirochäten und andere erkennen kann (Dziarski et al. 2000).

1.1.2 TLR-2 UND TLR-4

TLR-2 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, TLR-4 von Monozyten und B-Zellen exprimiert. Toll-Like-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr des Menschen. Sie sind Mitglieder der TLR (Toll/Interleukin-1 [IL-1]-Rezeptor)- Superfamilie mit charakteristischen Leuzin-reichen Repeats in der extrazellulären Domäne, der TLR intrazellulären Signal-Domäne und ihrer Antwort auf pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP's) von Bakterien, Viren und Pilzen (Lowe et al. 2006). Sie sind essentiell für die mikrobielle Erkennung von Pathogenen und für die Wirtsabwehr. Sie erkennen Bakterien, bzw. deren Zellwandkomponenten und setzen Signaltransduktionswege in Gang, an deren Ende NF- κ B die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und vor allem IL-8 aktiviert. Ebenso werden kostimulatorische Moleküle induziert.

1.1.3 CD83

Das transmembrane Glykoprotein CD83 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie. Da seine Oberflächenexpression kennzeichnend für reife dendritische Zellen ist, wird er als hochspezifischer Reifemarker für diese Zellen benutzt (Kretschmer et al. 2009). CD83 wird in dreierlei molekularen Massen exprimiert; 22, 37 und 50 kDa und das Molekulargewicht ist abhängig von der Glykolisierung. Die 37 kDa-Form auf Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, reife dendritische Zellen exprimieren hauptsächlich 50 kDa (Cao et al. 2005).

1.1.4 CD163

CD163, auch als M130 bezeichnet, ist ein Mitglied der SRCR (scavenger receptor cystein-rich)- Familie und wird auf Zellen der Monozytenlinie exprimiert (Buechler et al. 2000a). Es scheint eine Schlüsselrolle im Wundheilungsprozess, der Antiinflammation und der Clearance des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes zu spielen. Es gibt eine gelöste (sCD163) und eine membrangebundene Form (mCD163) des CD163.

1.1.5 CD1

CD1 sind der dritte Typ Antigen-präsentierender Moleküle, welche mit den MHC-Molekülen der Klasse I und Klasse II entfernt verwandt sind. Sie wurden erstmals auf kortikalen Thymozyten beschrieben, mittlerweile hat man aber festgestellt, dass sie auch auf antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, aktivierten Monozyten und B-Zellen exprimiert werden (Gregory et al. 2000).

1.1.6 HLA-DR

HLA-DR stellt ein MHC-Klasse-II-Molekül dar und wird auf antigenpräsentierenden Zellen, aktivierten T-Lymphozyten und B-Zellen exprimiert. Es spiegelt die Abwehrlage und den aktuellen Status des Immunsystems wieder. Das Resultat einer zu niedrigen HLA-DR-Expression sind Immunsuppression und eine reduzierte Immunabwehr. Sind auf den antigenpräsentierenden Zellen zu wenig HLA-DR-Moleküle zu finden, kann man davon ausgehen, dass das Immunsystem nicht ausreichend aktiviert wird.

1. Einleitung

Aufgrund dessen kann die verminderte monozytäre HLA-DR-Expression bei älteren Patienten mit septischem Schock als spezifischer Indikator dienen (Wu et al. 2008).

1.1.7 CD123

CD123, auch bekannt als α -Untereinheit des Interleukin-3-Rezeptors, ist ein 70-kD Glykoprotein und Mitglied der Hämatoopoietin-Rezeptor-Superfamilie (Rapoport et al. 1996). Es wird von den meisten myeloiden Zelllinien, von Epithelzellen, Leydig-Zellen und embryonalen Stammzellen exprimiert. Die α -Untereinheit ist spezifisch für Interleukin-3 und bindet IL-3 mit niedriger Affinität (Sato et al. 1993). Zusammen mit der gemeinsamen β -Kette, welche auch den Interleukin-5- und GM-CSF- Rezeptoren zu Teil ist, bildet er den Interleukin-3-Rezeptor. Durch Interleukin-3 wird die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu myeloiden Progenitor-Zellen reguliert. Außerdem stimuliert es die Proliferation aller myeloischer Zellen (Monozyten, dendritische Zellen, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten). Durch Interferon- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interleukin-1(IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) kann CD123 hochreguliert werden.

1.1.8 HLA-DR⁺/CD123⁺

Dendritische Zellen stellen das Bindeglied zwischen dem erworbenen und dem angeborenen Immunsystem dar.

Im humanen System unterscheidet man derzeit zwei unterschiedliche DC-Vorläuferzellen: pre-DC1 und pre-DC2. Pre-DC1 differenzieren zu myeloiden DCs (DC1s) und pre-DC2 zu plasmazytoiden DCs (DC2s) (Grouard et al. 1997). PDC können anhand ihrer HLA-DR⁺/CD123⁺-Expression ausgemacht werden.

1.1.9 BDCA-2

BDCs (blood dendritic cells) sind eine kleine Subpopulation von Leukozyten und sie stellen weniger als 1% der PBMC (peripheral blood mononuclear cells) dar. BDCA-2, ein neuartiges Typ-II-Transmembran-Glykoprotein, welches aus 213 Aminosäuren besteht und zur Calcium-abhängigen (C-Typ) Lectin-Familie gehört (Dzionic et al. 2002) ist auch ein Signalrezeptor (Dzionic et al. 2001). Es besteht aus einem intrazellulären N-terminalen Ende und nur einer extrazellulären Erkennungsdomäne, welche zur Typ II C-Typ Lektin-Gruppe gehört (Cao et al.

1. Einleitung

2007). Das Molekül ist ein spezifischer Marker der plasmazytoiden dendritischen Zellen.

1.1.10 CD39

CD39, auch bekannt als Ecto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1 oder E-NTPDase 1 wird hauptsächlich auf aktivierten lymphoiden Zellen exprimiert. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass CD39 auch auf Subpopulationen aktivierter NK-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und bestimmten T-Zelllinien exprimiert wird (Maliszewski et al. 1994). Untersuchungen zeigten, dass das 70-100-kDa Protein zwei potentielle transmembranöse Regionen und ein hydrophobes Segment innerhalb der extrazellulären Region hat (Maliszewski et al. 1994). Es hydrolysiert Nukleosid-tri- und diphosphate, jedoch keine Monophosphonukleoside und ist für die Regulierung des extrazellulären Nukleosidlevels wichtig. Weiterhin kann man mittels CD39 regulatorische T-Zellen mit ausgeprägter Suppressorfunktion herausfiltern (Mandapathil et al. 2009).

1.1.11 CD64

CD64 ist ein hoch affiner Fc-Rezeptor und wird auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen Zellen exprimiert (Groselj-Grenc et al. 2008). Nach Bindung von IgG an FcRI kommt es zur Aktivierung phagozytierender Zellen und somit spielt es eine wichtige Rolle in der Beseitigung von Antigenen. Durch inflammatorische Zytokine kann CD64 hochreguliert werden; therapeutisch lässt es sich durch IFN- γ stimulieren. Von der Struktur her unterscheidet Fc γ RI sich von den anderen Fc-Rezeptoren, da der extrazelluläre Abschnitt nicht durch zwei, sondern drei Immunglobulin-ähnliche Domänen gebildet wird.

1.1.12 CD80 UND CD86

Das Oberflächenantigen CD80 wird von aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Es gehört zur B7-Familie und ist synonym als B7-1 bekannt. Das Glykoprotein CD86 ist ebenfalls Mitglied der B7-Familie, welche an die CD28 Rezeptorfamilie auf Lymphozyten bindet und dadurch die Immunantwort mittels kostimulatorischer und koinhibitorischer Signale reguliert. Zur B7-Familie gehören sieben Mitglieder: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ICOS-L (induzierbarer stimulatorischer Ligand), PD-L1 (programmed death-1 ligand), PD-

1. Einleitung

L2 (programmed death-2 ligand), B7-H3 und B7-H4. Sie haben extrazelluläre IgV und IgC Domänen, welche den variablen und konstanten Domänen der Immunglobuline ähneln und sind transmembran- oder glycosylphosphatidylinositol (GPI) vernetzt (Collins et al. 2005).

1.1.13 PDL-2

Programmed death 1 (PD-1) ist ein kostimulatorisches Molekül, welches inhibitorisch auf T-Zellen wirkt und dadurch ihre Aktivierung verhindert. Des Weiteren hat es Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. Es wird auf Monozyten, B- und T-Zellen exprimiert und ist außerdem Mitglied der CD28-Familie.

Seine extrazelluläre Region ist zu 28% identisch mit CTLA-4 (Tsushima et al. 2003). PD-L2 (programmed death-ligand 2) ist, zusammen mit PD-L1 (programmed death-ligand 1) Ligand für PD-1. Des Weiteren sind die zwei Moleküle Mitglieder der B7-Familie.

1.1.14 CD40

CD40 gehört zur Familie der "Tumor Necrosis Factor"-Rezeptoren. Es besteht aus drei Monomeren, welche nach Ligandenbindung trimerisiert werden, wodurch die intrazelluläre Signalübertragung ausgelöst wird. Es ist ein kostimulatorisches Protein, welches durch Binden seines Liganden unter anderem Antigen präsentierende Zellen aktiviert. CD40 ist ein 48-50 kDa Typ-I-Transmembranrezeptor, welcher auch eine wichtige Rolle hinsichtlich der B-Zellentwicklung und des Immunglobulin-Isotypenwechsels spielt (Ren et al. 1994). Es handelt sich nicht nur um einen B-Zell-Marker, das Molekül wird auch stark auf basalen Epithelzellen und interdigitierenden Zellen exprimiert. CD40 ist ebenso auf Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen zu finden. Auch die meisten B-Zell-Malignome und die meisten epithelialen Tumore exprimieren CD40 (Gordon 1995). Sein Ligand ist CD40L, auch bekannt als CD154, ein 33 kDa Typ-II-Transmembranprotein. Der Ligand wurde erstmals auf aktivierten CD 4⁺-T-Lymphozyten beschrieben. Darüber hinaus wird CD154 auch auf B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Astrozyten, Makrophagen und Blutplättchen exprimiert (Schonbeck et al. 2000). Es existieren noch zwei andere Liganden für CD40. Das C4b bindende Protein (Brodeur et al.

2003) und das 70 kDa Hitzeschockprotein (Hsp 70) (Becker et al. 2002). Die Interaktion zwischen CD40 und CD40 L ist wichtig hinsichtlich der Ausbildung von CD 8⁺-T-Gedächtniszellen gegen Viren (Hernandez et al. 2008).

1.2 HÄMOPHAGOZYTISCHE LYMPHOHISTIOZYTÖSE

Definition

Die Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) ist eine seltene aber lebensbedrohliche Erkrankung, während welcher es zu unkontrollierter Hyperinflammation aufgrund von Überaktivierung von Makrophagen und Lymphozyten kommt (Bhattacharyya et al. 2008b). Es gibt zwei unterschiedliche Formen von HLH: die angeborene und die erworbene Form.

Klassifikation der HLH (Bhattacharyya et al. 2008a) (Janka 2007, Janka et al. 2004):

- Angeborene HLH
 - Primäre HLH/FHL
 - Bekannte Gendefekte (Perforin, munc 13-4, Syntaxin 11)
 - Unbekannte Gendefekte
 - Immundefekt-Syndrome
 - Chediak-Higashi-Syndrom (CHS)
 - Griscelli-Syndrom (GS)
 - X-linked lymphoproliferatives Syndrom (XLP)
- Erworbene HLH
 - Exogenes Agens (Viren, Bakterien, Toxine)
 - Infekt-assoziiertes hämophagozytisches Syndrom (IAHS)
 - Endogenes Produkt (Gewebszerstörung, metabolische Produkte)
 - Rheumatische Erkrankungen (Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom; MAS)
 - Maligne Erkrankungen

Die primäre, autosomal-rezessiv vererbte familiäre HLH (FHL) wurde 1952 zum ersten Mal von Farquhar und Claireaux beschrieben. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 1:50.000 Geburten auf (Henter et al. 1991) und zwar typischerweise während

1. Einleitung

der Säuglingszeit oder der frühen Kindheit. Verläuft die FLH unbehandelt, so beträgt die mediane Überlebenszeit nach der Diagnose weniger als zwei Monate (Henter et al. 2007).

Die sekundäre oder erworbene Form der HLH (sHLH) tritt sowohl bei immunsupprimierten als auch bei nicht immunsupprimierten Patienten auf (Henter et al. 2007) und kann alle Altersgruppen betreffen. Sie ist nicht erblich bedingt und tritt infektassoziiert auf, d.h. nach Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten. Auch Malignitäten oder deren Therapien (Henter et al. 2007) und Autoimmunerkrankungen können sHLH triggern.

Diagnostik

Die diagnostischen Kriterien der HLH sind folgende (Henter et al. 2007) :

- Über ≥ 7 Tage anhaltendes Fieber
- Splenomegalie
- Zytopenie (mindestens zwei der drei Zelllinien sind betroffen)
- Hypofibrinogenämie und/oder Hypertriglyceridämie
- Ferritin $\geq 500\mu\text{g/l}$
- sCD 25 ≥ 2400 U/ml
- Geringe oder fehlende NK-Zell-Aktivität
- Hämophagozytose im Knochenmark, Liquor oder Lymphknoten

Sind fünf der acht Kriterien erfüllt, gilt die Diagnose HLH als gesichert.

Neben den Kardinalsymptomen Fieber, Hepatosplenomegalie und Zytopenie können Lymphadenopathien, Ikterus oder neurologische Symptome (Lähmungen und Krämpfe der Hirnnerven) als Begleitsymptome auftreten (Janka 2007).

Pathophysiologie

Beim Gesunden sind die NK- und zytotoxischen T-Zellen in der Lage, feindliche Zellen durch zytolytische Granula (Perforin und Granzym) zu zerstören. Bei HLH-Patienten ist die zytotoxische Funktion dieser Zellen aber stark beeinträchtigt. Der Verlust der Zytotoxizität führt zur unkontrollierten Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen T-Zellen. Dies wiederum resultiert in massiver Zytokinausschüttung, fortwährender Makrophagenaktivierung und Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6)-Freisetzung (Bhattacharyya et al. 2008b). Eine zentrale Rolle übernimmt Interferon γ (IFN- γ) (Jordan et al. 2004, Schneider et al.

1. Einleitung

2002), welches zu ausschweifender Makrophagenaktivierung und infolge dessen zu hochinflammatorischer Multiorganerkrankung führt. INF- γ ist bei HLH in viel höherer Konzentration nachweisbar als bei Sepsis oder Autoimmunerkrankungen (Janka et al. 2004).

Für die klassischen Symptome der HLH (Zytopenie, Koagulopathie, hohe Triglyceridwerte) sind somit die proinflammatorischen Zytokine verantwortlich.

Therapie

Als erstes gilt es, die überschießende Immunantwort gemäß dem HLH-2004-Protokoll (Henter et al. 2007) mit Dexamethason, Etoposid, Cyclosporin A und gegebenenfalls mit intrathekalem Methotrexat und Kortikosteroiden zu unterdrücken.

Im Fall der primären Form der HLH kann nur durch Stammzelltransplantation eine Heilung erzielt werden.

Bei sekundärer HLH wird die Grunderkrankung behandelt, oft ist aber auch eine aggressive immunsuppressive Therapie notwendig.

1.3 SEPSIS

Der Begriff „Sepsis“ ist kein Terminus der modernen Medizin, sondern wurde bereits von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt. Er leitet sich aus dem griechischen σηπω (= faul machen) ab. Da der Kenntnisstand über Hygienemaßnahmen und Mikrobiologie damals ziemlich mangelhaft war, kam es aufgrund dessen häufig zu den gefürchteten Wundinfektionen, für welche die Wundfäule (Sepsis) verantwortlich gemacht wurde.

Hugo Schottmüller (1867-1936) legte 1914 den Grundstein für die moderne Sepsisdefinition: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“

In den 80-er Jahren hat man verstanden, dass Sepsis nicht nur durch einen Infektionsherd entsteht, sondern dass auch die körpereigene Immunantwort als Reaktion auf das infektiöse Geschehen eine wichtige Rolle spielt.

1. Einleitung

Die 1989 von Roger C. Bone (1941-1997) formulierte Definition von Sepsis ist auch heute noch gültig: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“

Definition

Eine genaue und einheitliche Definition von Sepsis war jahrelang sehr schwierig, da die Vorgänge, welche bei einer Sepsis ablaufen äußerst komplex und vielseitig sind. Auf der internationalen Konsensuskonferenz im Jahre 1992 wurden die Definitionen und Diagnosekriterien von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock einheitlich definiert (Bone et al. 1992).

SIRS

Ein SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) ist definiert als systemische Immunantwort ohne Infektion und liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Körpertemperatur $> 38\text{ °C}$ oder $< 36\text{ °C}$
- Tachykardie: Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Tachypnoe: Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 < 4,3\text{ kPa}$, bzw. 32 mm Hg)
- Leukozytose ($> 12.000\text{ wei\ss e Blutk\"orperchen}/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($< 4.000/\text{mm}^3$) oder $> 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differenzialblutbild

SIRS wird durch schwere klinische Insulte, wie z.B. Verbrennungen, Trauma, Pankreatitis und andere hervorgerufen.

Sepsis

Sepsis ist die systemische Immunantwort auf eine Infektion und liegt vor, wenn mindestens zwei der oben genannten Symptome vorliegen.

Schwere Sepsis

Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotension. Die Hypoperfusion kann sich z.B. in Form von Laktoazidose, Oligurie oder akuter Verwirrtheit äußern.

Septischer Schock

Es liegt eine Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution vor; der systolische Druck ist < 90 mm Hg oder der systolische Druck fällt > 40 mm Hg des Ausgangswertes (Bone et al. 1992).

Epidemiologie und Inzidenz der Sepsis

Trotz der großen Fortschritte in der Pathophysiologie und größerer Vielfalt an Therapieoptionen stellt die Sepsis nach wie vor eine Erkrankung mit hoher Mortalität dar. In den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz der Sepsis gestiegen und liegt bei ca. 3 pro 1.000 Einwohnern im Jahr (Angus et al. 2001). In den USA konnte man zwischen 1989-2000 einen Anstieg der Erkrankungen um 8,7 % beobachten. Davon waren Frauen weniger betroffen als Männer (Martin et al. 2003) (Angus et al. 2001) und die Mortalität war bei farbigen Männern am höchsten.

