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

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

Phagozytose und Degradation von EosFP E.coli-Bakterien durch mononukleäre Zellen bei Intensivpatienten und gesunden Kontrollen

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

eingereicht von
Rainer Claus Hess
aus
Friedrichshafen
2015

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marion Schneider
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Barbara Spellerberg
Tag der Promotion:	14.01.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....III

1 Einleitung.....1

1.1 Immunsystem..... 1

1.2 Phagozytose..... 2

1.3 Mononukleäres Phagozytensystem..... 4

1.3.1 Monozyten..... 4

1.3.2 Makrophagen..... 5

1.3.3 Dendritische Zellen.....5

1.4 SIRS und Sepsis.....6

1.5 EosFP.....7

1.6 Fragestellung.....9

2 Material und Methoden..... 10

2.1 Patientenkollektiv..... 10

2.1.1 Gruppeneinteilung der Patienten..... 10

2.2 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut..... 12

2.3 Versuchsablauf.....13

2.4 Zellkultur..... 14

2.5 Durchflusszytometrie..... 14

2.5.1 Physikalische Grundlagen..... 15

2.5.2 Aufbau eines Durchflusszytometers..... 16

2.6 Darstellung der Messergebnisse und Statistik.....17

2.7 Immunphänotypisierung..... 18

2.8 Fluoreszenzmikroskopie..... 20

2.9 Materialien und Geräte..... 20

3 Ergebnisse.....22

3.1 Fluoreszenz aktivierte Zellmessung.....22

3.1.1 Test zur Verteilung der Leukozytenpopulationen im Dot Plot.....22

3.1.2 Quantitative Verteilung der Zellpopulationen 23
3.1.3 Darstellung von Phagozytose und Degradation der EosFP E.coli-Bakterien im Dot Plot 25
3.1.4 Zellpopulationen nach Inkubation der mononukleären Zellen 28
3.1.5 Quantitativer Vergleich der Phagozytoseleistung 38
3.1.6 Immunphänotypisierung 43
3.2 Fluoreszenzmikroskopie 45

4 Diskussion 47

4.1 Zellpopulationen nach Ficoll-Gradient und deren anteilmäßige Verteilung 47
4.2 Patientenkollektiv und Gruppeneinteilung 50
4.3 Phagozytose und Degradation der EosFp E.coli-Bakterien im Streulicht- und Fluoreszenz-Dot-Plot 52
4.4 Phagozytoseleistung der isolierten Zellen bei den Intensivpatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen 54
4.5 Eignung von EosFP zur Etablierung eines Phagozytosetests 57

5 Zusammenfassung 60
6 Literaturverzeichnis 62
Danksagung 69
Lebenslauf 70

Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
ACCP	American College of Chest Physicians
APC	Allophycocyanin
APO-1	apoptosis antigen 1
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
cDC	klassische dendritische Zellen
CA	Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung
CR	complement receptor
DC	dendritic cell
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNI	delta neutrophil index
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E.coli	Escherichia coli
EosFP	Eos Fluorescent Protein
et al.	et alii, und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	fragment crystallisable
FcR	Fc Rezeptor
FcγR	Fc-gamma receptor
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen DR
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
µl	Mikroliter
min	Minute
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
NA	Noradrenalin
Na	Natrium
NaN_3	Natriumazid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
n. op.	nicht operativ
op.	operativ
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
P_aCO_2	Arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
pH	(Pondus/ Potentia hydrogenii)
pQE32	bakterieller Vektor
PRR	pattern recognition receptor
rhG-CSF	recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	Seitwärtsstreulicht
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

Die Phagozytose wurde erstmals von Élie Metchnikoff vor über 100 Jahren untersucht. Seither werden die Aufnahme und der Abbau eindringender Mikroorganismen durch Phagozytose als ein entscheidender Bestandteil von angeborenen und adaptierten Immunantworten auf Krankheitserreger angesehen. Darüber hinaus haben Untersuchungen aus jüngerer Zeit aufgezeigt, dass die Phagozytose für die Beseitigung von apoptotischen Körpern benötigt wird, einem entscheidenden Aspekt der Gewebs-homöostase und Gewebsremodellierung [17].

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem wird auf der Grundlage seiner Funktionen bei der Wirtsabwehr üblicherweise in zwei umfassende und miteinander verbundene Untersysteme unterteilt. Das adaptierte Immunsystem ist durch die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten organisiert. Diese weisen ein äußerst umfangreiches Repertoire an antigenspezifischen Erkennungsrezeptoren auf, die die spezifische Erkennung und Beseitigung von Krankheits-erregern ermöglichen, als Messinstrument des adaptierten Immunsystems dienen, um exakte Immunantworten sicherzustellen, sowie ein langjähriges immunologisches Gedächtnis gegen Reinfektionen haben [14]. Das adaptierte Immunsystem ist für die Elimination von Krankheitserregern in der späten Phase einer Infektion verantwortlich [37].