Laut SepNet (Kompetenznetzwerk Sepsis) erkranken in Deutschland 75.000 (110 von 100.000) Einwohner pro Jahr an schwerer Sepsis, bzw. septischem Schock und 79.000 Einwohner (116 von 100.000) an Sepsis. Nach dem Myokardinfarkt und Krebs stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache dar. Die Mortalität der intensivpflichtigen Patienten in Deutschland liegt bei ca. 20 %.

Auch unter dem ökonomischen Aspekt betrachtet nimmt die Sepsis eine besondere Stellung ein und stellt eine immense Belastung für die Gesellschaft dar. In Deutschland werden die jährlichen Kosten auf ca. 1,7 Mrd. Euro geschätzt. Dies entspricht ungefähr 32 % der Kosten, welche für die deutschen Intensivstationen aufgewendet werden. Dazu fallen schätzungsweise noch ca. 6,3 Mrd. Euro für Arbeitsausfall oder Frührente an.

Pathophysiologie

In der Pathogenese der Sepsis ist es sekundär, ob die Infektion bakteriellen, viralen, fungalen oder parasitären Ursprungs ist. Primär entscheidend ist das Ausmaß der Abwehrreaktion des Patienten auf den Stimulus. Nach erfolgloser Abwehrreaktion gegen die auslösenden Noxen kommt es zur überschießenden und unkontrollierten Abwehrreaktion. Laut einer paneuropäischen Studie wurden 40 % der Infektionen durch grampositive und 38 % durch gramnegative Erreger verursacht. Eine Pilzinfektion wurde in 17 % der Fälle nachgewiesen (Vincent et al. 2006). Das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien bindet an Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LPB) und dieser LPS-LPB-Komplex bindet an die oberflächlichen CD14-Rezeptoren von Monozyten und Makrophagen (Wright et al. 1990) (Russell 2006). CD14 erkennt aber nicht nur LPS, sondern auch diverse andere mikrobielle Komponenten, wie z.B. Peptidoglykane (PGN) Gram-positiver Bakterien und Lipoproteine der Spirochäten (Dziarski et al. 2000) (Cohen 2002). Durch die Bindung von Peptidoglykan und LPS an TLR-2 und TLR-4 wird die intrazelluläre Signaltransduktion in Gang gesetzt und es kommt zur Aktivierung von NF- κ B, durch welches wiederum die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 β und des antiinflammatorischen Interleukin-10 erhöht wird. Die Zytokine induzieren in den Endothelzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsrezeptoren und die Bindung von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten, welche als Effektorzellen verschiedene Mediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene, Proteasen und Oxidantien ausschütten. Durch sie werden die Permeabilität und Vasodilatation erhöht, die Gerinnungskaskade wird in Gang gesetzt (Russell 2006). Die proinflammatorischen Zytokine erhöhen auch die Stickstoffmonoxid-Synthese. Stickoxid wirkt als potenter Vasodilatator und führt zur arteriellen Hypotension. Die intravasale Gerinnung, die gestörte Mikrozirkulation, der intravasale Volumenmangel und arterielle Hypotension begünstigen die Entstehung eines Multiorganversagens.

Anders als beim physiologischen Entzündungsgeschehen, bei welchem sich pro- und antiinflammatorische Zytokine die Waage halten ist, die Sepsis durch Phasen der Hyper- und der Hypoinflammation charakterisiert, während welchen es zur Entgleisung der Immunantwort (Immunparalyse) mit lebensbedrohlichen Verläufen kommen kann. Während der initialen Phase der Sepsis dominiert der

1. Einleitung

Zustand der Hyperinflammation, während welcher es zur verstärkten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α , IFN- γ und IL-6 kommt. Diese massive inflammatorische Reaktion führt ohne oder mit unzureichender Gegenregulation zum klinischen Bild des SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), welche Ischämie mit konsekutiver Organdysfunktion und eventuell den Tod zu Folge haben kann. Es folgt die Phase der Hypoinflammation und die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10. Fällt die antiinflammatorische Antwort zu heftig aus, so kann sich daraus das CARS (compensatory anti-inflammation response syndrome) entwickeln, welches durch Immunsuppression, unzureichende Infektabwehr und Gefäßschädigung gekennzeichnet ist und letzten Endes auch zu Organdysfunktion und zum Tod führen kann (Bone 1996, Bone et al. 1997) (Docke et al. 1997b, Heidecke et al. 1999, Hotchkiss et al. 2001a, Rittirsch et al. 2008).

Therapie

Die Fokussanierung, welche auch mehrere chirurgische Maßnahmen beinhalten kann und eine frühzeitige antimikrobielle Therapie, die in den meisten Fällen zunächst kalkuliert erfolgt, bilden die kausale Therapie. Supportiv dazu erfolgt eine Volumensubstitution mit dem Ziel, ein adäquates zelluläres O₂ - Angebot zu erreichen. Die adjunktiven Therapieansätze sind zahlreich. Dazu gehören die Therapie mit Glukokortikosteroiden, rekombinantem Protein C, Antithrombin, Immunglobulinen, Selen, Ibuprofen, Insulin u.a. Die Behandlung mit aktiviertem Protein C (Xigris®) ist in Europa bei schwerer Sepsis mit mindestens zwei Organversagen indiziert.

Weitere Therapieansätze mit hochdosierten Steroiden, PAF-Antagonisten, TNF- α -, IL-1-, Prostaglandin- und Bradykininhemmern blieben erfolglos (Efron et al. 2003). Allerdings wurde dadurch verdeutlicht, wie wichtig die frühzeitige Diagnose der Sepsis (binnen 6 Stunden) (Russell 2006) und eine unverzüglich eingeleitete Antibiose für das Überleben der Patienten ist.

1.4 TUMOR

Laut der WHO (Weltgesundheitsorganisation) wird Krebs als „... jede Neubildung in Form eines spontanen, autonomen und irreversiblen Überschusswachstum von körpereigenem Gewebe“ definiert.

Das Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. geben für das Jahr 2006 ca. 426.800 Krebsneuerkrankungen in Deutschland an, wovon 229.200 Männer und 197.600 Frauen betroffen waren. Die Sterbefälle für das gleiche Jahr betragen bei männlichen Patienten 112.438 und 98.492 bei den weiblichen Erkrankten. Wie in den vergangenen Jahren auch, stand im Jahr 2006 Brustkrebs bei der Frau und Prostatakrebs beim Mann an erster Stelle der Krebsneuerkrankungen.

Pathophysiologie

Das aktuelle Modell der Kanzerogenese ist ein Mehrstufenmodell:

- Initiation: Es kommt zu Mutationen durch genotoxische Stoffe („Initiatoren“). Funktioniert der Reparaturmechanismus nicht, bleiben diese Mutationen erhalten. Es entstehen potentielle Tumorzellen.
- Promotion: während der Promotion entstehen aus den transformierten Zellen präneoplastische Zellen, aus welchen sich nach weiterer Entwicklung Tumoren entwickeln können.
- Progression: es kommt zu irreversiblen aneuploiden Chromosomenveränderungen.

Tumorzellen sind in der Lage, Wachstumsfaktoren selbst zu produzieren oder auch ohne Wachstumsfaktoren zu wachsen. Somit besitzen sie die Fähigkeit, sich so gut wie unbegrenzt teilen zu können. Der für die Apoptose verantwortliche intrazelluläre Signalweg ist bei Tumorzellen sehr häufig defekt und der Kontakt zur Nachbarzelle, welcher bei gesunden Zellen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung hat, zeigt bei Tumorzellen keinerlei Effekt (Hanahan et al. 2000).

1.5 FRAGESTELLUNG

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und wie sich die Subpopulationen dendritischer Zellen bei den verschiedenen Krankheitsgruppen HLH, Tumor und Sepsis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe unterscheiden.

Dazu wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten Blutproben aufbereitet, einer Immunphäotypisierung unterzogen und analysiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTENGUT

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 49 Blutproben aufbereitet und gemessen. Davon waren 38 Blutproben von erkrankten Patienten, welche der Sektion Experimentelle Anästhesiologie Ulm aus der Anästhesiologischen Intensivstation der Uniklinik Ulm oder auswärtigen Kliniken zugesandt wurden. Als Negativkontrolle wurden Blutproben von 11 gesunden Probanden untersucht und ausgewertet.

Die Einteilung der untersuchten Patientengruppen mit den Diagnosen Sepsis, HLH und Tumor erfolgte nach den uns mit den Blutproben übermittelten Diagnosen.

Tab. 1: Angabe der Patientennummer, der Diagnose, der nach Diagnose eingeteilten Patientengruppe und des Geschlechts (m = männlich, w = weiblich).

Patientennummer	Diagnose	Patientengruppe	Geschlecht
9507	Prostata-CA	Tumor	m
9509	Mamma-CA	Tumor	w
9646	Mamma-CA	Tumor	w
9629	Lungen-CA	Tumor	w
9645	Lungen-CA	Tumor	w
9506	Glioblastom	Tumor	w
9520	Mamma-CA	Tumor	w
9508	Malignes Melanom	Tumor	w
9616	Thymus-CA	Tumor	w
9521	Malignes Melanom	Tumor	m
9647	Nieren-CA	Tumor	m
9511	Mamma-CA	Tumor	m
9691	Sepsis	Sepsis	m
9696	Sepsis	Sepsis	m
9719	septischer Schock	Sepsis	w
9794	Sepsis	Sepsis	w
9751	SIRS-Schock	Sepsis	w
9795	Sepsis	Sepsis	m
9720	septischer Schock	Sepsis	m
9785	septischer Schock	Sepsis	m
9877	Sepsis	Sepsis	m
9793	Sepsis	Sepsis	m

2. Material und Methoden

8951	SIRS-Schock	Sepsis	w
9867	Sepsis	Sepsis	m
9612	HLH	HLH	w
9589	MAS	HLH	w
9630	HLH/MAS	HLH	w
9569	HLH/MAS	HLH	w
9556	MAS	HLH	m
9688	HLH/MAS	HLH	m
9690	MAS	HLH	w
9738	MAS	HLH	w
9699	HLH	HLH	w
9643	HLH	HLH	w
9559	MAS	HLH	m
9728	HLH/MAS	HLH	w
9560	MAS	HLH	w
9539	MAS	HLH	w
9687	gesund	Panel	w
9686	gesund	Panel	m
9782	gesund	Panel	w
10083	gesund	Panel	m
10084	gesund	Panel	w
10119	gesund	Panel	w
12120	gesund	Panel	m
12121	gesund	Panel	w
3773	gesund	Panel	w
10300	gesund	Panel	m
10341	gesund	Panel	m

2.2 BLUTPROBENAUFBEREITUNG

Die Blutproben wurden bis zur Aufbereitung in EDTA - S- Monovetten (2,7 ml; Fa. Sarstedt) im Kühlschrank gelagert. Um die Proben zur FACS-Analyse vorzubereiten, wurden jeweils 50 µl Blut in Falcon-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube; BD Bioscience) pipettiert. Im Anschluss daran wurden je 3 µl Antikörper dazugegeben. Die Proben wurden gevortext (Vortex-Genie 2; Scientific Industries) und danach 25 Minuten in Dunkelheit und auf Eis inkubiert. Nach dem Inkubieren wurde die Probe zur Erythrozytenlyse mit FACS™ Lysing Solution (BD; 1:10 verdünnt) für ca. 10 Minuten lysiert. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten bei 980 rpm zentrifugiert (GS-6R Zentrifuge, Beckman Coulter). Der

2. Material und Methoden

Überstand wurde abgegossen, resuspendiert und die Proben wurden zwei Mal mit DPBS (Gibco) gewaschen. Abschließend wurden die Proben mit jeweils 50 µl CellFIX™ (BD Biosciences) fixiert.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tabelle 2: Antikörper , Klon und Anbieter

Antikörper	Klon	Hersteller
Mouse IgG1 FITC	X40	BD biosciences
Mouse IgG2a PE	X39	BD biosciences
CD14 PE	M5E2	BD biosciences
CD 80 FITC	MAB104	Immunotech
CD 86 FITC	2331 (FUN-1)	BD biosciences
CD 39 FITC	A1	Serotech
CD 40 PE	MAB 89	Immunotech
CD 64 FITC	10.1	Immunotech
CD 1a FITC	NA1/34	Dako
CD 83 PE	HB15a	Immunotech
Anti-HLA-DR FITC	L243	BD biosciences
CD 123 PE	7G3	PharMingen
CD 163 FITC	5C6 FAT	BMA
TLR 2 FITC	TL2.1	eBiosciences
TLR 4 PE	HTA 125	Serotech
BDCA-2 FITC	AC144	MACS Miltenyi Biotec
PDL2 PE	122	eBiosciences

2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, bei welchem suspendierte Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl, bzw. Laser vorbeigeführt werden und ihre physikalischen Charakteristika Zellgröße, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität simultan gemessen werden. Durch das Flüssigkeitssystem werden die Zellen in das Zentrum des Laserstrahls transportiert und fokussiert. Die Zellen in der Probenflüssigkeit werden durch den Hüllstrom (sheat fluid) mitgerissen und im Zentrum der Messzelle fokussiert (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen werden nacheinander vom Laserstrahl getroffen. Pro Zeiteinheit passiert nur eine Zelle den Laser. Die

2. Material und Methoden

fokussierten und getrennten Lichtsignale treffen auf die Detektoren und erzeugen elektrische Signale, die proportional zur Intensität des einfallenden Lichts sind. Diese elektrischen Signale werden dann entweder linear (scatter) oder logarithmisch (Fluoreszenzen) verstärkt und in digitale Signale umgewandelt. Die Umwandlung der Signale erfolgt über einen Analog/Digital-Wandler.

Die Zellen emittieren dabei abhängig von ihrer Größe, Gestalt und spezifischer Anfärbung charakteristische Lichtsignale, welche mit speziellen Detektoren gemessen werden.

Die Zellgröße kann mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC) anhand der Lichtbeugung gemessen werden, welche proportional dazu ist. Gemessen wird in der Längsachse des einfallenden Lichts.

Mit Hilfe des Seitwärtsstreulichts (SSC) wird mittels Lichtbrechung und Reflexion die Granularität der Zelle gemessen. Der SSC wird im 90°- Winkel zum einfallenden Licht gemessen.

Grundlage der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS-Analyse) ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. In unserem Fall mit FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) und PE (Phycoerythrin). Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch den monochromatischen Laserstrahl angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn die Elektronen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen geben sie Energie ab, die in Form von Photonen mittels Photodetektor gemessen wird. Die Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper/Zellen.

Eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da die Anregung der Farbstoffe bei gleicher Wellenlänge erfolgt, die charakteristischen Emissionsspektren aber unterschiedlich sind. Somit werden über Spiegel- und Filtersysteme die von jeder Zelle ausgesandten Fluoreszenz- und Streulichtsignale auf Photoverstärkerröhren geleitet, von Detektoren erfasst und zur Auswertung auf den Computer übertragen.

Das FACS-Calibur-Gerät, mit welchem die Proben gemessen wurden, ist mit einem Argonlaser (488nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) ausgestattet.

2. Material und Methoden

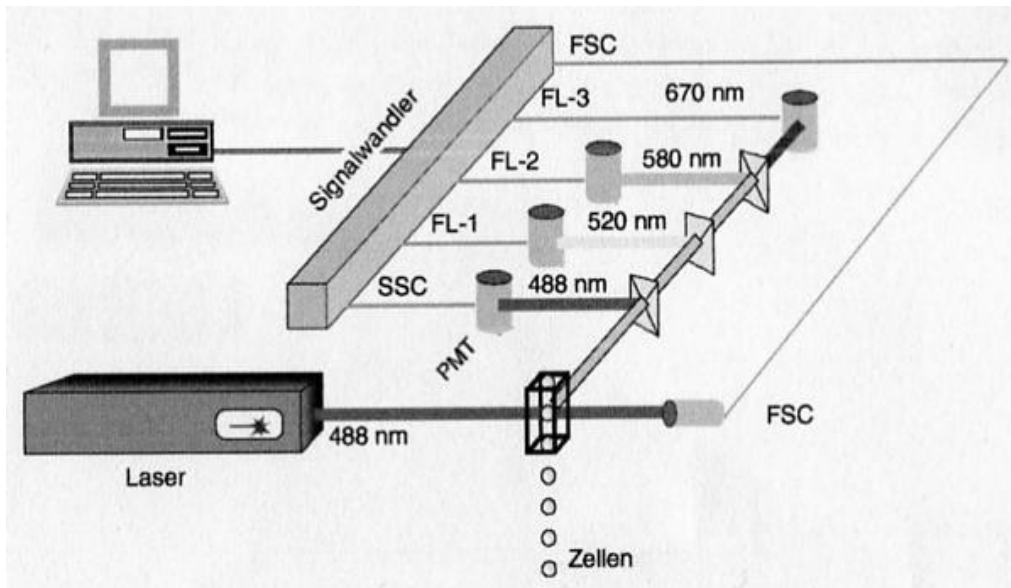


Abb. 1. Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers.

Mittels Dot Plot (Punktwolken) kann man zwei Parameter auf den X- und Y-Achsen darstellen. Das ermöglicht die Analyse von Koexpressionsmustern. Jede Zelle wird durch einen Punkt dargestellt. In unseren Untersuchungen wurden 10.000 Zellen (Total Events) pro Tube analysiert. Durch das Setzen eines Gates (Analysefensters) kann man eine bestimmte Population eingrenzen, die dann auf ihre Fluoreszenzen untersucht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Monozytenpopulation analysiert.

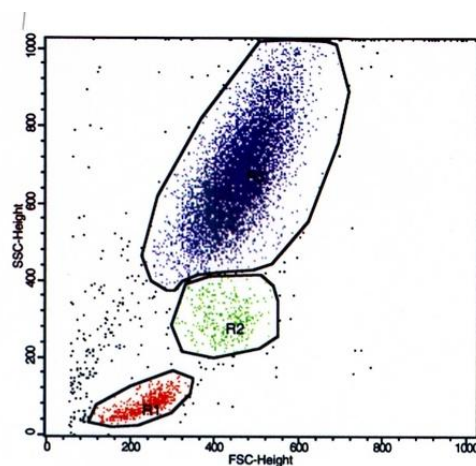


Abb. 2. Punkthistogramm: x-Achse = Vorwärtsstreulicht, y-Achse = Seitwärtsstreulicht, R1 = Lymphozyten, R2 = Monozyten, R3 = Granulozyten.

Pro Zelle werden also vier verschiedene Einzelparameter erfasst: Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC), Fluoreszenzsignal 1 (FITC) und Fluoreszenzsignal 2 (PE).

Analyse und Auswertung

Für die Analyse und Auswertung wurde die Software CellQuest™ 3.3 (BD) verwendet.

2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die statistischen Berechnungen und Diagramme wurde das Programm Graph Pad Prism, Version 5.0 verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem nonparametrischen, auf dem Rangplatzprinzip basierenden Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn´s post test. Der Kruskal-Wallis-Test überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen (z.B. Mediane) zwischen mehr als zwei Stichproben/Gruppen signifikant unterscheiden. Die Nullhypothese H_0 lautet, dass zwischen den Gruppen kein Unterschied besteht. Der H-Wert wird als Prüfgröße des Kruskal-Wallis-Tests berechnet und folgt einer Chi-Quadrat-Verteilung. Ist der errechnete H-Wert größer als der H-Wert aus der Chi-Quadrat-Tabelle, so wird die Nullhypothese verworfen und es besteht somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Der Dunn´s post test vergleicht die Rangsummendifferenz zweier Gruppen. Für jedes Vergleichsgruppenpaar wird: $p > 0,05$, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ oder $p < 0,001^{***}$ angezeigt. Da unsere Daten auch im Rahmen einer explorativen Datenanalyse untersucht wurden, wurde ein p-Wert zwischen 0,05 und 0,15 auf einen Unterschied hinweisend gewertet. Zum Ausschluss von Ausreißern wurde bei auffälligen Messwerten der Grubb´s Ausreißertest durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ (p-Wert $< 0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 KRUSKAL WALLIS TEST UND DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST FÜR DIE EINZELNEN MARKER

3.1.1 CD14

Abbildung 3 zeigt den prozentualen Anteil CD14-positiver Zellen im Monozytengate, welches aufgrund der physikalischen Eigenschaften monozytärer Zellen gewählt wurde. Die Hauptfunktion von CD14 besteht darin, den LPS/LPB-Komplex an die TLR zu präsentieren und damit die Immunantwort zu initiieren.

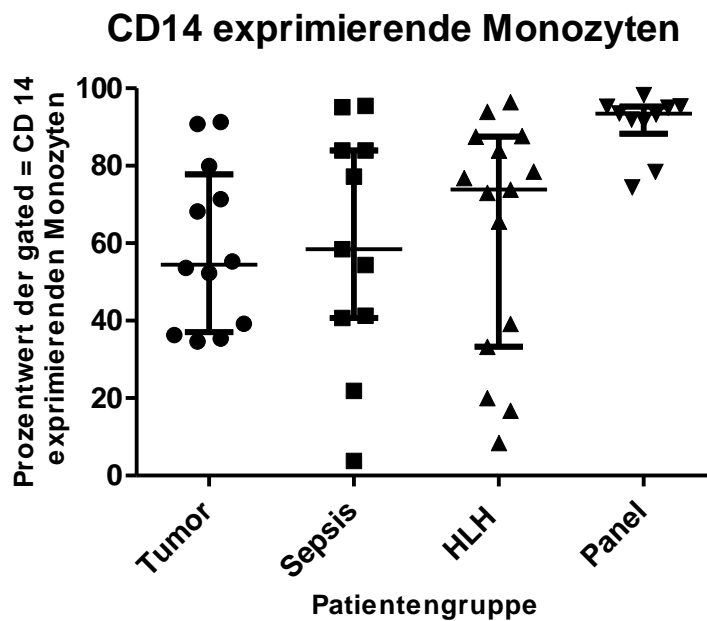


Abbildung 3: Prozent CD14-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH [= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD14-exprimierenden Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 3: Prozent CD14-positive Monozyten im Monozytenfenster;
Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0047
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	12,96
Dunn's Multiple Comparison-Test	
	p < 0,05
Tumor vs Panel	ja **
Sepsis vs Panel	ja *
HLH vs Panel	ja*

Nur die Auswertung der gesunden Panelblutproben zeigte fast ausschließlich CD14-positive Zellen im Monozytengate (Median: 93,4%); bei den Krankheitsgruppen zeigten nicht alle Zellen im Monozytenfenster die lineage-spezifische Expression von CD14. Die Mediane der Gruppen Sepsis (58,5%), HLH (73,9%) und vor allem Tumor (54,5%) sind deutlich niedriger als der Median der Panel-Gruppe. Der ermittelte p-Wert = 0,0047 bestätigt den Unterschied.

3.1.2 TLR-2 und TLR-4

In den Abbildungen 4 und 5 wurde der prozentuale Anteil der Toll-Like Rezeptoren 2, bzw. 4 in den untersuchten Patientengruppen dargestellt. Bei den Toll-like-Rezeptoren handelt es sich um wichtige Pathogen-bindende Rezeptoren, welche bei Infektionen auf Leukozyten stärker exprimiert werden.

3. Ergebnisse

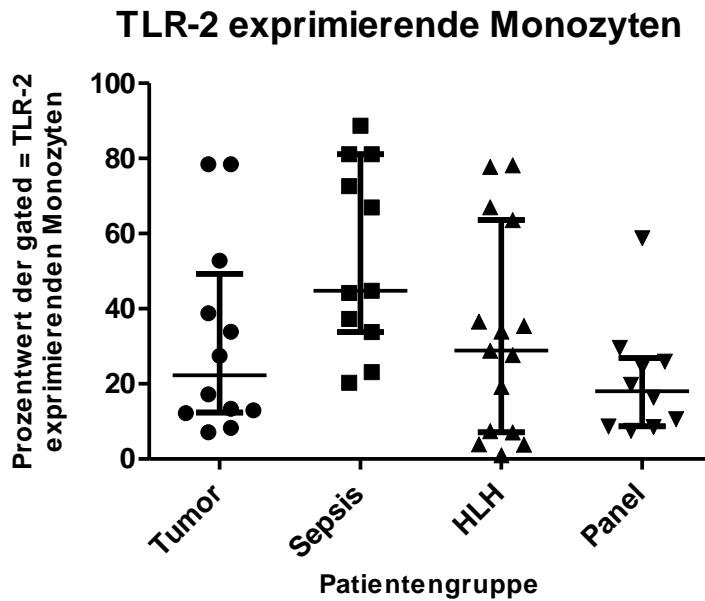


Abbildung 4: Prozent TLR-2-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramme mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH [= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = TLR-2-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 4: Prozent TLR-2-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0242
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	9,422
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Sepsis vs Panel	ja*

Bei Betrachtung der Abbildung 4 erkennt man, dass sie Einzelwerte für die untersuchten TLR-2-positiven Monozyten in der Panel-Gruppe bis auf einen Wert relativ nahe beieinander liegen, während bei den Gruppen Tumor, Sepsis und HLH eine starke Streuung der Werte zu beobachten ist. Die TLR-2-Expression ist in der Sepsis-Gruppe deutlich erhöht und hebt sich mit einem Median-Wert von 44,8% deutlich von dem Median der Panel-Gruppe, welcher bei 18,1% liegt, ab. Dieser Unterschied wird durch den p-Wert = 0,024 untermauert.

3. Ergebnisse

3.1.2.1 TLR-4

Abbildung 5 zeigt den prozentualen Anteil TLR-4-positiver Zellen im Monozytengate.

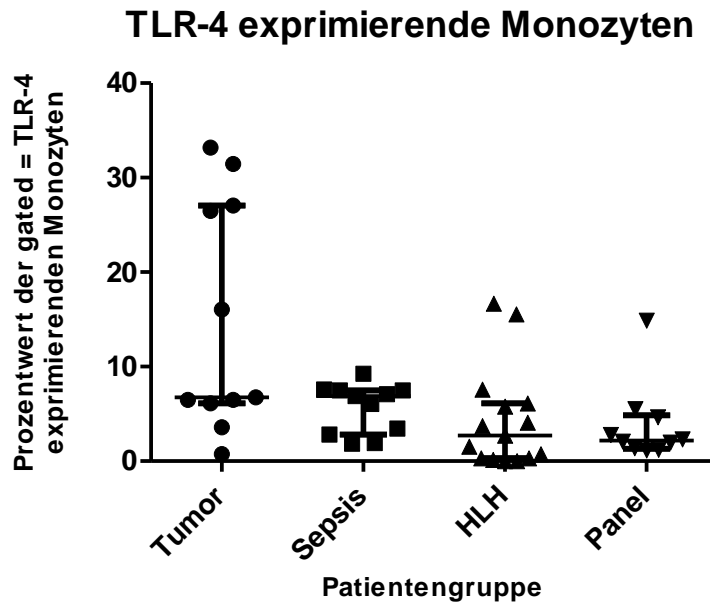


Abbildung 5: Prozent TLR-4-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = TLR-4-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 5: Prozent TLR-4-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0095
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	11,45
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs HLH	ja*
Tumor vs Panel	ja*

3. Ergebnisse

In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die Tumor-Gruppe die breiteste Streuung der Werte aufweist, wobei der niedrigste Wert bei 0,76% und der höchste Wert bei 33,17% liegt; vier Werte erscheinen deutlich erhöht. Die Tumor-Gruppe unterscheidet sich mit einem Median von 6,7% deutlich von der Panel- (Median: 2,2%) und der HLH-Gruppe (Median: 2,7%). Des Weiteren kann man bei genauer Betrachtung der Grafik erkennen, dass innerhalb der HLH-Gruppe mehrere Werte auffällig gering erscheinen.

3.1.3 CD83

In Abbildung 6 sind die relativen Anteile CD83-positiver Zellen im Monozytenfenster dargestellt. CD83 gehört zur Ig-Superfamilie und ist unter anderem ein Marker reifer dendritischer Zellen.

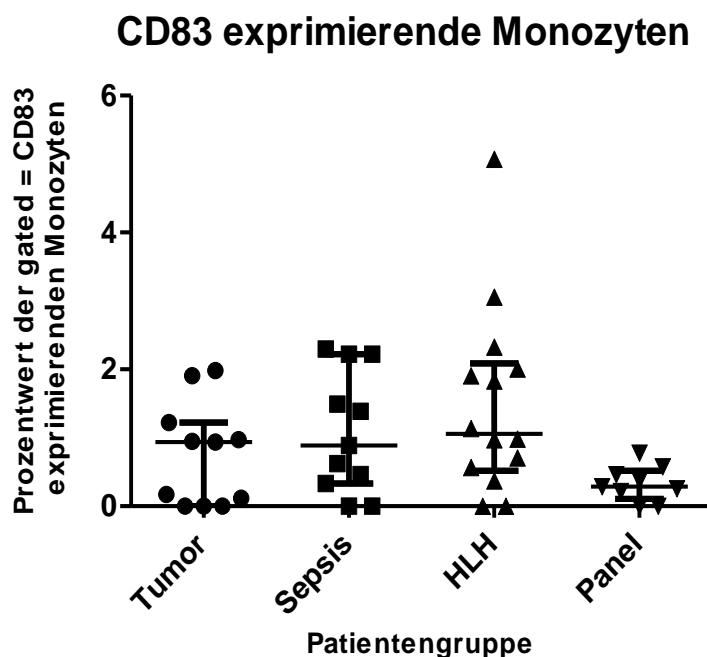


Abbildung 6: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 6: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster;
Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0614
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	7,355
Dunn's Multiple Comparison-Test	p < 0,05
-	-

Wie man der Abbildung 6 entnehmen kann, ist die monozytäre CD83-Expression der Gruppen Sepsis, HLH und Tumor im Vergleich zur Panel-Gruppe erhöht. Die Mediane der Krankheitsgruppen liegen bei ungefähr 0,9% ziemlich nahe beieinander, der Median der Panel-Gruppe liegt bei 0,3%. Bei Betrachtung der Grafik fallen auch zwei erhöhte Werte der HLH-Gruppe besonders auf. Der p-Wert von 0,061 weist auf die Tendenz der Tumor-, Sepsis- und HLH-Gruppe zu erhöhten Werten im Vergleich zur Panel-Gruppe hin.

3.1.4 CD163

Die folgende Abbildung zeigt den prozentualen Anteil CD163-positiver Monozyten im Monozytenfenster. CD163 gehört zur SRCR-Familie und ist unter anderem wichtig für die Clearance des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes.

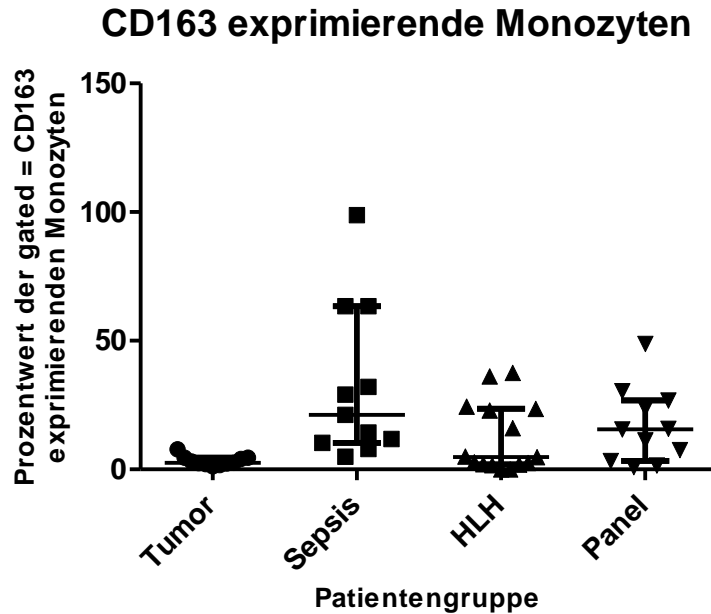


Abbildung 7: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 7: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,003
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	13,91
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Sepsis	ja**

Nimmt man Abbildung 7 in Augenschein, sticht vor allem die Tumor-Gruppe ins Auge, welche im Vergleich zu den anderen Gruppen eine stark verminderte CD163-Expression aufweist und bei einem Median von ca. 4% liegt. Die Gruppen HLH, Panel und vor allem Sepsis (Median Sepsis-Gruppe: 21,2%) weisen eine höhere CD163-Expression auf, wobei drei erhöhte Werte innerhalb der Sepsis-Gruppe auffällig hoch erscheinen. Die Analyse der Daten hat einen deutlichen

3. Ergebnisse

Unterschied zwischen der Tumor- und der Sepsis-Gruppe ergeben; der p-Wert liegt bei 0,003.

3.1.5 CD1a

In der nachfolgenden Abbildung ist der prozentuale Anteil CD1a-positiver Monozyten im Monozytenfenster dargestellt. CD1a präsentiert hauptsächlich hydrophobe Antigene und ist mit den MHC-Molekülen der Klasse I und der Klasse II entfernt verwandt.

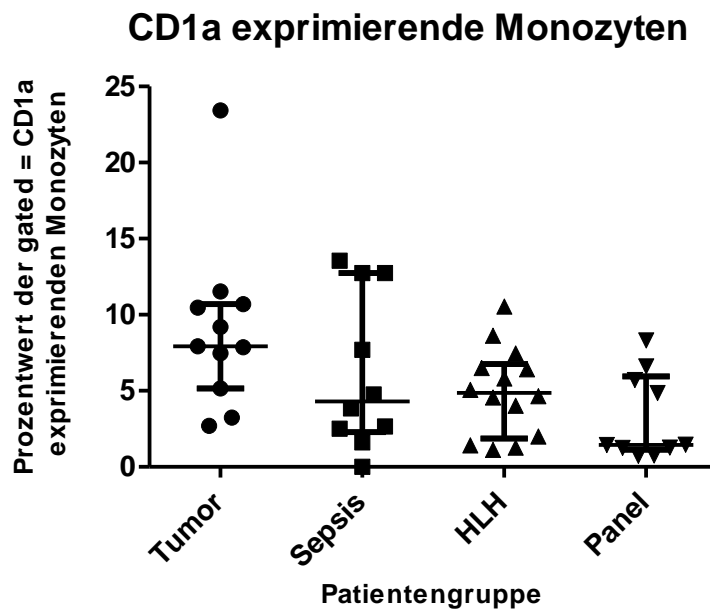


Abbildung 8: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 8: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster;
Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,022
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	9,624
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Panel	p < 0,05
	ja*

Bei Betrachtung von Abbildung 8 fällt die geringste CD1a-Expression der Panel-Gruppe mit Werten von 0,7-8,3% auf (Median: 1,5%). Des Weiteren könnte man zwei Untergruppen innerhalb des Panel-Kollektivs vermuten. Der größte Unterschied ist im Vergleich zur Tumor-Gruppe zu sehen (Median: 7,5 %), was durch den p-Wert = 0,022 bestätigt wird. Die Gruppen Sepsis (Median: 4,3%) und HLH (Median: 4,86%) weisen ähnlich breit gestreute Werte auf und zeigen im Vergleich zur Tumor-Gruppe keinen so deutlichen Unterschied zur Panel-Gruppe in der CD1a-Expression auf.

3.1.6 HLA-DR

In Abbildung 9 ist der prozentuale Anteil HLA-DR-positiver Monozyten im Monozytenfenster dargestellt. HLA-DR präsentiert Peptidantigene an CD4⁺-Zellen und ist somit für die Einleitung der spezifischen Immunantwort funktionell von Bedeutung.

3. Ergebnisse

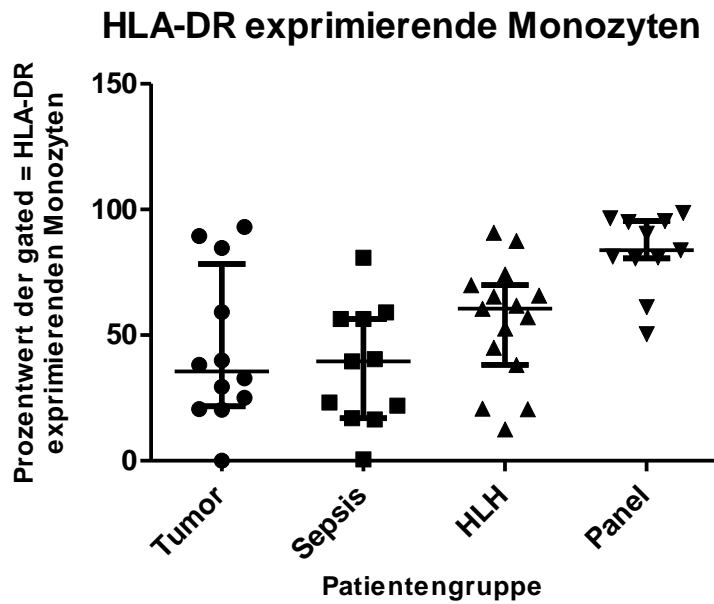


Abbildung 9: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH [= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [= gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 9: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0008
P < 0.05?	Ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	16,68
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Panel	ja**
Sepsis vs Panel	ja***

Betrachtet man Abbildung 9, fällt die verminderte monozytäre HLA-DR-Expression der drei Krankheitsgruppen im Vergleich zur Panel-Gruppe auf, deren Werte bis auf zwei Ausnahmen ziemlich nahe beieinander liegen (Median: 83,9%). Im Gegensatz dazu sind die Werte der Gruppen HLH (Median: 60,58%), Sepsis (Median: 39,53%) und Tumor (Median: 35,5%) breit gestreut. Die grösste Differenz ist zwischen der Sepsis- und der Panel-Gruppe ersichtlich und wird durch den p-Wert ($p = 0,0008$) untermauert.