Der angeborene Zweig des Immunsystems hingegen besteht aus jenen immunologischen Effektoren, die widerstandsfähige, unmittelbare und unspezifische Immunantworten bereitstellen [14]. Es bildet die erste Linie der Wirtsabwehr während einer Infektion und spielt deshalb eine entscheidende Rolle bei der frühen Erkennung von eindringenden Krankheitserregern und der anschließenden Einleitung einer proinflammatorischen Antwort. Die angeborene Immunantwort wird in erster Linie durch phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen wie Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt, die als relativ unspezifisch gelten. Sie stützt sich auf die Erkennung von evolutionär konservierten Strukturen auf Krankheitserregern ("pathogen-associated

molecular patterns", "PAMPs") durch "Pattern-Recognition Receptors" ("PRRs"), von denen die Familie der "Toll-ähnlichen Rezeptoren" ("TLRs") am umfassendsten untersucht wurde. Bei Erkennung von "PAMP" signalisieren "PRRs", die sich auf der Zelloberfläche oder intrazellulär befinden, dem Wirt die Anwesenheit einer Infektion und leiten proinflammatorische und antimikrobielle Reaktionen ein, indem sie eine Vielzahl an intrazellulären Signalwegen aktivieren [37].

Darüber hinaus verknüpfen der Abbau von Pathogenen im Phagosom und die Erzeugung antigenischer Peptide, die von phagozytierenden Zellen präsentiert werden um spezifische Lymphozyten zu aktivieren, die Phagozytose mit der adaptierten Immunität [30].

1.2 Phagozytose

Die Phagozytose ist der Vorgang, bei dem Partikel erkannt, an die Oberfläche von Zellen gebunden und in ein Phagosom aufgenommen werden, dem Organell, das sich um die aufgenommene Substanz bildet [56]. Sie wird definiert als die Aufnahme von großen Partikeln (≥0,5 μm) durch Zellen. Fremdkörper wie Bakterien oder Pilze können durch professionelle Phagozyten wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beseitigt werden. Auch wenn sie nicht in der Lage sind Mikroben in sich aufzunehmen, können Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen ebenfalls phagozytieren. Diese Zellen können apoptotische Körper in sich aufnehmen.

Die Phagozytose ist ein rezeptorvermittelter Vorgang. Im Falle der infektiösen Mikroben erfolgt die Erkennung entweder direkt durch die Rezeptoren ("PRRs") oder durch die Verknüpfung von Phagozyten an Mikroorganismen durch Opsonine. Rezeptoren für den Fc-Bereich von Immunglobulin G (z.B. FcγRI (CD64) und FcγRIIa (CD32a)), und Rezeptoren, die den Faktor C3b des Komplementsystems (CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4(CD11c/CD18)) binden sind besonders wirksam und wurden detailliert untersucht [17].

Da mehrere Rezeptoren von einem einzigen Partikel besetzt werden können, beruht die Phagozytose vermutlich auf einem komplexen Netzwerk von Signalwegen. Die Verflechtung dieser Signale leitet einen dynamischen Prozess ein, der mit einer Umgestaltung des Zytoskeletts verbunden ist. Diese Umgestaltung geht mit einer Umformung der Membran an der Zelloberfläche einher, was zur Aufnahme führt.

Der Umbau der Membran mündet in der vollständigen Umhüllung der Partikel und ihrer Abgabe ins Zytoplasma als Phagosomen [30].

Um mikrobizide und abbauende Eigenschaften zu erwerben, muss eine drastische Umwandlung erfolgen, welche als phagosomale Reifung bezeichnet wird [16]. Dieser Reifungsprozess ist durch die aufeinanderfolgende Fusion mit Endosomen und letztlich mit Lysosomen gekennzeichnet. Über die Ansäuerung hinaus ist ein wichtiger Faktor der phagosomalen Reifung das Hinzukommen hydrolytischer Enzyme, die die aufgenommenen Partikel verdauen und abbauen [30].

Die Reifung der Phagosomen in Makrophagen unterscheidet sich qualitativ und kinetisch von der in neutrophilen Granulozyten. Neutrophile Granulozyten weisen ein wirksames Arsenal an antimikrobiellen Verbindungen auf, die toxische, reaktive Sauerstoffspezies ("ROS", "reactive oxygen species") und Moleküle wie Proteasen und bioaktive Peptide beinhalten. Die Antwort von neutrophilen Granulozyten auf Mikroben wird oft als "oxidativer Burst" (respiratorische Entladung; die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen) bezeichnet.

Die Wirksamkeit des "oxidativen Burst" in Makrophagen ist viel schwächer als in neutrophilen Granulozyten. Dennoch ist die antimikrobielle Wirkung von Makrophagen extrem hoch. Frühe Phagosomen tauschen vor einem aktiven Membranaustausch mit späten Endosomen und dann mit Lysosomen aktiv Material mit frühen Endosomen. Dadurch erhalten Phagosomen zunehmend die lysosomalen, abbauenden Enzyme und die Ansäuerungsausrüstung von endozytischen Kompartimenten. Unter den Enzymen, die den Phagosomen von Makrophagen durch Endosomen und Lysosomen überbracht werden, sind Glykosidasen und Proteasen.

Dendritische Zellen weisen ebenfalls eine hohe Phagozytoseaktivität auf. Phagozytierende dendritische Zellen werden als unreif bezeichnet und obwohl sie eine Vielzahl an Proteasen besitzen ist ihre abbauende Wirksamkeit viel niedriger als die der Makrophagen. Der Anteil phagozytierender Zellen liegt mit Bezug auf Monozyten bei unreifen dentritischen Zellen um 42,8% niedriger und bei reifen dendritischen Zellen um 74,2% niedriger [31, 51].