3. Ergebnisse

3.1.7 CD123⁺/HLA-DR⁺

Abbildung 10 zeigt den prozentualen Anteil CD123⁺/HLA-DR⁺-positiver Monozyten im Monozytenfenster.

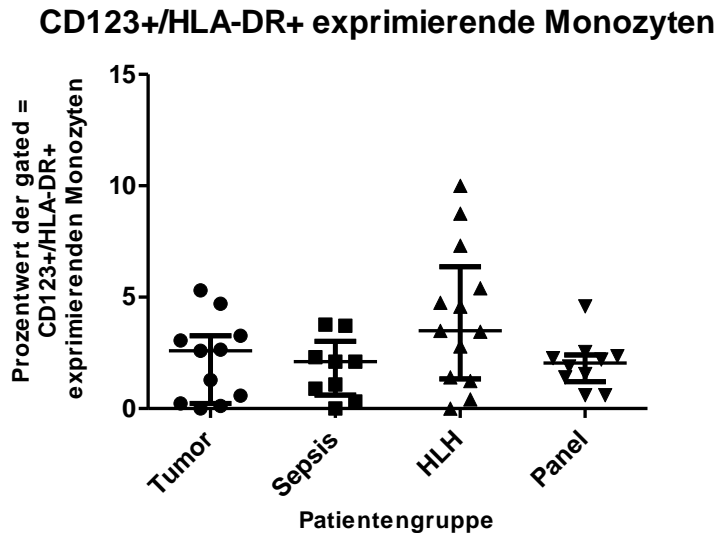


Abbildung 10: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 10: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,1842
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	4,836
Dunn's Multiple Comparison-Test	p < 0,05
-	-

Bei rein grafischer Betrachtung der oberen Abbildung fällt das im Vergleich zu den anderen Gruppen breitere CD123⁺/HLA-DR⁺-Expressionsmuster der HLH-Gruppe auf. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind statistisch gesehen jedoch nicht von Bedeutung.

3. Ergebnisse

3.1.8 BDCA-2

Die untere Abbildung zeigt den prozentualen Anteil BDCA-2-positiver Monozyten im Monozytenfenster. BDCA-2 ist ein spezifischer Marker der plasmazytoiden dendritischen Zellen.

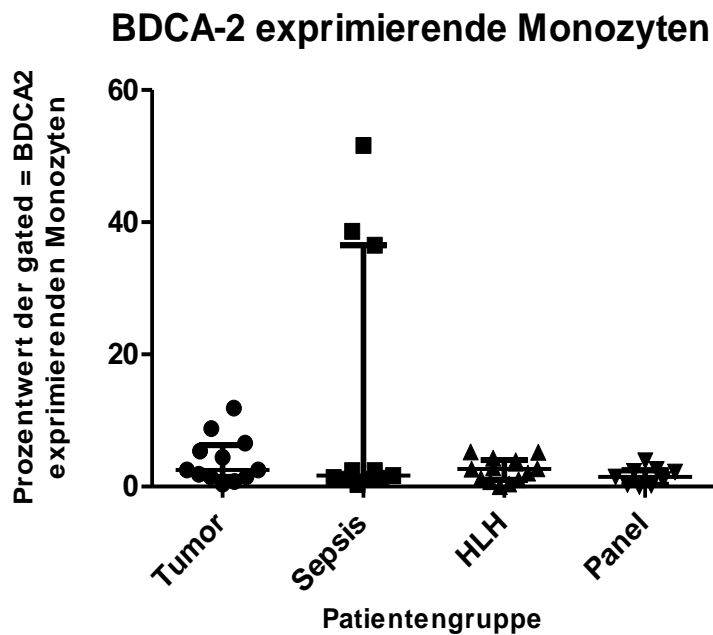


Abbildung 11: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 11: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster;

Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,3195
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	3,51
Dunn's Multiple Comparison-Test	
-	-

3. Ergebnisse

Bei Betrachtung der Abbildung 11 stechen vor allem die drei erhöhten Werte der Sepsis-Gruppe ins Auge. Die restlichen Werte der Sepsis-Gruppe überschreiten, ebenfalls wie die Werte der Gruppen HLH und Panel, die 6%-Marke nicht. Eine leicht erhöhte BDCA-2-Expression ist in der Tumor-Gruppe zu sehen, welche statistisch gesehen jedoch nicht ins Gewicht fällt.

3.1.9 CD39

Abbildung 12 zeigt den prozentualen Anteil CD39-positiver Monozyten im Monozytenfenster. CD39 (auch Ecto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1) ist wichtig für die Regulierung des Nukleosidlevels und der Thrombozytenaggregation.

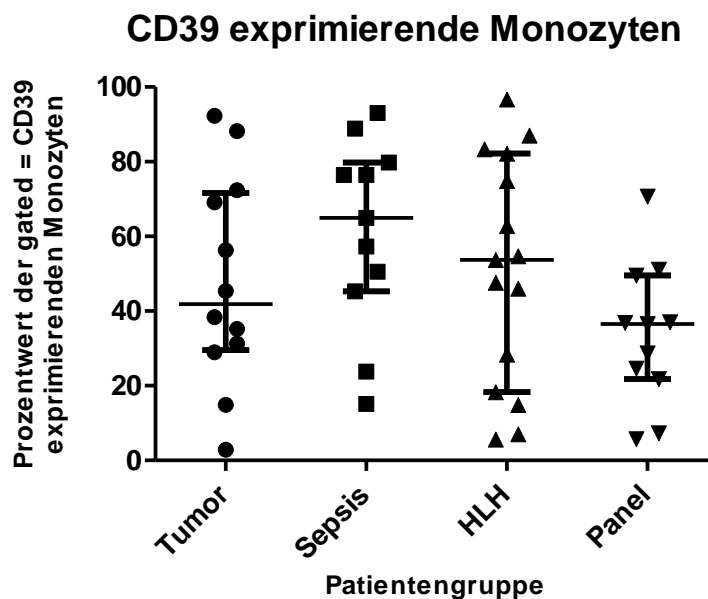


Abbildung 12: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 12: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster;
Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,1318
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	5,616
Dunn's Multiple Comparison-Test	p < 0,05
-	-

Bei genauer Betrachtung der Abbildung 12 kann man eine erhöhte monozytäre CD39-Expression aller drei Krankheitsgruppen im Vergleich zur Panel-Gruppe (Median: 36,6%) erkennen, wobei der Unterschied zur Sepsis-Gruppe (Median: 64,94%) am deutlichsten ausfällt. Der p-Wert ($p = 0,131$) weist auf Tendenzen zu Unterschieden hin, schliesst jedoch signifikante Differenzen aus.

3.1.10 CD64

In Abbildung 13 ist der prozentuale Anteil CD64-positiver Monozyten im Monozytenfenster dargestellt. CD64 ist der monomere Fc-Rezeptor, welcher eine wichtige Rolle in der Beseitigung von Antigenen spielt. Die beiden anderen Fc-Rezeptoren CD16 und CD32 binden eher Immunkomplexe als monomeres Immunglobulin.

3. Ergebnisse

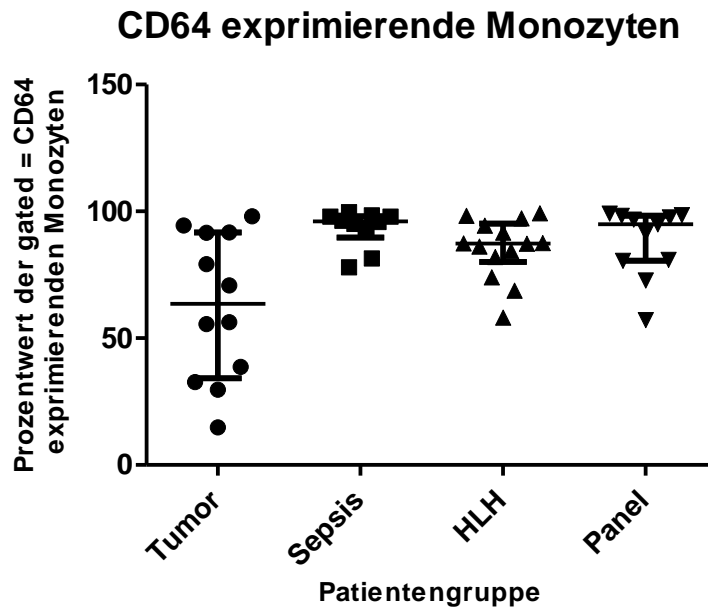


Abbildung 13: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 13: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn´s Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0101
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	11,33
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Sepsis	p < 0,05 ja*

Bei Betrachtung der oberen Abbildung fällt vor allem die verminderte monozytäre CD64-Expression der Tumor-Gruppe mit sehr gestreuten Werten von 14,8-98,1% auf, wohingegen in der Sepsis-Gruppe mit Werten von 77,9-99,7% die größte CD64-Expression zu erkennen ist. Der deutliche Unterschied zwischen den beiden Gruppen wird durch den p-Wert ($p = 0,01$) belegt.

3. Ergebnisse

3.1.11 CD80

Abbildung 14 zeigt den prozentualen Anteil CD80-positiver Zellen im Monozytengate, welches aufgrund der physikalischen Eigenschaften monozytärer Zellen gewählt wurde.

CD80 gehört zur B7-Familie und reguliert die Immunantwort via kostimulatorischer und koinhibitorischer Signale.

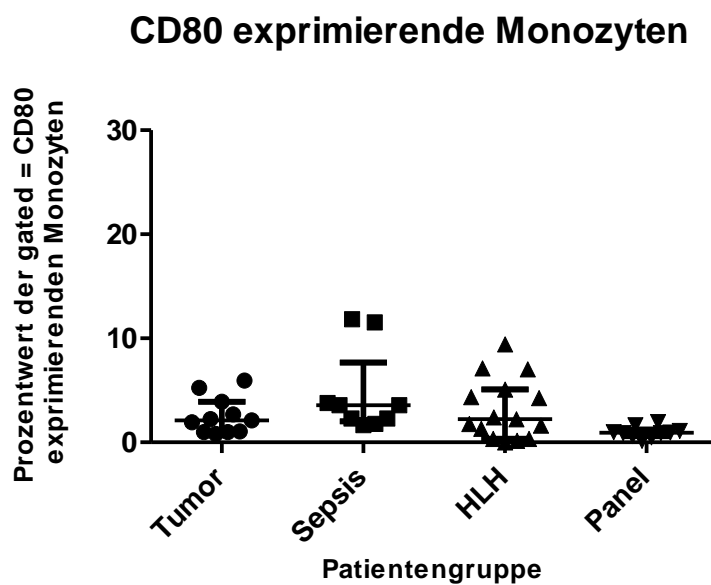


Abbildung 14: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 14: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0083
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	11,76
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Sepsis vs Panel	ja**

3. Ergebnisse

Nimmt man Abbildung 14 in Augenschein, fällt die grössere monozytäre CD80-Expression der Gruppen Tumor, HLH und vor allem Sepsis im Vergleich zur Panel-Gruppe (Median: 0,9%) auf. Der p-Wert ($p = 0,008$) belegt den Unterschied Sepsis vs. Panel.

3.1.12 CD86

Die untere Abbildung zeigt den prozentualen Anteil CD86-positiver Zellen im Monozytengate. CD86 wird auf den APC exprimiert und ist Mitglied der B7-Familie. Es vermittelt die für die T-Zellaktivierung notwendigen kostimulatorischen Signale.

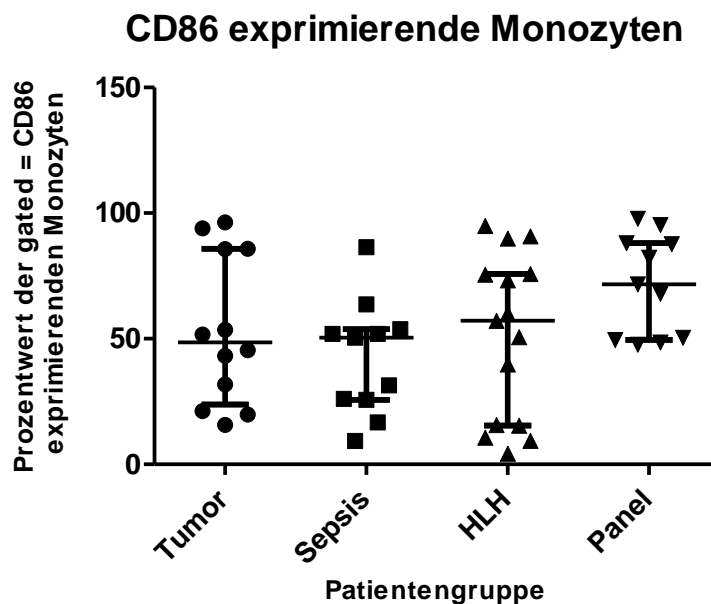


Abbildung 15: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 15: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster;
Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,1916
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	4,743
Dunn's Multiple Comparison-Test	p < 0,05
-	-

Bei Betrachtung von Abbildung 15 fällt eine verminderte monozytäre CD86-Expression aller drei Krankheitsgruppen im Vergleich zur Panel-Gruppe auf, in welcher kein Wert unter 47,7% liegt, während in den Gruppen Tumor, Sepsis und HLH breite Streuungen der Werte zu beobachten sind. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind statistisch gesehen jedoch nicht von Bedeutung.

3.1.13 PDL-2

Abbildung 16 zeigt den prozentualen Anteil PDL-2-positiver Zellen im Monozytengate. PDL-2 ist, zusammen mit PDL-1 Ligand für PD-1, welches wiederum inhibitorisch auf T-Zellen wirkt und dadurch ihre Aktivierung verhindert.

3. Ergebnisse

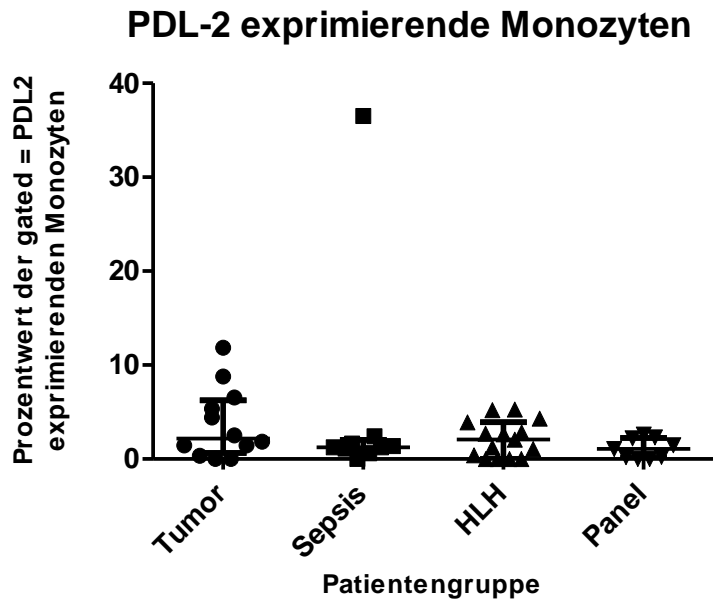


Abbildung 16: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 16: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn´s Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,3716
P < 0.05?	-
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	3,133
Dunn's Multiple Comparison-Test	
-	-

In der oberen Abbildung kann man bei rein visueller Betrachtung für die Gruppen Tumor und HLH eine im Vergleich zur Panel- und Sepsis-Gruppe erhöhte PDL-2-Expression erkennen. Weiterhin sticht in der Sepsis-Gruppe ein hoher 36,5%-Wert ins Auge; die restlichen Werte (0-2,43%) sind, ebenso wie die Werte der Panel-Gruppe (0-2,31%), gering. Diese Unterschiede fallen statistisch gesehen jedoch nicht ins Gewicht (p-Wert = 0,371).

3. Ergebnisse

3.1.14 CD40

In der unteren Abbildung ist der prozentuale Anteil CD40-positiver Zellen im Monozytengate, welches aufgrund der physikalischen Eigenschaften monozytärer Zellen gewählt wurde, dargestellt. CD40 gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Es ist ein kostimulatorisches Molekül welches APC aktiviert und an der Auslösung der Immunantwort beteiligt ist.

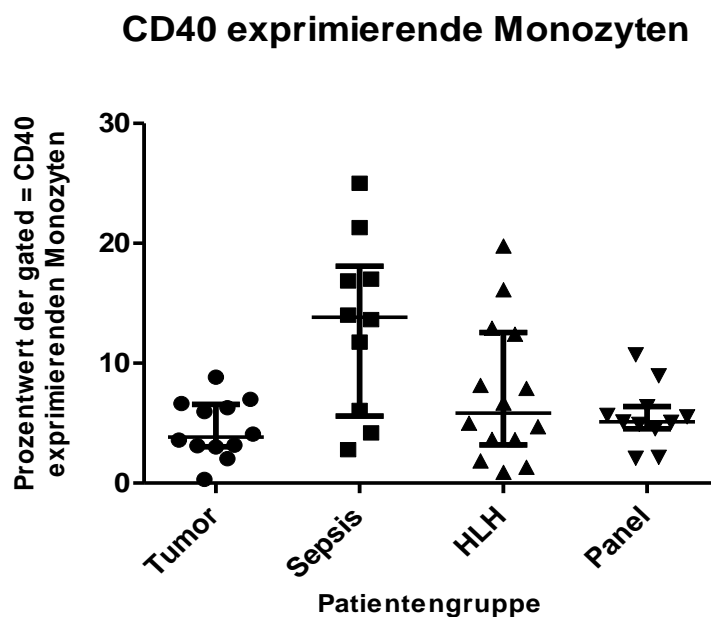


Abbildung 17: Prozent CD83-positive Monozyten im Monozytenfenster. Scatterdiagramm mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH[= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der gated = CD83-exprimierenden Monozyten.

Tabelle 17: Prozent CD83-positiver Monozyten im Monozytenfenster; Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0255
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	9,301
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Sepsis	p < 0,05
	ja*

3. Ergebnisse

Bei Betrachtung der Abbildung 17 fällt zum einen die Tumor-Gruppe mit einer geringeren CD40-Expression (Median: 3,84%) als die Panel-Gruppe (Median: 5,11%) auf. Zum anderen sticht die im Vergleich dazu erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40 der Gruppen HLH (Median: 5,85%) und vor allem Sepsis (Median:13,8%) ins Auge. Ein statistisch bedeutender Unterschied hat sich zwischen den Gruppen Tumor und Sepsis ergeben, was durch den p-Wert ($p = 0,025$) untermauert wird.

3.2 RELATIVE ANTEILE VON MONOZYTEN IN DEM UNTERSUCHTEN PATIENTENMATERIAL

Abbildung 18 zeigt die prozentualen Anteile der durch die Scattereigenschaften definierten Monozyten in den untersuchten Patientengruppen.

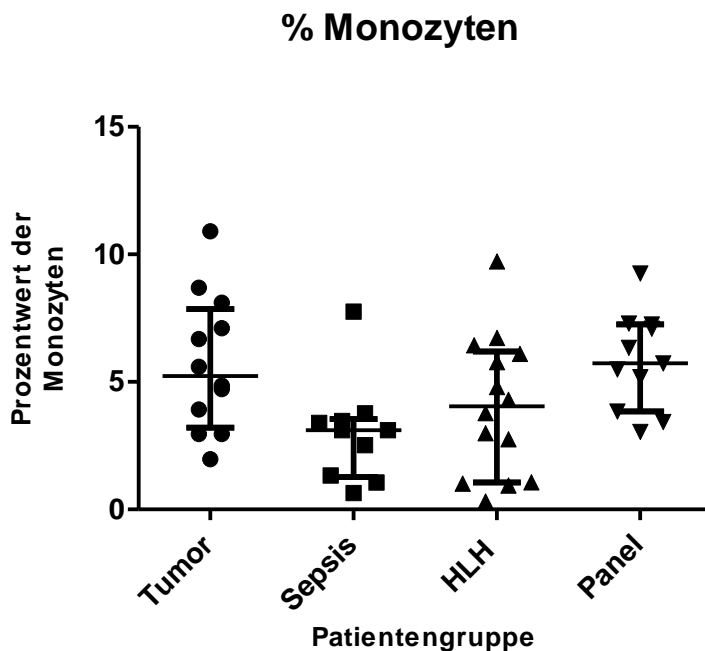


Abbildung 18: Relativer Anteil der Monozyten; Scatterdiagramme mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH [= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Percentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Percentile; y-Achse: Prozentwert der Monozyten.

3. Ergebnisse

Tabelle 18: Relativer Anteil der Monozyten.

Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	0,0277
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	9,122
Dunn's Multiple Comparison-Test	
-	p < 0,05
-	-

Die monozytären Zellen sind bei Sepsis und HLH im Vergleich zur Tumor- und Panel-Gruppe vermindert. Die Mediane der Tumor- und der Panel-Gruppe liegen relativ nahe beieinander (Median Tumor-Gruppe: 5,2%; Median Panel-Gruppe: 5,7%) und innerhalb der Sepsisgruppe fallen bis auf eine Ausnahme die geringsten Werte auf. Eine breite Streuung der Werte kann in der HLH-Gruppe beobachtet werden.

3.3 RELATIVE ANTEILE VON LYMPHOZYTEN IN DEM UNTERSUCHTEN PATIENTENMATERIAL

In der unteren Abbildung ist der relative Anteil der Lymphozyten der Krankheitsgruppen Sepsis, HLH, Tumor sowie der Panelgruppe dargestellt.

3. Ergebnisse

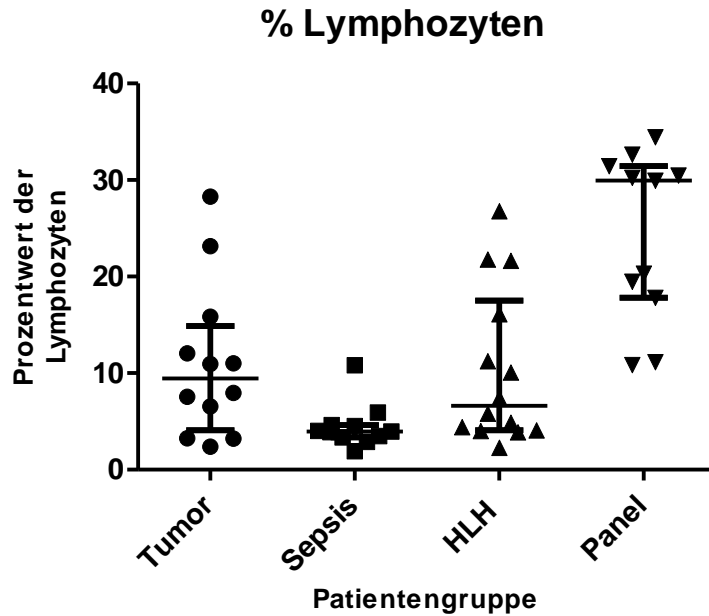


Abbildung 19: Relativer Anteil der Lymphozyten; Scatterdiagramme mit Einzelmesswerten; x-Achse: Einteilung nach Patientengruppe (Tumor, Sepsis, HLH [= Hämophagozytische Lymphohistiozytose], Panel [=gesund]); obere horizontale Balken: 75% Perzentile; mittlere horizontale Balken: Median; untere horizontale Balken: 25% Perzentile; y-Achse: Prozentwert der Lymphozyten.

Tabelle 19: Relativer Anteil der Lymphozyten.

Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Dunn's Multiple Comparison- Tests.

Kruskal-Wallis-Test	
p-Wert	< 0,0001
P < 0.05?	ja
H-Wert (Kruskal-Wallis statistic)	22,05
Dunn's Multiple Comparison-Test	
Tumor vs Panel	ja*
Sepsis vs Panel	ja***
HLH vs Panel	ja*

Der Lymphozytenanteil variiert bei Patienten mit Tumoren zwischen 2,39% und 28,3% (Median: 9,5%). Bei Patienten mit Sepsis und im septischen Schock ist der Anteil der Lymphozyten von allen nukleären Zellen am Geringsten. HLH-Patienten zeigen z.T. hohe, aber auch sehr niedrige Lymphozytenanteile. In der Panel-Gruppe wurden zwei Untergruppen identifiziert, die sich im Lymphozytenanteil

3. Ergebnisse

unterscheiden. Alle drei Krankheitsgruppen unterscheiden sich signifikant von der Panel-Gruppe, am deutlichsten ausgeprägt ist der Unterschied allerdings zwischen der Sepsis- und der Panel-Gruppe.

4. DISKUSSION

4.1 CD14

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bei Tumor, HLH und Sepsis eine im Vergleich zur Panel-Gruppe verminderte CD14-Expression. Des Weiteren wurde festgestellt, dass monozytäre Zellen bei Sepsis und HLH im Vergleich zu Tumorpatienten und zur Panel-Gruppe vermindert zu sein scheinen. Dies würde die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von de Werra und Heinzelmann bestätigen. Heinzelmann et al. stellten fest, dass die CD14-Expression bei Sepsis abnimmt und dass diese mit dem Outcome der Patienten korreliert (Heinzelmann et al. 1996). De Werra et al. sind nach ihren Untersuchungen unter anderem zu dem Ergebnis gekommen, dass die Anzahl zirkulierender Monozyten und die monozytäre CD14-Expression bei Patienten mit septischem Schock signifikant geringer ist (de Werra et al. 2001).

Die Schlussfolgerung von Schaaf et al. nach ihren Untersuchungen ist, dass für septische Patienten eine erhöhte monozytäre CD14-, TLR-2- und TLR-4-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen charakteristisch ist. Den letalen Ausgang sehen sie mit einer Herabregulierung der monozytären TLR-2- und CD14-Expression assoziiert, dieses wiederum in Korrelation mit einer reduzierten Zytokininduzierbarkeit. Ihren Ergebnissen nach wird angedeutet, dass CD14 und TLR-2 eine Schlüsselrolle hinsichtlich der monozytären Hyporesponsivität während schwererer Sepsis zukommt (Schaaf et al. 2009).

CD14 ist unter anderem Rezeptor für LPS, Peptidoglykane gram-positiver Bakterien, Lipoproteinen von Spirochäten und anderen mikrobiellen Bestandteilen (Dziarski et al. 2000). Man unterscheidet zwischen einer löslichen (sCD14) und einer membrangebundenen (mCD14) Form. MCD14 ist ein 53 kD Glykoprotein, welches durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert ist. Das Molekulargewicht des sCD14 ist aufgrund seiner verschiedenen Ursprungsorte variabel (48-, 53-, 55 kD). Beide Formen haben Rezeptorfunktion für LPS (Viriyakosol et al. 2000) und sind Zielmolekül dafür (Gupta et al. 1996). Die CD14-Expression ist auf Monozyten und Makrophagen besonders stark; auf Neutrophilen Granulozyten ist die Expression vergleichsweise zehnmal niedriger. Die Hauptaufgabe von CD14 liegt in der Präsentation des LPS an die „Toll-like“-

Rezeptoren. Durch die TLR's wird dann das Signal an die Zelle vermittelt, die Entzündungskaskade in Gang gesetzt.

CD14 ist also von entscheidender Bedeutung für die LPS-vermittelte Zellstimulation (Haziot et al. 1988) und somit nicht nur ein Reifemarker für Monozyten, sondern auch Endotoxin-/LPS-Rezeptor. Da eine transmembranöse Region fehlt, kann CD14 die Signale nicht selbst vermitteln.

CD14 und TLR-2 scheinen eine Schlüsselrolle beim septischen Geschehen zu spielen und werden in Zukunft sicherlich noch genauer analysiert werden. Vor allem CD14 könnte als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt und Indikator für das klinische Outcome eine große Rolle spielen.

4.2 TLR-2 UND TLR-4

Unsere Datenauswertung ergab eine deutlich erhöhte TLR-2-Expression der Sepsis-Gruppe im Vergleich zur Panel-Gruppe, was auch durchaus logisch erscheint, da es sich bei den Toll-Like Rezeptoren um pathogenspezifische Marker handelt. Dieses Ergebnis würde die Untersuchung von Johnson et al. stützen. Die Arbeitsgruppe hatte festgestellt, dass bei Patienten mit bakteriell bedingter Sepsis TLR-2 hochreguliert wird (Johnson et al. 2007). Auch Härter et al. stellten bei humaner Sepsis eine erhöhte TLR-2 und TLR-4-Expression auf Neutrophilen und Monozyten fest (Harter et al. 2004).

Hinsichtlich der TLR-4-Expression konnten wir einen deutlichen Unterschied zwischen der Tumor-Gruppe und der HLH-, bzw. der Panel-Gruppe feststellen. Erstaunlicherweise war der prozentuale Anteil TLR-4-positiver Monozyten innerhalb der Sepsis-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant erhöht, obwohl es sich bei TLR-4 um einen pathogenspezifischen Marker handelt. Dies wiederum könnte mit der schon erwähnten verminderten CD14-Expression bei Sepsis im Zusammenhang stehen.

Es gilt schon lange als gesichert, dass die chronische Entzündung mit der Karzinogenese und der Tumorprogression im Zusammenhang steht. Kelly et al. haben die TLR-4-Expression der epithelialen Krebszellen des Ovars untersucht und sehen den TLR-4 -Signalweg als Verantwortlichen für die Ausschüttung großer Mengen proinflammatorischer Zytokine, durch welche das Tumorstadium und die Paclitaxel-Chemoresistenz begünstigt werden (Kelly et al. 2006). Tumorzellen scheinen in der Lage zu sein das Immunsystem so zu beeinflussen,

4. Diskussion

dass jene Zytokine produziert und ausgeschüttet werden, welche das Tumorwachstum und Metastasierung begünstigen (Chen et al. 2007).

TLR-2 und TLR-4 sind essentiell für die mikrobielle Erkennung von Pathogenen und für die Wirtsabwehr. Sie erkennen Bakterien, bzw. deren Zellwandkomponenten und setzen Signaltransduktionswege in Gang, an deren Ende NF- κ B die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert. Ebenso werden kostimulatorische Moleküle induziert.

TLR-2 wird hauptsächlich von Zellen myeloiden Ursprungs (Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen) exprimiert und wurde zunächst als Zellaktivierungsrezeptor für Gram-negative LPS (Lipopolysaccharide) identifiziert. Mittlerweile hat man jedoch erkannt, dass er vor allem Rezeptor für Gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Mykoplasmen, Spirochäten, Lipoteichonsäure, Lipoprotein aus der Zellwand und Zellmembrankomponenten ist (Dziarski et al. 2000) (Faure et al. 2001). Somit übernimmt es eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Bestandteilen Gram-positiver Bakterien.

Beide, sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien aktivieren folgenden Signalweg: TLR-2 \rightarrow MyD88 \rightarrow IRAK \rightarrow TRAF \rightarrow NIK \rightarrow IKK \rightarrow NF- κ B, durch welchen dann die Transkription des Interleukin-8 (IL-8)-Gens induziert wird. Somit stellt TLR-2 einen funktionellen Rezeptor für Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien dar und induziert die Aktivierung von IL-8 (Dziarski et al. 2000).

TLR-4 spielt als Rezeptor für Gram-negative Bakterien eine entscheidende Rolle und wird auf Monozyten und B-Zellen exprimiert. Für die Erkennung von LPS sind jedoch noch drei weitere Moleküle notwendig - LPS-Binde-Protein (LBP), CD14 und MD-2. Durch LPB, eine Lipidtransferase, wird der Transfer von LPS von der äußeren Bakterienmembran zu CD14 katalysiert. Dann präsentiert CD14 LPS dem TLR-4/MD-2-Rezeptorkomplex (Miyake 2006). Der mCD14-TLR-4-mMD-2-Komplex ist dann in der Lage das Aktivierungssignal des LPS über die intrazelluläre Domäne des TLR-4 zum Zytosol zu übermitteln (Ohnishi et al. 2007). MD-2 bindet auch mit TLR-2, die Bindung ist jedoch schwächer als mit TLR-4 (Dziarski et al. 2000). Untersuchungen haben ergeben, dass durch Interleukin-2 (IL-2) die TLR-4-Expression der peripheren Monozyten zunimmt, die TLR-4-Expression der peripheren B-Zellen durch IL-2 jedoch nicht beeinflusst wird. Gegensätzlich ist auch, dass IL-4 die TLR-4-Expression auf Monozyten herab

reguliert, auf B-Zellen die Expression durch Interleukin-4 jedoch steigt (Mita et al. 2002). Die Aktivierung von TLR-2 und TLR-4 resultiert in einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine einschließlich TNF- α und IL-6, welche für Sepsis charakteristisch sind (Skinner et al. 2005).

4.3 CD83

Die Analyse unserer Daten zeigte eine bei Tumor, Sepsis und HLH im Vergleich zur Panel-Gruppe leicht erhöhte monozytäre CD83-Expression. Bei einem p-Wert = 0,061 kann man jedoch nur von Tendenzen zu Unterschieden sprechen. Die leicht erhöhte CD83-Expression bei Sepsis könnten dadurch erklärt werden, dass durch Lipopolysaccharide (LPS) eine verstärkte Expression von CD83 auf dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen induziert werden kann (Cao et al. 2005).

Lundell et al. haben eine in vitro Studie durchgeführt und das Nabelschnurblut Neugeborener untersucht. Dendritische Zellen waren in der Lage, sowohl sCD83 als auch sCD14 nach Stimulation mit grampositiven und gramnegativen Bakterien zu induzieren. Monozyten induzierten nur sCD14, vor allem nach Stimulation mit den grampositiven *C. perfringens* oder *S. aureus*. Des Weiteren hat die Lundell-Arbeitsgruppe herausgefunden, dass die allergische, durch Birken ausgelöste Th2-Differenzierung durch sCD14 und sCD83 inhibiert wird, indem die IL-13 Produktion und Expression unterdrückt wird (Lundell et al. 2007).

Lange Zeit galt CD83 als hochspezifischer Reifemarker für dendritische Zellen. Da CD83-Expression sowohl im Gehirn, als auch auf Thymusepithelzellen festgestellt werden konnte, zeigt allerdings, dass seine Expression nicht nur für dendritische Zellen spezifisch ist. (Kretschmer et al. 2009). In diversen Studien wurde in vivo und in vitro die Expression von CD83 auf verschiedenen Zelltypen, wie aktivierten T- und B-Lymphozyten, regulatorischen T-Zellen, aktivierten Makrophagen, Neutrophilen und einer Subpopulation regulatorischer NK-Zellen festgestellt. (Kretschmer et al. 2009). Beständig wird es jedoch nur auf aktivierten dendritischen Zellen exprimiert.

4.4 CD163

Unsere Untersuchungen ergaben den deutlichsten Unterschied in der monozytären CD163-Expression zwischen der Tumor-Gruppe, welche die mit Abstand geringsten Werte aufwies und der Sepsis-Gruppe, für welche die höchsten Werte kennzeichnend waren. Die CD163-Expression kann durch Glukokortikoide (Hogger et al. 1998) (Zwadlo-Klarwasser et al. 1990), antiinflammatorische Mediatoren (Buechler et al. 2000b) und durch ein chronisches Entzündungsgeschehen (Topoll et al. 1989) erhöht werden. Sowohl diese Tatsache, als auch eine Hämorrhagie könnten eine mögliche Erklärung für die erhöhten Werte der Sepsis-Gruppe sein. Högger et al. haben festgestellt, dass die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten durch sCD163 gehemmt werden kann (Hogger et al. 2001). Dies könnte neben der Lymphozytenapoptose eine weitere Erklärung für den verminderten Lymphozytenanteil bei Sepsis sein.

Da das Hämoglobin in freier Form starke toxische Wirkung hat, muss es zu Bilirubin und Eisen metabolisiert werden. Es wird von Haptoglobin gebunden und zu den Makrophagen transportiert. Der Ligand für CD163 ist der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex. Weder Haptoglobin alleine, noch Hämoglobin zeigen große Affinität um CD163 zu binden. Da der Komplex jedoch mit hoher Affinität anbindet und eine hohe endozytische Kapazität besitzt, wird angenommen, dass CD163 für die Clearance des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes aus dem Blut verantwortlich ist (Schaer et al. 2006). Somit trägt CD163 wesentlich zur Entgiftung von Hämoglobin bei, welches in freier Form aufgrund oxidativer Eigenschaften des Eisens der Hämgruppe stark toxische Wirkung hat. sCD163 wird auf einen inflammatorischen Reiz hin exprimiert und ist in hohen Konzentrationen bei Entzündungen nachweisbar. Daraus ergibt sich seine antiinflammatorische Bedeutung und aufgrund seiner Rolle eines inflammatorischen Mediators wird sCD163 bei Entzündungen herangezogen. Z.B. ist sCD163 bei Patienten mit rheumatischer Arthritis erhöht. MCD163 wird nicht nur auf reifen Monozyten und Makrophagen, sondern auch auf monozytären Leukämiezellen exprimiert. Das kann man sich bei der Immunphänotypisierung und der Untersuchung, ob es sich um histiozytische Lymphome, myeloide Leukämie oder Myelodysplasie handelt zu Nutze machen (Davis et al. 2005). CD163 mRNA und die Proteinexpression wird durch Lipopolysachharide (LPS), IFN- γ und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) herab

reguliert; Interleukin-6 (IL-6) und das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) induzieren CD163 mRNA in mononukleären Zellen stark. Die Immunsuppressiva Cortisol und Cyclosporin A beeinflussen die CD163 mRNA-Expression nicht signifikant, wohin gegen Dexamethason die CD163 mRNA stark induziert (Buechler et al. 2000a).