1.3 Mononukleäres Phagozytensystem

Weiße Blutkörperchen oder Leukozyten sind eine mannigfaltige Gruppe von Zelltypen, die die Immunreaktionen des Körpers vermittelt. Sie zirkulieren durch das Blut und das lymphatische System und werden bei Gewebeschäden und Infektionen angelockt. Die Leukozytenuntergruppen werden durch funktionelle und physikalische Eigenschaften unterschieden. Sie stammen von denselben hämatopoetischen Stammzellen ab und entwickeln sich über individuelle Differenzierungswege.

Das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) repräsentiert eine Untergruppe der Leukozyten [18]. Es wurde in den 1960er-Jahren von van Furth und Cohn als ein Netzwerk von nicht-granulozytären, myeloiden Zellen definiert [65]. Das MPS umfasst eine Familie von Zellen, die Vorläuferzellen im Knochenmark, im Blut zirkulierende Monozyten und Gewebsmakrophagen sowie dendritische Zellen (DC) in jedem Organ des Körpers miteinschließt [29].

Die Aktivierung des Immunsystems setzt voraus, dass das Vorliegen einer beginnenden Infektion zunächst erkannt wird. Dieser wesentliche Schritt wird durch Gewebs-makrophagen realisiert, die das angeborene Immunsystem alarmieren, und durch dendritische Zellen, welche das adaptierte Immunsystem aufmerksam machen. Diese Wachposten des Immunsystems stammen beide von im Blut zirkulierenden Monozyten ab [32].

Mononukleäre Phagozyten haben 3 Hauptfunktionen: die Präsentation von Antigenen, die Phagozytose und Immunmodulation. Ihre Aufnahme von Substanzen verfolgt 2 Ziele: Abfallprodukte und Debris zu beseitigen sowie eindringende Pathogene zu entfernen [9].

1.3.1 Monozyten

Die Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie entstammen myelomonozytischen Stammzellen im Knochenmark. Diese Zellen werden zu Monoblasten, die sich dann in Monozyten entwickeln [67]. Sie machen 10% der Leukozyten im menschlichen Blut aus [1].

Monozyten zirkulieren über Blut und Lymphe aus dem Knochenmark und der Milz und vermehren sich bei einem stabilen Zustand nicht. Sie stellen Immuneffektorzellen dar, die mit Chemokinrezeptoren und "Pattern Recognition Receptors" ausgestattet sind, welche bei Infektionen die Migration vom Blut in die Gewebe vermitteln. Sie produzieren

Entzündungszytokine und phagozytieren Zellen und toxische Moleküle [18]. Monozyten können ein Indikator von diversen inflammatorischen Erkrankungen sein. Sie können sich in inflammatorische und anti-inflammatorische Untergruppen entwickeln [64]. Zusammen mit Makrophagen und Granulozyten steuern sie die Reaktionen des Organismus auf Infektionen. Schließlich wandern sie, angezogen durch Mediatoren, die am Entzündungsherd gebildet werden, ins Gewebe ein. Dort findet ihre Ausdifferenzierung zu Makrophagen statt. Außerdem sind Monozyten antigenpräsentierende Zellen, denen zusammen mit dendritischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen zukommt, indem sie T-Lymphozyten aktivieren und so die erworbene Immunantwort induzieren [27].

Monozyten/Makrophagen und DCs sind eng verwandt, was durch die Erkenntnis belegt wird, dass sich Blutmonozyten in DCs differenzieren können und DCs aus dem Blut in Makrophagen [68].

1.3.2 Makrophagen

Wenn Gewebe durch Infektionen oder Verletzungen beschädigt sind, werden inflammatorische Monozyten aus dem Blutkreislauf rekrutiert, migrieren in die betroffenen Gewebe und differenzieren in Makrophagen [63].

Makrophagen sind phagozytierende Zellen, die in lymphoiden und nichtlymphoiden Geweben ansässig sind. Sie sind mit einer umfassenden Auswahl von "Pattern Recognition Receptors" ausgestattet, die sie effizient phagozytieren lässt und die zur Produktion von Entzündungszytokinen führt [18]. Gewebsmakrophagen haben viele Funktionen in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, zum Beispiel die Beseitigung alternder Zellen, Gewebsumbau, Reparatur sowie die Entstehung und Auflösung der Entzündungsreaktion [65].

1.3.3 Dendritische Zellen

Diese mononukleären Zellen wurden wegen ihrer Morphologie dendritische Zellen benannt. Durch die Verknüpfung von Antigenpräsentation und Phagozytose stellen sie das wichtige Verbindungsglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr dar [6].

Klassische dendritische Zellen (cDCs) sind spezialisierte antigenprozessierende und -präsentierende Zellen, die als unreife Zellen eine hohe Phagozytoseaktivität zeigen und als reife Zellen eine hohe Zytokinproduktion aufweisen. cDCs regulieren sowohl im "Steady state" als auch bei Infektionen die Reaktionen von T-Zellen.

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) leben im Gegensatz zu cDCs relativ lang und kommen im Knochenmark sowie in peripheren Organen vor. PDCs sind darin spezialisiert auf virale Infektionen mit einer starken Produktionen von Interferon Typ 1 zu reagieren. Sie können jedoch auch als antigenpräsentierende Zellen agieren und T-Zell Reaktionen kontrollieren [18].