4.5 CD1A

Bezüglich der monozytären CD1a-Expression konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Panel- und den im Vergleich dazu deutlich erhöhten Tumor-Werten festgestellt werden. Adachi et al. haben die CD1a-Expression in PEComas untersucht. PEComa stellen eine Gruppe benigner und maligner mesenchymaler Tumoren dar, für dessen Großteil eine Expression melanozytärer (HMB-45 und/oder Melan A) und muskulärer Marker (Aktin (SMA) und /oder Desmin) charakteristisch ist. Von den neunzehn untersuchten PEComas wiesen achtzehn eine SMA und HMB-45-, und sechzehn eine Melan A-Expression auf. Im Gegensatz dazu wurde auf allen neunzehn Tumoren eine CD1a-Expression festgestellt. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass CD1a als sensitiver PEComa-Marker eingesetzt werden könnte (Adachi et al. 2008).

In weiteren Studien wurde eine hohe Zahl CD1a⁺ Zellen in malignen Neoplasien mit einer günstigeren Prognose, verminderter Tumorrekurrenz und weniger Metastasen in Verbindung gebracht (Becker 1992, Inoue et al. 1993).

Von Hillenbrand et al. wurde die CD1a-Zelldichte von Brustkrebs im Vergleich zu gesundem Gewebe untersucht und das Ergebnis war eine signifikant größere CD1a-Zelldichte im Tumorgewebe als im gesunden Gewebe (Hillenbrand et al. 1999). Die CD1a-Expression scheint vom funktionellen Status dendritischer Zellen abhängig zu sein, da die CD1a-Expression während Antigenaufnahme hoch und während der Antigenpräsentation vermindert ist (Moulon et al. 1991). Weshalb die antitumorale Immunantwort unzureichend ist, wurde bislang noch nicht geklärt und es gibt viele Mechanismen die erklärend dafür sein könnten. Fest steht, dass CD1a bei Tumoren verstärkt exprimiert wird, unabhängig davon welchen Ursprungs der Tumor ist. Ob diese verstärkte Expression bei Tumoren auch im Zusammenhang mit der Präsentation von Lipidantigenen steht, ist nicht zu beantworten.

CD1a ist ein antigenpräsentierendes Molekül, welches mit den MHC-I und MHC-II-Molekülen entfernt verwandt ist. Im Gegensatz zu klassischen MHC-I-Molekülen, welche Peptide präsentieren, präsentieren diese hauptsächlich hydrophobe Antigene (Raftery et al. 2008). Sie binden Lipidantigene, präsentieren diese den T-Zellen und induzieren somit eine T-Zellantwort. Beim Menschen existieren vier Isoformen des CD1-Moleküls, die in zwei Gruppen aufgeteilt sind: Gruppe I bestehend aus CD1a, CD1b und CD1c. Gruppe II bestehend aus CD1d (Lawton et al. 2004).

CD1a übernimmt die Rolle eines koakzessorischen Moleküls in der Super-Antigen-induzierten T-Zell-Aktivierung und ist in der Lage, Aktivierungssignale durch die Monozytenmembran zu übermitteln (Gregory et al. 2000). CD1b und CD1c wirken als antigenpräsentierende Moleküle, da sie in der Lage sind mykobakterielle Lipidkomponenten an CD4⁻ CD8⁻ αβ-T-Zellen zu präsentieren (Porcelli et al. 1992)(Beckman et al. 1994, Beckman et al. 1996). Laut Gregory et al. ist CD1a in die durch bakterielle SAG ausgelöste T-Zellaktivierung und Immunantwort beteiligt (Gregory et al. 2000).

4.6 HLA-DR

Die Analyse unserer Daten zeigte eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression bei Tumor und vor allem bei Sepsis im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Somit scheint die antigenpräsentierende Funktion dendritischer Zellen bei diesen Patienten stark eingeschränkt zu sein. Es gilt schon lange als gesichert, dass die HLA-DR-Expression mit dem Outcome und dem Gesundheitszustand septischer und schwer traumatisierter Patienten im Zusammenhang steht. Die Ergebnisse von Lin et al. zeigten bei septischen Patienten eine signifikant verminderte monozytäre HLA-DR-Expression und eine Tendenz zu verminderten CD14-exprimierenden Monozyten. Des Weiteren war auch die Gesamtzahl der T-Zellen deutlich vermindert (Lin et al. 1993). Von Döcke et al. wurde gezeigt, dass eine länger als fünf Tage andauernde, abnehmende HLA-DR-Expression auf Monozyten mit schwerer Sepsis einhergeht (Döcke et al. 1997a). Hershman et al. untersuchten die HLA-DR-Expression auf Monozyten bei Traumapatienten. Patienten mit komplikationslosem Verlauf und schneller Genesung hatten nach einer Woche einen normalen HLA-DR-Expressionswert. Bei Patienten die eine schwere Sepsis entwickelten, dauerte es drei Wochen bis der HLA-DR-Wert auf

Ausgangsniveau war und bei Patienten mit negativem Outcome kehrte der HLA-DR-Wert gar nicht auf Normwert zurück (Hershman et al. 1990). Die HLA-DR-Expression korreliert mit dem klinischen Verlauf und die Messungen ermöglichen es, Patienten mit hohem Risiko eines schweren Verlaufs und letalen Ausgangs zu ermitteln (Hershman et al. 1990).

Die MHC-Klasse-II-Moleküle übernehmen eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Sie präsentieren den T-Helfer-Zellen Peptidantigene und nehmen an der Selektion der T-Lymphozyten teil (Abdulkadir et al. 1995). Durch Interferon- γ kann die HLA-DR-Expression gesteigert werden und in einigen Klasse-II negativen Zellen sogar ihre Expression induzieren. So können auch andere Zelltypen, wie Typ I Astrozyten, vaskuläre Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten MHC-II nach Stimulation mit Interferon- γ , Interleukin-5 und Interleukin-10 exprimieren (Grimm et al. 2002). Auch in neoplastischen Zellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs wurde eine häufige Expression beobachtet (Lee et al. 1999).

Die antigenpräsentierende Funktion von Monozyten kann anhand der HLA-DR-Expression ermittelt werden. Kommt es zum Zustand der Immunparalyse, so kann das erworbene Immunsystem nicht aktiviert werden, die zellvermittelte T-Lymphozytenabhängige Immunantwort findet nicht statt. Somit könnte die gezielte Beeinflussung der HLA-DR-Expression zukünftig von grosser Bedeutung sein und eine zentrale Rolle für ein positives Outcome bei schweren immunpathologischen Umständen spielen.

4.7 CD123

CD123, auch bekannt als α -Untereinheit des Interleukin-3-Rezeptors, ist ein 70-kD Glykoprotein und Mitglied der Hämatopoietin-Rezeptor-Superfamilie (Rapoport et al. 1996). CD123 wird von den meisten myeloiden Zelllinien, von Epithelzellen, Leydig-Zellen und embryonalen Stammzellen exprimiert. Die α -Untereinheit ist spezifisch für Interleukin-3 und bindet IL-3 mit niedriger Affinität (Sato et al. 1993). Zusammen mit der gemeinsamen β -Kette, welche auch den Interleukin-5- und GM-CSF- Rezeptoren zu Teil ist, bildet er den Interleukin-3-Rezeptor. Durch Interleukin-3 wird die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu myeloiden Progenitor-Zellen reguliert. Außerdem stimuliert es die Proliferation aller myeloischer Zellen (Monozyten, dendritische Zellen, Granulozyten, Thrombozyten

und Erythrozyten). Durch Interferon- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interleukin-1(IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) kann CD123 hochreguliert werden.

4.8 HLA-DR⁺/CD123⁺

Nach Auswertung der Ergebnisse konnten keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der HLA-DR⁺/CD123⁺-Expression zwischen den Gruppen Tumor, Sepsis, HLH und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Des Weiteren waren auch keine Tendenzen zu erhöhten oder verminderten Werten ersichtlich.

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) können anhand ihrer HLA-DR⁺/CD123⁺-Expression ausgemacht werden. Sie sind vor allem in der T-Zellzone der Lymphknoten um die hochendothelialen (postkapillären) Venolen zu finden (Grouard et al. 1997)(Cella et al. 1999). Nach viraler Stimulation sind sie in der Lage Th1-induzierende Zytokine wie IL-12 und IFN- α zu sezernieren (Grouard et al. 1997)(Cella et al. 1999). Cella et al. demonstrierten, dass pDC nach Stimulation mit CD40-Ligand oder dem Influenzavirus große Menge IFN Typ-I produzieren (Cella et al. 1999). Des Weiteren reagieren pDC nach Stimulation mit CPG-ODN mit hoher IFN Typ-I-Produktion (Krug et al. 2001a).

4.9 BDCA-2

Bezüglich der BDCA-2-Expression konnten zwischen den Gruppen Sepsis, HLH, Tumor und Panel weder signifikante Unterschiede, noch Tendenzen zu Unterschieden festgestellt werden. Zusammenfassend kann man somit sagen, dass die Analyse unserer Daten keine signifikanten Expressionsveränderungen der pDC-spezifischen Marker HLA-DR⁺/ CD123⁺ und BDCA 2 bei Sepsis, Tumor und HLH im Vergleich zur Panel-Gruppe ergeben hat.

Das Zelloberflächenprotein BDCA-2 wird auf pDC (plasmazytoiden dendritischen Zellen) exprimiert (Jaye et al. 2006) (Dzionic et al. 2002) und ist der spezifische Marker für diese Population. BDCA-2 reguliert die Funktion der pDC und bildet einen Komplex mit Fc ϵ R1 γ . Dadurch wird ein neuartiger, einen dem B-Zell-Rezeptor-Signalweg ähnlicher Signalweg aktiviert, um die immunologischen Funktionen der pDC zu regulieren (Cao et al. 2007). Die Bindung an BDCA-2 hemmt die Induktion der IFN- α/β -Synthese der PDC's. Insofern man die pDC-Produktion von Interferon α/β bei SLE (Systemischer Lupus Erythematoses) als größten pathophysiologischen Faktor betrachtet, könnte man das Triggern von

BDCA-2 als therapeutischen Ansatzpunkt zur Unterbindung der Interferon- α/β -Produktion bei den an SLE Erkrankten werten (Dzionic et al. 2001).

4.10 CD39

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte eine erhöhte monozytäre CD39-Expression bei Sepsis und HLH im Vergleich zu den Gruppen Tumor und Panel festgestellt werden, allerdings nur tendenziell, nicht signifikant. Diese tendenziell erhöhte CD39-Expression könnte dadurch erklärt werden, dass CD39 durch seine antiinflammatorischen Eigenschaften bei Inflammation vermehrt exprimiert wird, was bei Betrachtung der Pathophysiologie der Sepsis und HLH auch logisch erscheinen würde.

Die Ergebnisse einer Studie von Dwyer et al. deuten darauf hin, dass mittels CD39 in Verbindung mit CD73 regulatorische T-Zellen von anderen ruhenden oder aktivierten T-Zellen klar unterschieden werden können (Dwyer et al. 2007). Darüber hinaus stellt CD39 einen integralen Bestandteil des suppressiven Mechanismus regulatorischer T-Zellen dar, indem es den perizellulären Adenosinlevel reguliert (Deaglio et al. 2007).

CD39 ist ein Mitglied der eNTPDase-Familie und seine Aktivität hängt von der Glykolisierung ab (Hicks-Berger et al. 2000). Es spielt auch eine Rolle in der Thromboregulation, indem es das prothrombotische ADP metabolisiert. Dieses Ectoenzym ist Ca^{2+} und Mg^{2+} -abhängig und gegenüber Enzyminhibitoren, auf die die anderen ATPasen empfindlich reagieren nicht sensibel (Kaczmarek et al. 1996). Außerdem ist dieses Molekül Marker für EBV (Epstein-Barr-Virus) transformierte B-Zellen (Wang et al. 1996).

4.11 CD64

Unsere Ergebnisse zeigten vor allem bei Tumorpatienten eine verminderte monozytäre CD64-Expression. In der Sepsis-Gruppe hingegen konnte die größte CD64-Expression beobachtet werden. CD64 wird während Sepsis und einer Infektion unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine quantitativ hochreguliert und daher unter anderem zu diagnostischen Zwecken in der Neonatologie herangezogen (Bhandari et al. 2008). Man hat auch festgestellt, dass die CD64 Expressionsdichte bei Erwachsenen SIRS- und Sepsis-Patienten höher ist als die CD64-Expression auf Neutrophilen bei SIRS- Patienten ohne Sepsis (Groselj-

Grenc et al. 2008). Danikas et al. untersuchten die CD64-Antigenexpression auf PMN's und Monozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis. Sie stellten bei Patienten mit positivem Outcome eine deutlich verstärkte CD64-Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf beiden Zellpopulationen fest. Es war hingegen kein Unterschied in der CD64-Expression auf PMN's und Monozyten zwischen Patienten mit letalem Ausgang und der Panel-Gruppe zu erkennen. Somit ergibt sich eine vorteilhafte Korrelation zwischen positivem Ausgang und verstärkter CD64-Expression beider Zellpopulationen. Weiterhin stehen laut Danikas et al. auch die phagozytische Aktivität der Neutrophilen mit der CD64-Expression auf Monozyten und PMN's in Korrelation (Danikas et al. 2008).

Li et al. haben bei über zweihundert Patienten mit der Diagnose SLE die FcγR-Expression untersucht. Sie fanden heraus, dass die CD64-Expression zirkulierender Monozyten bei SLE-Patienten signifikant erhöht ist, vor allem bei zusätzlicher Lupus-Nephritis. Im Rahmen ihrer Untersuchungen wurde auch überprüft, welchen Einfluss die Kortikoidtherapie bei SLE auf die FcγRI-Expression hat. Patienten, die <40 mg Prednison pro Tag verabreicht bekamen wiesen keine Expressionsunterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf. Dahingegen wurde die tägliche Einnahme von ≥40 mg Prednison mit verminderter CD64-Expression assoziiert (Li et al. 2009).

Monozyten exprimieren drei verschiedene Fc-Rezeptoren für IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16). Durch die Interaktion dieser Rezeptoren mit dem Immunglobulin werden wichtige Prozesse wie Phagozytose, Endozytose, die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren und die verstärkte Antigenpräsentation getriggert (van de Winkel et al. 1993). Die Expression aller drei Rezeptoren und die durch IFN-γ-induzierte verstärkte CD64-Expression werden durch IL-4 negativ beeinflusst. Auch die zytotoxische Aktivität humaner Monozyten wird durch IL 4 herabgesetzt (te Velde et al. 1990).

Die Mechanismen, welche für die breite Streuung und deutlich verminderten Werte der Tumor-Gruppe verantwortlich sind, sind noch unklar und es bedarf weiterer Untersuchungen.

4.12 CD80 UND CD86

Die Analyse unserer Daten hat vor allem bei Sepsis eine erhöhte CD80-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ergeben. Bezüglich der CD86-Expression wurden für die Gruppen Sepsis, HLH und Tumor weder signifikante Unterschiede, noch Tendenzen zu Expressionsunterschieden festgestellt. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster würden die Ergebnisse von Nolan et al. bestätigen in welchen sie zu dem Schluss kommen, dass die monozytäre CD80- und CD86-Expression während des septischen Geschehens unterschiedlich reguliert wird. Die Sepsis wird mit einer deutlich erhöhten CD80-Expression assoziiert, während die CD86-Expression herab reguliert wird (Nolan et al. 2009). Dass CD80 eine wichtige Rolle in der Regulierung tödlicher Inflammationen zukommt wird gestützt durch die Tatsache, dass das CD80-Level direkt mit dem SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment) und dem Auftreten des Schocks korreliert. Von ebenso großem Interesse war die umgekehrte Korrelation zwischen den CD86-Levels und dem SOFA score, und zwar dahingehend, dass die Minderung von CD86 mit Mortalität, der Zunahme intensivpflichtiger Tage und einer erhöhten Schockwahrscheinlichkeit assoziiert ist. Des Weiteren wird für CD86 durch die negative Assoziierung von mit zirkulierenden IL-10- und IL-6-Levels eine mögliche direkte antiinflammatorische Rolle angedeutet. CD86 scheint eine protektive Rolle zu spielen und anhaltende CD86-Expression scheint mit begünstigtem Outcome zu korrelieren. Der Mechanismus, welcher zur Minderung der CD86-Expression führt bleibt jedoch nur teilweise verstanden. Zusammenfassend kann man sagen, dass die CD28-CD80-Interaktion in der akuten Phase der Sepsis und des septischen Schocks eine zentrale Rolle spielt und das Outcome entscheidend mit beeinflusst (Nolan et al. 2009). Somit könnte CD80 als therapeutisches Ziel in der zukünftigen Sepsistherapie wohl eine wichtige Rolle spielen.

Die Zelloberflächenproteine CD80 und CD86, welche zur B7-Familie gehören und sich strukturell ähneln, interagieren mit der CD28-Rezeptor-Familie auf Lymphozyten und regulieren die Immunantwort via kostimulatorischer oder koinhibitorischer Signale; ihre Liganden sind CD28 und CTLA-4. Diese werden auf regulatorischen T-Zellen exprimiert (Zheng et al. 2004). Die Wechselwirkungen zwischen B7-CD28 spielen eine unentbehrliche Rolle hinsichtlich der Entwicklung und Erhaltung von regulatorischen T-Zellen (Wang et al. 2004). Der Signalweg B7-

1/B7-2:CD28/CTLA-4 ist äußerst wichtig, da es durch CD28 zur erhöhten T-Zell-Aktivierung kommt, wohingegen CTLA-4 die T-Zell-Antwort herab reguliert (Buhlmann et al. 2003), (Greenwald et al. 2005). Nach Interaktion mit CD28 kommt es zur T-Zellaktivierung via CD3/T-Zell Rezeptorkomplex (Azuma et al. 1993). Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen nötig ist für eine effektive Immunantwort und Immuntoleranz (Greenwald et al. 2005). Außerdem haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass CD80 als induzierbarer Regulator des glomerulären Filterapparates in der Niere wirkt. Die Expression wird durch LPS induziert und B7-1 wird als neue Spleiss-Variante von Podozyten exprimiert (Greenwald et al. 2005). Die Wechselwirkung zwischen CD80 und CD86 mit CD28 während T-Zell-Aktivierung erhöht die Zytokinproduktion, die Proliferation und verlängert die Lebensdauer der T-Zellen. Im Gegensatz dazu wird die Zytokinproduktion, die Proliferation und der Zellzyklus bei Interaktion von B7-1 und B7-2 mit CTLA-4 gehemmt (Bennett et al. 2003). Folglich ist ein Gleichgewicht zwischen den aktivierenden und hemmenden Signalen notwendig um eine effektive Immunantwort entwickeln zu können, ebenso ist es von Nöten um Autoimmunerkrankungen vorzubeugen (Bennett et al. 2003).

Die Wechselwirkung zwischen CD28/B7 vermittelt Ko-Stimulation und steigert signifikant die T-Zell-Antwort. Im Gegensatz dazu ist das Resultat der Interaktion von CTLA-4 mit B7 eine herabgesetzte T-Lymphozyten-Aktivität und Regulierung der Immunantwort (Fife et al. 2008).

CD86 wird auf dendritischen Zellen, B-Gedächtniszellen, auf Makrophagen und auf B-Zellen der Keimzentren exprimiert. Es reguliert zusammen mit CD80 die T-Zell-Aktivität und Toleranz. B7-2 ist, ebenso wie B7-1 ein Typ I Glykoprotein. Seine Bindungsaffinität für CD28 ist höher als für CTLA-4, wohingegen CD80 die Bindung an CTLA-4 präferiert. CD86 spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Einleitung der Immunantwort und der Autoimmunität (Kapsogeorgou et al. 2008). Man nimmt an, dass der CD86-Polymorphismus einen ätiologischer Faktor in der Entwicklung von Asthma und allergischen Erkrankungen darstellt (Corydon et al. 2007).

Wie schon beschrieben, werden beide kostimulatorischen Moleküle via CD28 stimuliert, wohingegen CTLA4 in der Lage ist sowohl als stöchiometrischer Inhibitor der CD28-CD80/CD86-Bindung zu fungieren, als auch direkt

immunsuppressive Signale in dendritischen Zellen zu induzieren (Orabona et al. 2004).

4.13 PDL-2

Die Untersuchung der monozytären PDL-2-Expression hat weder deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, noch Hinweise auf Expressionsunterschiede ergeben.

PDL-2 ist zusammen mit PDL-1 Ligand für PD-1, einem kostimulatorischen Molekül, welches inhibitorisch auf T-Zellen wirkt und auf diese Weise ihre Aktivierung inhibiert.

PD-L2 wird nur auf DC (dendritischen Zellen) und Monozyten exprimiert (Fife et al. 2008) (Konishi et al. 2004).

Obwohl PD-1 eine entscheidende Rolle bezüglich der Negativregulierung von T-Zellen spielt, wird die Funktion seiner zwei Liganden PDL-1 und PDL-2 immer noch kontrovers diskutiert. Die widersprüchlichen Ergebnisse über die Funktion von PDL-2 deuten an, dass der Ligand sowohl negativer, als auch positiver Regulator der T-Zellfunktion ist.

Laut Tseng et al. hat PDL-2 (B7-DC) eine größere kostimulierende Wirkung auf die T-Zellproliferation als B7.1 (Tseng et al. 2001) und durch IFN- γ oder IFN- γ /LPS kann die PD-L1- und PD-L2-Expression auf DC und Monozyten induziert werden (Freeman et al. 2000).

Zhang et al. sind der Meinung, dass PDL-2 einen hemmenden Einfluss auf die T-Zellaktivierung ausübt und hinsichtlich der Immuntoleranz eine essentielle Rolle spielt (Zhang et al. 2006). Von Freeman et al. wurde gezeigt, dass B7H1 und B7DC die T-Zellproliferation mittels PD-1 abhängigem Mechanismus inhibieren können (Freeman et al. 2000).

Dong et al. berichteten, dass PDL-1 (B7H1) auf einer großen Anzahl von Tumorzellen exprimiert wird und die Apoptose von tumorspezifischen T-Zellen fördert, und zwar sowohl via PD-1 abhängigem als auch via PD-1 unabhängigem Mechanismus (Dong et al. 2002).

Von Liu et al. wurde gezeigt, dass die PDL-2-Expression auf Tumorzellen die CD8 T-Zell-vermittelte Unterdrückung der Tumorzellen mittels PD-1-unabhängigem Mechanismus fördert (Liu et al. 2003).

4.14 CD40

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die höchste CD40-Expression für die Gruppe Sepsis, was angesichts der Funktion eines kostimulatorischen Moleküls auch durchaus logisch erscheinen würde. Die Gruppe Tumor dagegen imponierte mit der geringsten CD40-Expression. Nolan et al. untersuchten den Einfluss der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 und CD40 in einem murinen CLP (zökale Ligatur und Punktion)-Modell letaler polymikrobieller Sepsis. Die letale CLP (zökale Ligatur und Punktion) wurde mit einer Hochregulierung von CD40 und CD80/CD86 und ihren jeweiligen Liganden CD28 und CD154 assoziiert. Die erhöhten CD40-, CD154- und CD80-Werte untermauern die wichtige Rolle der Monozyten / Makrophagen und PMN's hinsichtlich der Entzündungsantwort bei Sepsis. Humane Untersuchungen ergaben die höchste CD40- und CD80-Expression auf zirkulierenden Monozyten septischer Patienten am ersten Tag, wobei die höchsten Levels bei Patienten mit Kreislaufversagen verzeichnet wurden. Das anschließende Absinken der Expressionslevel von CD40 und CD80 im Hinblick auf den abnehmenden Schweregrad der Erkrankung unterstreicht die kausale Rolle dieser Moleküle hinsichtlich der Entzündungsregulierung in humaner Sepsis. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80/CD86 eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort spielen. Des Weiteren suggerieren sie, dass eine kombinierte Inhibition von CD40 und CD80/CD86 die Mortalität bei Sepsis herabsetzen könnte und damit in Zukunft nicht nur als therapeutischer Ansatzpunkt, sondern auch eventuell als Biomarker für das Outcome septischer Patienten dienen könnte (Nolan et al. 2008).

Sugimoto et al. untersuchten die CD40-Expression bei vierzig Patienten mit schwerer Sepsis, von denen fünfzehn eine nachgewiesene Bakteriämie hatten und verglichen das mit den Proben von acht gesunden Kontrollpatienten. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis die Herabregulierung der monozytären CD40-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Sugimoto et al. 2003). Durch diese Ergebnisse werden die Hypothese der monozytären Deaktivierung während der schweren Sepsis und die protektive Rolle der Monozyten gestützt. Da CD40 die Inflammation zu regulieren und die Entzündungsantwort mittels multipler integraler Mediatoren wie z.B. IL-12, IL-6 und NFκB zu steuern vermag deutet darauf hin, dass CD40 eine herausragende

Funktion in der initialen Phase der polymikrobiellen Sepsis spielen könnte. Resultierend daraus untersuchten Gold et al. CD40-knockout Mäuse nach CLP (zökaler Ligatur und Punktion) und stellten bei diesen Mäusen bessere Überlebenschancen und verzögerten Todeseintritt fest. Die Verbesserung der Situation wurde mit reduzierten IL-6- und IL-10-Leveln in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus induzierten die CD40-knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach CLP(zökaler Ligatur und Punktion) keine Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ . Diese Veränderung der inflammatorischen Zytokinproduktion wird mit der Reduktion der pulmonalen und hepatischen NF- κ B- und STAT-3-Aktivität in Verbindung gebracht (Gold et al. 2003).

CD40 gehört zur Familie der "Tumor Necrosis Factor"-Rezeptoren. Es ist ein kostimulatorisches Protein, welches durch Binden seines Liganden unter anderem Antigen präsentierende Zellen aktiviert. CD40 ist an der Auslösung der Immunantwort beteiligt und seine Aktivierung ist unter anderem ein Aktivierungssignal, welches notwendig ist bei der antigenspezifischen Aktivierung naiver B-Lymphozyten. Da das B-Zell- Wachstum, die Differenzierung und der Isotypenwechsel durch CD40 reguliert werden, spielt es somit eine zentrale Rolle in der T-Zell abhängigen Immunantwort. Durch CD40 wird auch die Zytokinproduktion bei Makrophagen und dendritischen Zellen reguliert. Obwohl es ursprünglich durch seine Aktivierungsmöglichkeiten aufgefallen ist, ist CD40 auch in der Lage negative Signalübertragung in verschiedenen Zelltypen zu vermitteln (van Kooten et al. 1997).

4.15 RELATIVE ANTEILE VON MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN IN DEM UNTERSUCHTEN PATIENTENMATERIAL

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die relativen Anteile der Monozyten und Lymphozyten analysiert und ausgewertet. Es konnte ein reduzierter Monozytenanteil der Gruppen HLH und vor allem Sepsis im Vergleich zur Panel- und Tumor-Gruppe beobachtet werden. Hinsichtlich des relativen Lymphozytenanteils wiesen alle drei Krankheitsgruppen reduzierte Anteile im Vergleich zur Panel-Gruppe auf, doch vor allem die Sepsis-Gruppe stach deutlich hervor und imponierte mit stark verminderten Werten.

Das die Apoptose der Lymphozyten im Zusammenhang mit dem septischen Geschehen steht, wurde durch mehrere Studien belegt (Hotchkiss et al. 2001a, Hotchkiss et al. 1997, Hotchkiss et al. 1999a, Ayala et al. 1996). Die Arbeitsgruppen um Hotchkiss und Ayala fanden diesbezüglich heraus, dass bei humaner Sepsis die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen und der NK-Zellen unverändert blieb (Ayala et al. 1996), wohingegen die Anzahl der B- und der CD4⁺- Zellen derselben Patienten reduziert war (Hotchkiss et al. 1997, Hotchkiss et al. 1999a, Hotchkiss et al. 2001b)(Ayala et al. 1996).

In tierexperimentellen Studien konnte das Outcome der Versuchstiere durch Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 positiv beeinflusst werden (Hotchkiss et al. 1999b).

Bommhardt et al. fanden heraus, dass durch Überexpression von Akt, einer Serin/Threonin-Kinase, welche entscheidender Regulator von Zellproliferation und Zelltod gilt, die Lymphozytenapoptose verhindert und somit das Überleben der Sepsis verbessert werden kann (Bommhardt et al. 2004).

All dies deutet darauf hin, dass der gezielten Beeinflussung der Lymphozytenapoptose als möglicher neuer Therapieansatz im septischen Geschehen große Bedeutung zukommen könnte.

4.16 SCHLUSSFOLGERUNG

Mittels der Immunphänotypisierung wurde eine Subpopulationsanalyse dendritischer Zellen für die Krankheitsgruppen Sepsis, Tumor und HLH (Hämophagozytische Lymphohistiozytose) durchgeführt. Die Expressionsmuster der in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenrezeptoren wiesen teilweise deutliche Unterschiede der Krankheitsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Auch hinsichtlich der relativen Anteile der Lymphozyten und Monozyten haben sich zum Teil wesentliche Unterschiede ergeben, wobei vor allem die Veränderung des lymphozytären Zellanteils bei Sepsis ins Auge fiel. Sowohl die veränderten Expressionsmuster, als auch die verminderten relativen Anteile der Monozyten und Lymphozyten könnten zukünftig diagnostische Hinweise auf die besonderen immunpathologischen Umstände der verschiedenen Erkrankungen geben und somit einen Beitrag zur gezielteren und schnelleren Therapie leisten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Krebs stellt in Deutschland nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache dar. Dabei macht das Prostatakarzinom bei männlichen Erkrankten gut ein Viertel und das Mammakarzinom bei weiblichen Erkrankten deutlich mehr als ein Viertel aller Krebserkrankungen aus. Da mit dem Alter das Risiko einer Krebserkrankung steigt, wird die Zahl der Neuerkrankungen hinsichtlich des demografischen Wandels in Zukunft nicht rückläufig werden.

Als dritthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik ist die Sepsis zu nennen. Die Letalität ist vor allem bei Entwicklung einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks nach wie vor sehr hoch und es bedarf weiterer Forschung und Untersuchung um ein noch tieferes Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge zu erlangen um somit neue therapeutische Ansätze schaffen zu können.

Eine weitere lebensbedrohliche Erkrankung stellt die Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) dar. Aufgrund einer Überaktivierung von Makrophagen und Lymphozyten kommt es zur unkontrollierten Hyperinflammation. Bleibt sie unbehandelt, wird nicht rechtzeitig erkannt oder unzureichend therapiert, ist die Letalität hoch.

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und stellen durch ihre einzigartige Fähigkeit, Antigenpräsentation und Phagozytose zu verbinden das Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr dar. Da sie die Befähigung haben die primäre Immunantwort zu initiieren und in der Lage sind die meisten T-Zell-Antworten zu induzieren, stellen sie eine äußerst wichtige und interessante Population dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige für dendritische Zellen charakteristische Oberflächenantigene mittels farbstoffmarkierter Antikörper im Durchflusszytometer immunphänotypisiert. Anschließend wurden die Daten der Krankheitsgruppen Tumor, Sepsis, Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) und der Kontrollgruppe ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 49 Blutproben aufbereitet und gemessen. Davon waren 38 Blutproben von erkrankten

5. Zusammenfassung

Patienten, welche der Sektion Experimentelle Anästhesiologie Ulm aus der Anästhesiologischen Intensivstation der Uniklinik Ulm oder auswärtigen Kliniken zugesandt wurden. Als Negativkontrolle wurden Blutproben von 11 gesunden Probanden untersucht und ausgewertet.

Die Expression der folgenden Marker war deutlich vermindert ($p < 0,05$):

CD14 (Tumor, Sepsis und HLH vs. Panel-Gruppe), HLA-DR (Tumor vs. Panel und Sepsis vs. Panel), CD163 (Sepsis vs. Tumor) und CD64 (Tumor vs. Sepsis).

Eine eindeutig erhöhte Expression bei $p < 0,5$ konnte für die nachstehenden Oberflächenantigene beobachtet werden: TLR-2 (Sepsis vs. Panel), TLR-4 (Tumor vs. HLH und Tumor vs. Panel), CD1a (Tumor vs. Panel), CD80 (Sepsis vs. Panel) und CD40 (Tumor vs. Sepsis).

Eine Tendenz zu erhöhten Werten ($p < 0,15$) wurde für die Expression von CD83 (Tumor, Sepsis und HLH vs. Panel) und CD39 (HLH und vor allem Sepsis vs. Tumor und Panel) festgestellt.

Keinerlei bedeutsame Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen haben sich für CD123⁺/HLA-DR⁺, BDCA-2, CD86 und PDL-2 ergeben.

Die mittels Immunphänotypisierung durchgeführte Zellanalyse zeigt somit auf, dass die Subpopulationen dendritischer Zellen bei den verschiedenen Krankheitsgruppen Sepsis, HLH und Tumor verändert zu sein scheinen. Die größten Unterschiede jedoch haben sich beim septischen Formenkreis in Bezug auf die Kontrollgruppe ergeben.

Eine weitere Erkenntnis stellt die Verminderung des relativen Lymphozytenanteils dar, welche auch für die Monozytenpopulation zutrifft und sich für vor allem für die Patienten der Krankheitsgruppe Sepsis deutlich herauskristallisiert hat. Sowohl diese Feststellung, als auch die veränderten Expressionsmuster könnten in Zukunft einen weiteren Ansatzpunkt zur Beeinflussung der immunpathologischen Prozesse darstellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis

1. Abdulkadir S A, Krishna S, Thanos D, Maniatis T, Strominger J L, Ono S J: Functional roles of the transcription factor Oct-2A and the high mobility group protein I/Y in HLA-DRA gene expression. *J.Exp.Med.*, 182: 487-5002 (1995)
2. Adachi Y, Horie Y, Kitamura Y, Nakamura H, Taniguchi Y, Miwa K, Fujioka S, Nishimura M, Hayashi K: CD1a expression in PEComas. *Pathol.Int.*, 58: 169-1733 (2008)
3. Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M R: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit.Care Med.*, 29: 1303-13107 (2001)
4. Ayala A, Herdon C D, Lehman D L, Ayala C A, Chaudry I H: Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*, 87: 4261-427510 (1996)
5. Azuma M, Yssel H, Phillips J H, Spits H, Lanier L L: Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J.Exp.Med.*, 177: 845-8503 (1993)
6. Banchereau J, Steinman R M: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-2526673 (1998)
7. Becker T, Hartl F U, Wieland F: CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J.Cell Biol.*, 158: 1277-12857 (2002)
8. Becker Y: Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers--a review. *Anticancer Res.*, 12: 511-5202 (1992)
9. Beckman E M, Melian A, Behar S M, Sieling P A, Chatterjee D, Furlong S T, Matsumoto R, Rosat J P, Modlin R L, Porcelli S A: CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells. Evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J.Immunol.*, 157: 2795-28037 (1996)
10. Beckman E M, Porcelli S A, Morita C T, Behar S M, Furlong S T, Brenner M B: Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature*, 372: 691-6946507 (1994)
11. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang I M, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs K A, Valge-Archer V E, Collins M, Carreno B M: Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J.Immunol.*, 170: 711-7182 (2003)

12. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H: Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics*, 121: 129-1341 (2008)
13. Bhattacharyya M, Ghosh M K: Hemophagocytic lymphohistiocytosis--recent concept. *J.Assoc.Physicians India*, 56: 453-457(2008a)
14. Bhattacharyya M, Ghosh M K: Hemophagocytic lymphohistiocytosis--recent concept. *J.Assoc.Physicians India*, 56: 453-457(2008b)
15. Bommhardt U, Chang K C, Swanson P E, Wagner T H, Tinsley K W, Karl I E, Hotchkiss R S: Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J.Immunol.*, 172: 7583-759112 (2004)
16. Bone R C: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann.Intern.Med.*, 125: 680-6878 (1996)
17. Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101: 1644-16556 (1992)
18. Bone R C, Grodzin C J, Balk R A: Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112: 235-2431 (1997)
19. Brodeur S R, Angelini F, Bacharier L B, Blom A M, Mizoguchi E, Fujiwara H, Plebani A, Notarangelo L D, Dahlback B, Tsitsikov E, Geha R S: C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity*, 18: 837-8486 (2003)
20. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G: Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J.Leukoc.Biol.*, 67: 97-1031 (2000a)
21. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G: Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J.Leukoc.Biol.*, 67: 97-1031 (2000b)
22. Buhlmann J E, Elkin S K, Sharpe A H: A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J.Immunol.*, 170: 5421-542811 (2003)
23. Cao W, Lee S H, Lu J: CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem.J.*, 385: 85-93Pt 1 (2005)