Diese beiden Untergruppen der DCs machen jeweils in etwa 0,5% der mononukleären Zellen im Blutkreislauf aus [1].

1.4 SIRS und Sepsis

Klinisch ist das Systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) das Auftreten von mindestens zwei der folgenden Kriterien: Körpertemperatur > 38°C oder <36°C, Herzfrequenz > 90/min, Atemfrequenz > 20/min oder P_aCO_2 < 32 mmHg, Leukozytenzahl > 12000/µl oder < 4000/µl. Wird das SIRS von einer Infektion hervorgerufen, spricht man von einer Sepsis. Auf diese Nomenklatur einigte man sich 1992 auf einer Konsensuskonferenz von ACCP/SCCM [7, 33]. SIRS kann aber auch durch nicht-infektiöse Ereignisse wie ein Trauma, Pankreatitis, Verbrennungen oder eine größere Operation hervorgerufen werden [35]. Die Entzündungsantwort des Wirts bei SIRS und Sepsis ist vergleichbar und kann zu einem Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) und letztlich zum Tod führen [5].

Bei kritisch kranken Patienten wird die akute Immunantwort durch das angeborene Immunsystem, das durch das neuroendokrine System beeinfluss wird, organisiert und vollzogen. Diese Immunantwort beginnt mit dem Erkennen der Gefahr durch PRRs durch immunkompetente Zellen. Die erspürten Gefahrensignale aktivieren durch spezifische Signalwege den nukleären Transkriptionsfaktor κB (NF-κB) sowie andere Transkriptionsfaktoren und Genregulationssysteme, die die Expression proinflammatorischer Mediatoren hochregeln. Die Plasmakaskaden werden auch aktiviert und stimulieren überdies zusammen mit den produzierten proinflammatorischen Mediatoren die Produktion inflammatorischer Biomarker [5].

Zytokine sind wichtige Bestandteile des Immunsystems, die als Nachrichten zwischen Zellen agieren, jedoch auch in viele pathologische Aspekte der Kaskade, die zu SIRS führt, involviert sind. Zytokine sind eine Familie von niedermolekularen Proteinen, die von einer Vielzahl von Zellen, Makrophagen und Monozyten mit eingeschlossen, sezerniert werden. Alle Zytokine lösen ihre Effekte durch hochspezifische Zelloberflächenrezeptoren aus. Während Zytokine eine nützliche Entzündungsreaktion auslösen, welche eine lokale Koagulation begünstigt, um einen Gewebeschaden einzudämmen, kann eine übermäßige Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine sogar gefährlicher als der ursprüngliche Reiz sein. Der Begriff "Zytokin-Sturm" ist nicht genau definiert, bezieht sich jedoch auf eine spezifische Art einer unkontrollierten Immunantwort. Ein "Zytokin-Sturm" besteht aus einer positiven Rückkopplungsschleife zwischen Zytokinen und Immunzellen. Wenn das Immunsystem Pathogene bekämpft, signalisieren Zytokine Immunzellen wie T-Lymphozyten und Makrophagen, zum Infektionsort zu wandern. Zusätzlich regen Zytokine diese Zellen an, noch mehr Zytokine zu produzieren. Diese positive Rückkopplungsschleife gerät außer Kontrolle und zu viele Immunzellen werden am gleichen Ort aktiviert, was in Geweben und Organen erheblichen Schaden anrichten kann [35].

Monozyten und Makrophagen sind die wirksamsten Erzeuger von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, unter Einschluss von Zytokinen, Lipidmediatoren, Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, antimikrobiellen Peptiden sowie Enzymen wie Lipasen und Proteasen. Zirkulierende Monozyten können in fortgeschrittenen Stadien der Sepsis umprogrammiert werden, um mehr anti- als proinflammatorische Mediatoren zu produzieren. Diese antiinflammatorische Gegenregulation kann zu Immunsuppression, ungenügender Infektabwehr, Gewebeschädigung, Multiorganversagen und schließlich zum Tod führen [5, 27].

1.5 EosFP

Die Geschichte fluoreszierender Proteine bagann 1962, als Osamu Shimomura erstmals ein Protein aus der Hydromeduse Aequorea victoria, das grün fluoreszierende Protein (GFP) beschrieb [62]. GFP hat die lebenswissenschaftliche Forschung geradezu revolutioniert. Die Fluoreszenz des Farbstoffes ist genetisch verschlüsselt. Von einzelnen Proteinmolekülen über zelluläre Kompartimente, Zellen und Gewebe kann GFP als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden[39].

Aus einer Untergruppe der GFP-Familie stammt das photokonvertierbare Protein EosFP (Eos Fluorescent Protein), welches aus der Steinkoralle Lobophyllia hemprichii isoliert wurde. Wird EosFP von der Zelle hergestellt, fluoresziert es ähnlich wie GFP grün mit Anregungs- und Emissionsmaximum bei 506 und 516 nm. Eine Photoaktivierung mit kurzwelligem Licht (≈400 nm) führt dazu, dass EosFP in die rote Form umschaltet, deren Anregungs- und Emissionsmaximum bei 571 und 581 nm liegt [40, 62]. Daher wurde das Protein „EosFP“ genannt, nach Eos, der griechischen Göttin der Morgenröte [39, 61].

Der Wechsel der Fluoreszenzfarbe von grün nach rot ist irreversibel. Erfolgt bei einer Bestrahlung mit 400 nm eine unvollständige Konversion (es sollte ein optimales Verhältnis von grünen und roten Fluorophoren vorliegen), so emittiert EosFP gleichermaßen grünes wie rotes Fluoreszenzlicht.

Während die grün fluoreszierende Form von EosFP ziemlich stabil ist, kommt es bei der roten Form bei niedrigem pH zu einer Denaturierung, aus welcher ein Verlust der Fluoreszenz resultiert [61].

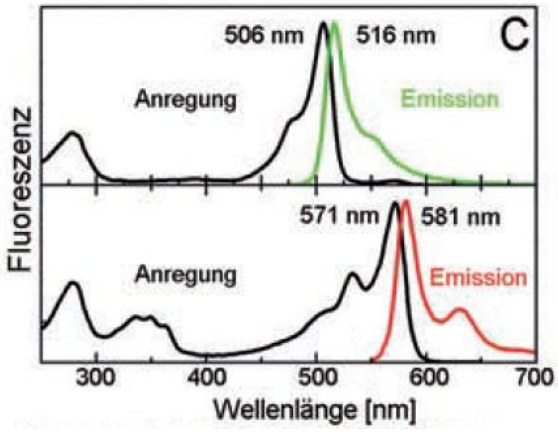


Abb. 1: Anregungs- und Emissionsmaximum der grünen (oben) und roten (unten) Form des photokenvertierbaren Proteins EosFP (Eos Fluorescent Protein) [39]. Durch Photoaktivierung mit kurzwelligem Licht (≈400nm) schaltet EsoFP von der ursprünglich grünen in die rote Form um.

Die cDNA von EosFP wurde in E.coli-Bakterien transfiziert um das Bakterium pQE32-EosFP zu erzeugen [61]. Die Anzüchtung erfolgte in vitro bis zu einer Konzentration von 10^7 Zellen pro ml. Nach Bestrahlung mit 400 nm wurden die E.coli-Bakterien, die jetzt rot und grün fluoreszieren, mit Paraformaldehyd in Phosphat-Puffer-Lösung fixiert und gewaschen.

1.6 Fragestellung

Das menschliche Immunsystem wird in eine angeborene und eine erworbene (adaptierte) Immunität unterteilt. Monozyten und ihre differenzierten Abkömmlinge haben wichtige regulatorische Aufgaben und Effektorfunktionen in beiden Zweigen des Immunsystems [9].

Die monozytenvermittelte Abwehr ist eine äußerst wichtige erste Immunantwort beim Vorliegen einer Infektion, da sie in der Lage ist, bakterielle Erreger zu phagozytieren und abzubauen [19].

Die Rolle der Phagozytosefunktion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten bei Sepsis wurde bis jetzt nur dürftig erforscht [10].

Das Protein EosFP ist möglicherweise ein wertvolles Werkzeug, um die Eigenschaften der Phagozytose- und Degradationsleistung der mononukleären Zellen des Immunsystems weiter zu erforschen. Dabei ergeben sich in dieser Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich mit EosFP ein Phagozytosetest etablieren, mit dem sich die Phagozytoseleistung sowie das Degradationsvermögen von mononukleären Zellen messen lassen?
2. Welche morphologischen Veränderungen der Zellen zeigen sich während der Inkubationszeit?
3. Unterscheiden sich die Intensivpatienten bezüglich ihrer Phagozytoseleistung der isolierten Zellen von den gesunden Kontrollen?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Es wurden Patienten mit SIRS/Sepsis (n=42) eingeschlossen, welche auf der chirurgischen Intensivstation des Department Anästhesiologie behandelt wurden. Die Einteilung wurde anhand der Sepsiskriterien der „ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure (1992)“ vorgenommen. In dieser Pilotstudie genehmigt durch die Ethik-Kommission wurde außerdem die Wirkung von rhG-CSF (recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor, Neupogen®) an einem Teil der Patienten (n=5) evaluiert. Alle Patienten wurden einem Immunmonitoring durch eine immunphänotypische Analyse am Durchflusszytometer unterzogen. U. a. wurde auch die Phagozytosefunktion im Vollblut untersucht (Schreiner, Dissertation (eingereicht) [52]). Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut isoliert und mit EosFP E.coli-Bakterien inkubiert, um deren Phagozytoseleistung zu analysieren.

Die Blutproben wurden mit Na-Heparin-Monovetten entnommen und die Patientendaten im Labor durch Nummern anonymisiert.

2.1.1 Gruppeneinteilung der Patienten

Insgesamt wurden 42 Blutproben von Intensivpatienten sowie 8 Proben von gesunden Spendern untersucht. Bei mehreren Patienten wurde zwei oder drei Mal Blut abgenommen, so dass die 42 Proben der Intensivpatienten von 24 verschiedenen Spendern stammen.

Nach 15 Messungen wurden neue Bakterien verwendet, da sich unter dem Mikroskop zeigte, dass die bis dahin verwendeten Bakterien zum Teil verklumpt waren.