24. Cao W, Zhang L, Rosen D B, Bover L, Watanabe G, Bao M, Lanier L L, Liu Y J: BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol.*, 5: e24810 (2007)
25. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.*, 5: 919-9238 (1999)
26. Chauvin C, Josien R: Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J.Immunol.*, 181: 11-161 (2008)
27. Chen R, Alvero A B, Silasi D A, Mor G: Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am.J.Reprod.Immunol.*, 57: 93-1072 (2007)
28. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420: 885-8916917 (2002)
29. Collins M, Ling V, Carreno B M: The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.*, 6: 2236 (2005)
30. Corydon T J, Haagerup A, Jensen T G, Binderup H G, Petersen M S, Kaltroft K, Vestbo J, Kruse T A, Borglum A D: A functional CD86 polymorphism associated with asthma and related allergic disorders. *J.Med.Genet.*, 44: 509-5158 (2007)
31. Danikas D D, Karakantza M, Theodorou G L, Sakellaropoulos G C, Gogos C A: Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin.Exp.Immunol.*, 154: 87-971 (2008)
32. Davis B H, Zarev P V: Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B.Clin.Cytom*, 63: 16-221 (2005)
33. de Werra I, Zanetti G, Jaccard C, Chiolerio R, Schaller M D, Yersin B, Glauser M P, Calandra T, Heumann D: CD14 expression on monocytes and TNF alpha production in patients with septic shock, cardiogenic shock or bacterial pneumonia. *Swiss Med.Wkly.*, 131: 35-403-4 (2001)
34. Deaglio S, Dwyer K M, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J F, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V K, Strom T B, Robson S C: Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.*, 204: 1257-12656 (2007)
35. Docke W D, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk H D, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat.Med.*, 3: 678-6816 (1997a)

36. Docke W D, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk H D, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat.Med.*, 3: 678-6816 (1997b)
37. Dong H, Strome S E, Salomao D R, Tamura H, Hirano F, Flies D B, Roche P C, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon V A, Celis E, Chen L: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat.Med.*, 8: 793-8008 (2002)
38. Dwyer K M, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T B, Robson S C: CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.*, 3: 171-1801-2 (2007)
39. Dziarski R, Gupta D: Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J.Endotoxin Res.*, 6: 401-4055 (2000)
40. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J: Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum.Immunol.*, 63: 1133-114812 (2002)
41. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J: BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J.Exp.Med.*, 194: 1823-183412 (2001)
42. Efron P, Moldawer L L: Sepsis and the dendritic cell. *Shock*, 20: 386-4015 (2003)
43. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M: Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J.Immunol.*, 166: 2018-20243 (2001)
44. Fife B T, Bluestone J A: Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol.Rev.*, 224: 166-182(2008)
45. Freeman G J, Long A J, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz L J, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne M C, Horton H F, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman M R, Carreno B M, Collins M, Wood C R, Honjo T: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.*, 192: 1027-10347 (2000)

46. Gold J A, Parsey M, Hoshino Y, Hoshino S, Nolan A, Yee H, Tse D B, Weiden M D: CD40 contributes to lethality in acute sepsis: in vivo role for CD40 in innate immunity. *Infect.Immun.*, 71: 3521-35286 (2003)
47. Gordon J: CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev.*, 9: 53-561 (1995)
48. Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H: The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.*, 23: 515-548(2005)
49. Gregory S, Zilber M, Charron D, Gelin C: Human CD1a molecule expressed on monocytes plays an accessory role in the superantigen-induced activation of T lymphocytes. *Hum.Immunol.*, 61: 193-2013 (2000)
50. Grimm M, Spiecker M, De Caterina R, Shin W S, Liao J K: Inhibition of major histocompatibility complex class II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *J.Biol.Chem.*, 277: 26460-2646729 (2002)
51. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M: Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm.*, 2008: 202646(2008)
52. Grouard G, Rissoan M C, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu Y J: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J.Exp.Med.*, 185: 1101-11116 (1997)
53. Gupta D, Kirkland T N, Viriyakosol S, Dziarski R: CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J.Biol.Chem.*, 271: 23310-2331638 (1996)
54. Hanahan D, Weinberg R A: The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-701 (2000)
55. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M: Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*, 22: 403-4095 (2004)
56. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low M G, Silber R, Goyert S M: The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J.Immunol.*, 141: 547-5522 (1988)
57. Heidecke C D, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert J R, Holzmann B: Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am.J.Surg.*, 178: 288-2924 (1999)
58. Heinzelmann M, Mercer-Jones M, Cheadle W G, Polk H C,Jr: CD14 expression in injured patients correlates with outcome. *Ann.Surg.*, 224: 91-961 (1996)

59. Henter J I, Elinder G, Soder O, Ost A: Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr.Scand.*, 80: 428-4354 (1991)
60. Henter J I, Horne A, Arico M, Egeler R M, Filipovich A H, Imashuku S, Ladisch S, McClain K, Webb D, Winiarski J, Janka G: HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr.Blood Cancer.*, 48: 124-1312 (2007)
61. Hernandez M G, Shen L, Rock K L: CD40 on APCs is needed for optimal programming, maintenance, and recall of CD8+ T cell memory even in the absence of CD4+ T cell help. *J.Immunol.*, 180: 4382-43907 (2008)
62. Hershman M J, Cheadle W G, Wellhausen S R, Davidson P F, Polk H C,Jr: Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br.J.Surg.*, 77: 204-2072 (1990)
63. Hicks-Berger C A, Kirley T L: Expression and characterization of human ecto-ATPase and chimeras with CD39 ecto-apyrase. *IUBMB Life*, 50: 43-501 (2000)
64. Hillenbrand E E, Neville A M, Coventry B J: Immunohistochemical localization of CD1a-positive putative dendritic cells in human breast tumours. *Br.J.Cancer*, 79: 940-9445-6 (1999)
65. Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H: Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum.Immunol.*, 63: 1103-111012 (2002)
66. Hogger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C: Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J.Immunol.*, 161: 1883-18904 (1998)
67. Hogger P, Sorg C: Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 288: 841-8434 (2001)
68. Hotchkiss R S, Swanson P E, Cobb J P, Jacobson A, Buchman T G, Karl I E: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit.Care Med.*, 25: 1298-13078 (1997)
69. Hotchkiss R S, Swanson P E, Freeman B D, Tinsley K W, Cobb J P, Matuschak G M, Buchman T G, Karl I E: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit.Care Med.*, 27: 1230-12517 (1999a)
70. Hotchkiss R S, Swanson P E, Knudson C M, Chang K C, Cobb J P, Osborne D F, Zollner K M, Buchman T G, Korsmeyer S J, Karl I E: Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J.Immunol.*, 162: 4148-41567 (1999b)

71. Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, Schmiege R E, Jr, Hui J J, Chang K C, Osborne D F, Freeman B D, Cobb J P, Buchman T G, Karl I E: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J.Immunol.*, 166: 6952-696311 (2001a)
72. Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, Schmiege R E, Jr, Hui J J, Chang K C, Osborne D F, Freeman B D, Cobb J P, Buchman T G, Karl I E: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J.Immunol.*, 166: 6952-696311 (2001b)
73. Inoue K, Furihata M, Ohtsuki Y, Fujita Y: Distribution of S-100 protein-positive dendritic cells and expression of HLA-DR antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to tumour progression and prognosis. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.*, 422: 351-3555 (1993)
74. Janka G E: Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur.J.Pediatr.*, 166: 95-1092 (2007)
75. Janka G E, Schneider E M: Modern management of children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br.J.Haematol.*, 124: 4-141 (2004)
76. Jaye D L, Geigerman C M, Herling M, Eastburn K, Waller E K, Jones D: Expression of the plasmacytoid dendritic cell marker BDCA-2 supports a spectrum of maturation among CD4+ CD56+ hematodermic neoplasms. *Mod.Pathol.*, 19: 1555-156212 (2006)
77. Johnson C M, Tapping R I: Microbial products stimulate human Toll-like receptor 2 expression through histone modification surrounding a proximal NF-kappaB-binding site. *J.Biol.Chem.*, 282: 31197-3120543 (2007)
78. Jordan M B, Hildeman D, Kappler J, Marrack P: An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood*, 104: 735-7433 (2004)
79. Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel J B, Anrather J, Beaudoin A R, Bach F H, Robson S C: Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J.Biol.Chem.*, 271: 33116-3312251 (1996)
80. Kapsogeorgou E K, Moutsopoulos H M, Manoussakis M N: A novel B7-2 (CD86) splice variant with a putative negative regulatory role. *J.Immunol.*, 180: 3815-38236 (2008)
81. Kelly M G, Alvero A B, Chen R, Silasi D A, Abrahams V M, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G: TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 66: 3859-38687 (2006)
82. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M: B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin.Cancer Res.*, 10: 5094-510015 (2004)

83. Kretschmer B, Luthje K, Schneider S, Fleischer B, Breloer M: Engagement of CD83 on B cells modulates B cell function in vivo. *J.Immunol.*, 182: 2827-28345 (2009)
84. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas Z K, Endres S, Krieg A M, Hartmann G: Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.*, 31: 2154-21637 (2001a)
85. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg A M, Hartmann G: Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur.J.Immunol.*, 31: 3026-303710 (2001b)
86. Kushwah R, Hu J: Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*, (2011)
87. Lawton A P, Kronenberg M: The Third Way: Progress on pathways of antigen processing and presentation by CD1. *Immunol.Cell Biol.*, 82: 295-3063 (2004)
88. Lee J L, Kim Y H, Lee J M, Kim J D, Kim S J, Park J H: Molecular analysis of HLA-DR gene expression induced by IFN-gamma in malignant melanoma cell lines. *Yonsei Med.J.*, 40: 30-391 (1999)
89. Li Y, Lee P Y, Sobel E S, Narain S, Satoh M, Segal M S, Reeves W H, Richards H B: Increased expression of FcgammaRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res.Ther.*, 11: R61 (2009)
90. Lin R Y, Astiz M E, Saxon J C, Rackow E C: Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. *Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. Chest*, 104: 847-8533 (1993)
91. Liu X, Gao J X, Wen J, Yin L, Li O, Zuo T, Gajewski T F, Fu Y X, Zheng P, Liu Y: B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J.Exp.Med.*, 197: 1721-173012 (2003)
92. Liu Y J: Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, 106: 259-2623 (2001)
93. Lowe E L, Doherty T M, Karahashi H, Arditi M: Ubiquitination and de-ubiquitination: role in regulation of signaling by Toll-like receptors. *J.Endotoxin Res.*, 12: 337-3456 (2006)
94. Lundell A C, Andersson K, Josefsson E, Steinkasserer A, Rudin A: Soluble CD14 and CD83 from human neonatal antigen-presenting cells are inducible by commensal bacteria and suppress allergen-induced human neonatal Th2 differentiation. *Infect.Immun.*, 75: 4097-41048 (2007)

95. Maliszewski C R, Delespesse G J, Schoenborn M A, Armitage R J, Fanslow W C, Nakajima T, Baker E, Sutherland G R, Poindexter K, Birks C: The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J.Immunol.*, 153: 3574-35838 (1994)
96. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside T L: Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J.Immunol.Methods*, 346: 55-631-2 (2009)
97. Martin G S, Mannino D M, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N.Engl.J.Med.*, 348: 1546-155416 (2003)
98. Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M: Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol.Lett.*, 81: 71-751 (2002)
99. Miyake K: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J.Endotoxin Res.*, 12: 195-2044 (2006)
100. Moulon C, Peguet-Navarro J, Schmitt D: A potential role for CD1a molecules on human epidermal Langerhans cells in allogeneic T-cell activation. *J.Invest.Dermatol.*, 97: 524-5283 (1991)
101. Nolan A, Kobayashi H, Naveed B, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, Karulf M R, Rom W N, Weiden M D, Gold J A: Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One*, 4: e66008 (2009)
102. Nolan A, Weiden M, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, Mehta N, Gold J A: CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*, 177: 301-3083 (2008)
103. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard W J, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman R M: Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*, 82: 487-4933 (1994)
104. Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K: The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 51: 84-911 (2007)
105. Orabona C, Grohmann U, Belladonna M L, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Bozza S, Volpi C, Salomon B L, Fioretti M C, Romani L, Puccetti P: CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat.Immunol.*, 5: 1134-114211 (2004)
106. Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L: Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.*, 169: 6673-667612 (2002)

107. Porcelli S, Morita C T, Brenner M B: CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature*, 360: 593-597 (1992)
108. Raftery M J, Hitzler M, Winau F, Giese T, Plachter B, Kaufmann S H, Schonrich G: Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. *J.Virol.*, 82: 4308-4319 (2008)
109. Rapoport A P, Luhowskyj S, Doshi P, DiPersio J F: Mutational analysis of the alpha subunit of the human interleukin-3 receptor. *Blood*, 87: 112-1221 (1996)
110. Ren C L, Morio T, Fu S M, Geha R S: Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2. *J.Exp.Med.*, 179: 673-6802 (1994)
111. Rittirsch D, Flierl M A, Ward P A: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat.Rev.Immunol.*, 8: 776-787 (2008)
112. Robinson S P, Patterson S, English N, Davies D, Knight S C, Reid C D: Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur.J.Immunol.*, 29: 2769-2778 (1999)
113. Romani N, Holzmann S, Tripp C H, Koch F, Stoitzner P: Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS*, 111: 725-740 (2003)
114. Rossi M, Young J W: Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J.Immunol.*, 175: 1373-1381 (2005)
115. Russell J A: Management of sepsis. *N.Engl.J.Med.*, 355: 1699-1713 (2006)
116. Ryncarz R E, Anasetti C: Expression of CD86 on human marrow CD34(+) cells identifies immunocompetent committed precursors of macrophages and dendritic cells. *Blood*, 91: 3892-3901 (1998)
117. Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Banchereau J, Miyajima A: Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*, 82: 752-761 (1993)
118. Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, van Bremen T, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D: Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn.Pathol.*, 4: 12 (2009)
119. Schaer D J, Schaer C A, Buehler P W, Boykins R A, Schoedon G, Alayash A I, Schaffner A: CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*, 107: 373-380 (2006)

120. Schneider E M, Lorenz I, Muller-Rosenberger M, Steinbach G, Kron M, Janka-Schaub G E: Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytolysis but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood*, 100: 2891-28988 (2002)
121. Schonbeck U, Mach F, Libby P: CD154 (CD40 ligand). *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 32: 687-6937 (2000)
122. Siegal F P, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly P A, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu Y J: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284: 1835-18375421 (1999)
123. Skinner N A, Maclsaac C M, Hamilton J A, Visvanathan K: Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin.Exp.Immunol.*, 141: 270-2782 (2005)
124. Steinman R M, Cohn Z A: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J.Exp.Med.*, 139: 380-3972 (1974)
125. Steinman R M, Cohn Z A: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp.Med.*, 137: 1142-11625 (1973)
126. Sugimoto K, Galle C, Preiser J C, Creteur J, Vincent J L, Pradier O: Monocyte CD40 expression in severe sepsis. *Shock*, 19: 24-271 (2003)
127. te Velde A A, Huijbens R J, de Vries J E, Figdor C G: IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J.Immunol.*, 144: 3046-30518 (1990)
128. Topoll H H, Zwadlo G, Lange D E, Sorg C: Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis. *J.Periodontal.Res.*, 24: 106-1122 (1989)
129. Tseng S Y, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky J E, Pai S I, Shalabi A, Shin T, Pardoll D M, Tsuchiya H: B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J.Exp.Med.*, 193: 839-8467 (2001)
130. Tsushima F, Iwai H, Otsuki N, Abe M, Hirose S, Yamazaki T, Akiba H, Yagita H, Takahashi Y, Omura K, Okumura K, Azuma M: Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur.J.Immunol.*, 33: 2773-278210 (2003)
131. van de Winkel J G, Capel P J: Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol.Today*, 14: 215-2215 (1993)
132. van Kooten C, Banchereau J: Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr.Opin.Immunol.*, 9: 330-3373 (1997)

133. Vincent J L, Sakr Y, Sprung C L, Ranieri V M, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall J R, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit.Care Med.*, 34: 344-3532 (2006)
134. Viriyakosol S, Mathison J C, Tobias P S, Kirkland T N: Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. *J.Biol.Chem.*, 275: 3144-31495 (2000)
135. Wang S, Chen L: T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell.Mol.Immunol.*, 1: 37-421 (2004)
136. Wang T F, Guidotti G: CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J.Biol.Chem.*, 271: 9898-990117 (1996)
137. Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, Ulevitch R J, Mathison J C: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431-14334975 (1990)
138. Wu J, Liu Z, Sun J, Guo Z H, Su L: Monocyte human leukocyte antigen-DR expression in elderly patients with sepsis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 28: 1657-16599 (2008)
139. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, Kurahara C, Lott F, Sun N, Welcher A A, Dong C: Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103: 11695-1170031 (2006)
140. Zheng Y, Manzotti C N, Liu M, Burke F, Mead K I, Sansom D M: CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J.Immunol.*, 172: 2778-27845 (2004)
141. Zwadlo-Klarwasser G, Bent S, Haubeck H D, Sorg C, Schmutzler W: Glucocorticoid-induced appearance of the macrophage subtype RM 3/1 in peripheral blood of man. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 91: 175-1802 (1990)

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Marion Schneider bedanken, die es mir ermöglichte, diese Arbeit in ihrer Abteilung zu schreiben. Danke für die super Betreuung und für die Begutachtung der Arbeit (inklusive der vielen nächtlichen E-mails).

Vielen Dank an Dr. Harald Hohmann für die Einführung in die Durchflusszytometrie!

Weiterhin möchte ich mich bei Steffi und Clemens für einen unvergesslichen, tollen Sommer bedanken! Ohne euch hätte es nicht halb so viel Spass gemacht!

Last but not least: Hvala Mal, Beki i Dani (i naravno Lucky) za citanje ovoga rada.

Hvala Ketii i Bex za sve sto ste protrpili sa mnom za svo vrijeme !!! Volim vas !!!