Für die Beschreibung der Ergebnisse der FACS-Messung wurden vier Gruppen gebildet:

-Gruppe 1: gesunde Kontrollen (Panels)

-Gruppe 2: Patientenproben mit Leukozytose

-Gruppe 3: Patientenproben, bei denen die Bakterien zum Teil verklumpt waren

-Gruppe 4: Patientenproben nach Wechsel der Bakterien

In Gruppe 1 wurden die gleichen Bakterien wie in Gruppe 4 verwendet. Gruppe 2 enthält 3 Proben, bei denen die Bakterien aus Gruppe 3 verwendet wurden.

Die 50 untersuchten Proben sind mit Angaben zu Vorerkrankung, operatives oder nicht operatives SIRS (Polytrauma), Katecholamingabe, Leukozytenzahl und SAPS 3 (Simplified Acute Physiology Score 3, ein intensivmedizinischer Score, der Aussagen über die Schwere der Erkrankung sowie Vorhersagen über die Krankenhausmortalität macht [36]) in Tabelle 1 aufgelistet.
Die Proben, die vom selben Spender stammen, wurden in Tabelle 1 jeweils zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der Proben mit Angabe der Gruppenzugehörigkeit (Gruppe), der Probennummern (Proben-Nr.), des Geschlechts (m = männlich, w = weiblich), des Alters zum Zeitpunkt der Probenentnahme, dem Datum der Probenentnahme sowie Angaben zu A) Vorerkrankung: Tumor oder metabolisches Syndrom (CA = Karzinom, DM II = Diabetes Mellitus Typ II, COPD = chronische obstruktive Lungenerkrankung), B) operatives (op.) oder nicht-operatives (n. op.) SIRS, C) Infektion, D) Katecholamingabe (A=Adrenalin, NA = Noradrenalin), E) Leukozytenzahl /µl, F) SAPS 3 .
Bei fehlenden Angaben (leere Zelle) liegen keine Angaben vor.

Grup-pe	Proben -Nr.	Ge-schlecht	Alter	Proben-entnahme	A	B	C	D	E	F SAPS 3
3	10022	w	73	15.09.08	-	Op.	+	NA	11700	32
2	10065	m	68	21.09.08	-	Op.	+	-	9300	32
3	10066	w	46	22.09.08	Adipositas	N. op.	+	NA	15300	26
2	10085	m	73	24.09.08	Tumor	Op.	+	NA	13500	96
3	10104			29.09.08			+	NA	9100	98
3	10161			08.10.08			+	NA	28200	81
3	10086	m	54	24.09.08	DM II + Tumor	Op.	+	-	6100	36
3	10118	m	71	30.09.08	COPD	Op.	-	A+NA	14400	86
3	10164			08.10.08			+	N	34100	79
3	10126	m	46	01.10.08	Tumor	Op.	+	NA	8600	59
3	10145	m	21	06.10.08	-	N. op.	+	NA	9700	39
3	10156			07.10.08			+	NA	4800	44
3	10162	m	47	08.10.08	-	N.op.	-	NA	7400	28
4	10215			16.10.08			-	-	9500	18
2	10163	w	68	08.10.08	CA 2001+	Op.	+	NA	13600	47
3	10168			09.10.08	Alkohol-		+	-	9100	47
2	10211			15.10.08	abusus		+	A	5800	37
4	10189	m	81	13.10.08	COPD	Op.	+	NA	12300	48

4	10190	w	38	13.10.08	Adipositas	Op.	+	NA	18300	67
2	10200			14.10.08	+Nikotin-		+	NA		45
2	10216			16.10.08	abusus		+	-		50
4	10201	m	44	14.10.08	-	N. op.	+	-	7200	49
2	10217			16.10.08			+	-		49
4	10202	m	73	14.10.08	Adipositas	Op.	+		10500	
4	10255			22.10.08			+		11000	
4	10326			03.11.08			+		5800	
4	10238	m	70	19.10.08	Basaliom	Op.	+	-	9100	17
4	10244			21.10.08			+			
4	10239	m	39	19.10.08	-	Op.	+	NA	5000	71
4	10243			22.10.08			+			
4	10242	m	36	22.10.08	-	N. op.	+	NA	12600	
2	10311			29.10.08			-	NA	18300	
4	10257	w	60	23.10.08	CA	Op.	+	NA	26800	53
2	10317			30.10.08			+	-	13200	40
4	10312	m	68	29.10.08	-	Op.	+	-	14400	38
4	10314	m	70	29.10.08	Adipositas	Op.	+	NA	16700	63
2	10318	m	69	31.10.08	CA	Op.	+	A+NA	23000	84
4	10325			03.11.08			+	A+NA	12600	78
4	10324	m	49	02.11.08	-	N. op.	+	NA	10800	63
4	10363			10.11.08			+	-	32800	74
4	10384	w	78	12.11.08	-	Op.	-	NA	6700	39
2	10389	m	77	17.11.08	-	Op.	+	A+NA	32800	83
Panel										
1	10213	m	27	15.10.08	gesund					
1	10300	m	25	27.10.08	gesund					
1	10342	w	54	04.11.08	gesund					
1	10390	m	20	18.11.08	gesund					
1	10392	m	25	18.11.08	gesund					
1	10403	w	26	19.11.08	gesund					
1	10470	w	27	02.12.08	gesund					
1	10480	m		04.12.08	gesund					

2.2 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Hinter den weißen Blutzellen verbergen sich drei Arten von Granulozyten sowie mononukleäre Zellen (einkernige Zellen des Blutes mit rundem Zellkern). Die mononukleären Zellen können mittels eines Ficoll-Gradienten von Erythrozyten, Granulozyten sowie von toten Zellen getrennt werden. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes, hochmolekulares Polymer aus Saccharin und Epichlorhydrin. Es hat einen minimalen osmotischen Druck und besitzt eine geringe Viskosität.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden 7,5 ml Heparinblut mit D-PBS 1:1 verdünnt und auf 4 ml Ficoll (Biocoll, Dichte: 1,077 g/ml; Biochrom AG) geschichtet, welches in vier 12 ml Polystyrolröhrchen vorgelegt wurde (Abb. 1). Die Röhrchen wurden nun bei 2000 Umdrehungen / min (dem entsprechen 800 g) für 20 min bei 10° C ohne

Bremse zentrifugiert. Die Dichte des Ficolls ist so eingestellt, dass die Erythrozyten und Granulozyten in die Ficollschicht eindringen und auf die Böden der Röhrchen sedimentieren, während sich die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll ansammeln (s. Abb. 2).

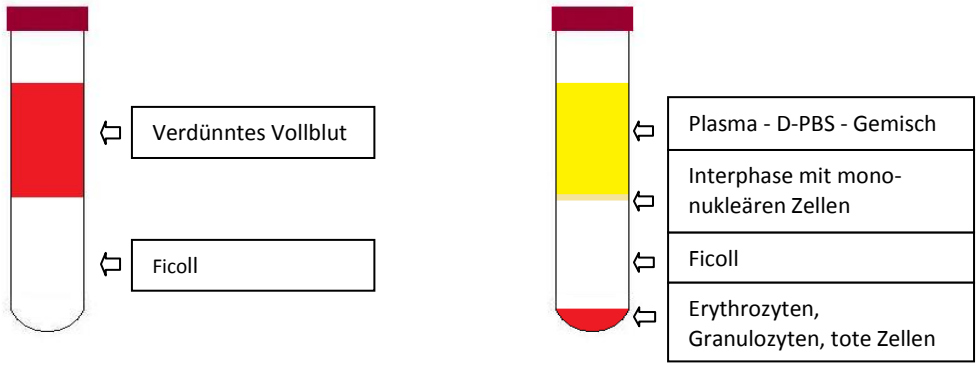


Abb. 2: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation: mit D-PBS 1:1 verdünntes Heparinblut wurde auf Ficoll geschichtet (links); rechts die Schichten nach der Zentrifugation.

Nun wurde mit einer 2 ml Pipette die Interphase sauber abgenommen und auf zwei Polystyrolröhrchen verteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst wenig Ficoll mit abgenommen wurde sondern eher Plasma und PBS des Überstandes. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit PBS bei 900 Umdrehungen / Minute (dem entsprechen 150 g) für jeweils 10 Minuten. Die Erythrozyten und Granulozyten wurden in 2 ml Mikrozentrifugen-Tubes bei -25° C eingefroren.

2.3 Versuchsablauf

Die mononukleären Zellen des einen Röhrchens wurden nun in Kultur gegeben und eingefroren, während die des anderen Röhrchens für den Ansatz mit EosFP E.coli-Bakterien verwendet wurden.

Zu den isolierten mononukleären Zellen, die auf zwei Polystyrolröhrchen verteilt wurden, wurden jetzt 4 ml 10 % FCS pipettiert und in zwei 13 ml Polypropylenröhrchen wurde einmal 0,5 ml EosFP E.coli-Bakterien (10^7 Bakterien / ml) und einmal 0,5 ml PBS vorgelegt (die Anzahl der Bakterien wurde so gewählt, dass alle Bakterien phagozytiert werden). Dann wurden die 4 ml 10 % FCS mit den mononukleären Zellen in die Polypropylenröhrchen überführt, wobei das Röhrchen mit den 0,5 ml PBS als Kontrolle

diente. Die Röhrchen kamen anschließend bei 37° C und 5% CO_2 in den Inkubator und nach 1, 3 und 6 h und am Folgetag wurde aus jedem Röhrchen ein ml mit der Pipette entnommen und in ein Polystyrolröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 900 Umdrehungen / Minute (150 g) für fünf Minuten wurde der Überstand verworfen, die Zellen vorsichtig resuspendiert und je 2 ml Lyse-Puffer hinzugegeben (BD FACS Lysing Solution 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt). Nach 10 Minuten im Kühlschrenk wurden die Röhrchen wieder für fünf Minuten bei 900 Umdrehungen / Minute (150 g) zentrifugiert, die Überstände verworfen und es erfolgte nochmals ein Waschschritt mit 5 ml PBS bei 900 Umdrehungen / Minute (150 g). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen resuspendiert und in die Röhrchen wurden je 150 µl CellFix pipettiert (BD CellFix 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt). Nach der Entnahme aus dem Inkubator müssen die Proben kalt gehalten werden, um die Phagozytose der Bakterien zu stoppen.

2.4 Zellkultur

Die andere Hälfte der mononukleären Zellen wurde in 40 ml Zellkulturflaschen pipettiert und 5 ml 10 % FCS dazugegeben. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C für 1 h inkubiert. Für eine Interleukin-2-Stimulation wurden nun zwei mal 0,5 ml in CELLSTAR 24 Well Zellkultur Multiwell Platten pipettiert und je 1,5 ml IL-2-Medium dazugegeben. Zum Einfrieren der nicht adhärenten Lymphozyten wurden jetzt 3,5 ml in ein Polystyrolröhrchen überführt und bei 850 Umdrehungen / Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes und vorsichtigem Resuspendieren der Zellen wurden dann 1 ml konzentriertes FCS und 1,2 ml 22 % DMSO-Lösung dazupipettiert und auf zwei 1,8 ml Einfrier-Tubes verteilt. Die Einfrier-Tubes wurden nun bei -70° C in die Gefriertruhe gestellt und die Zellkulturfläschchen wieder mit 5 ml 10 % FCS befüllt. Die Zellkulturfläschchen kamen zusammen mit den Zellkultur Multiwell Platten bei 37° C in den Inkubator.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Akronym: FACS = fluorescence activated cell sorting) ist ein Messverfahren, bei welchem Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Sie ermöglicht es, in kurzer Zeit eine

große Anzahl von Zellen zu untersuchen. Für die Messungen kam ein FACSCalibur (BD) zum Einsatz, das mit einem Argonlaser (488 nm) und einem Diodenlaser (635 nm) ausgestattet ist.

2.5.1 Physikalische Grundlagen

Wird eine Zelle einem Laserlichtstrahl ausgesetzt, so entsteht Streulicht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Dabei bestimmen die physikalischen Eigenschaften der Zelle (Querschnittsfläche, Membranstruktur, intrazelluläre Kompartimente) die Lichtstreuung.

Am größten ist die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich (0-10°). Seitwärts (90°) wird nur ein geringerer Teil des Lichts gestreut, weshalb hier auch die ausgesandten Fluoreszenzsignale detektiert werden.

Die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter [FSC]) bezeichnet und macht eine Aussage über die Größe von Zellen, auch wenn es von der Form der Zellen beeinflusst wird.

Im Winkel von 90° gestreutes Licht wird als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter [SSC]) bezeichnet und ist abhängig von der Granularität und Binnenstruktur der Zelle.

Fluoreszenz

Bestimmte Elektronen von fluoreszierenden Farbstoffen werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da sich die Elektronen jedoch auf diesem Niveau nicht halten können kehren sie rasch in den Grundzustand zurück. Dabei wird vom Elektron ein Photon emittiert. Durch die dabei wieder frei werdende Energie kommt es zu einer kurzzeitigen, spontanen Emission von Fluoreszenzlicht. Ein geringer Energieverlust in Form von Wärme ist ursächlich dafür, dass dieses emittierte Licht langwelliger ist als das absorbierte und somit auch eine andere Lichtfarbe besitzt als energiereichere, kurzwelligere Strahlung. Die Differenz der Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts und des vom Stoff absorbierten Lichts wird als Stokes-Shift bezeichnet.

Zellen selber fluoreszieren nicht beziehungsweise kaum. Durch eine Vielzahl spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) und fluoreszenzmarkierter Antikörper ist es jedoch

möglich zahlreiche Eigenschaften von Zellen mittels der Durchflusszytometrie zu analysieren.

Für die phänotypische Analyse der isolierten mononukleären Zellen wurden die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) verwendet.

FITC hat sein Absorptionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum im Bereich des grünen Lichts bei 525 nm.

PE (aus dem Photosyntheseapparat von Blau- und Rotalgen) ist ein rot fluoreszierendes Protein, dessen Absorptionsspektrum Absorptionsmaxima bei 496, 529 bis 534 und 555 nm zeigt und sein Emissionsmaximum bei 578 nm hat.

APC emittiert Licht der Wellenlänge 660 nm und wird mit 635 nm angeregt.

Die beim Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe auftretenden Überlagerungen der Emissionsspektren werden durch eine spezielle Kompensationselektronik bei der Signalverarbeitung korrigiert.

Da die grüne und rote Form des photokonvertierbaren Proteins EosFP ihr Emissions-maximum bei 516 bzw. 581 nm haben, wurden für die Immunphänotypisierung von Zellen, die EosFP E.coli phagozytiert haben, nur APC konjugierte Antikörper verwendet.

2.5.2 Aufbau eines Durchflusszytometers

Grundsätzlich besteht ein Durchflusszytometer aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem System der Signalverarbeitung.

Das Flüssigkeitssystem transportiert die zu untersuchenden Zellen aus dem Probenröhrchen in die Flusskammer und anschließend in den Abfallbehälter.

In der Flusskammer werden die Zellen in Suspension durch eine Hüllflüssigkeit (sheath fluid) in einen dünnen Probenstrahl fokussiert, so dass sie einzeln den Messpunkt, einen Laserstrahl, der rechtwinklig zum Probenfluss angeordnet ist, passieren.

Das optische System setzt sich aus einem Anregungsteil, dem Laserstrahl, und aus einem Detektionsteil zusammen. Passieren die Zellen den Laserstrahl, so kommt es zu Lichtstreuung und Fluoreszenzemission, welche durch zwischengeschaltete Lichtfilter und Spiegel aufgetrennt und zu Photodetektoren weitergeleitet werden.

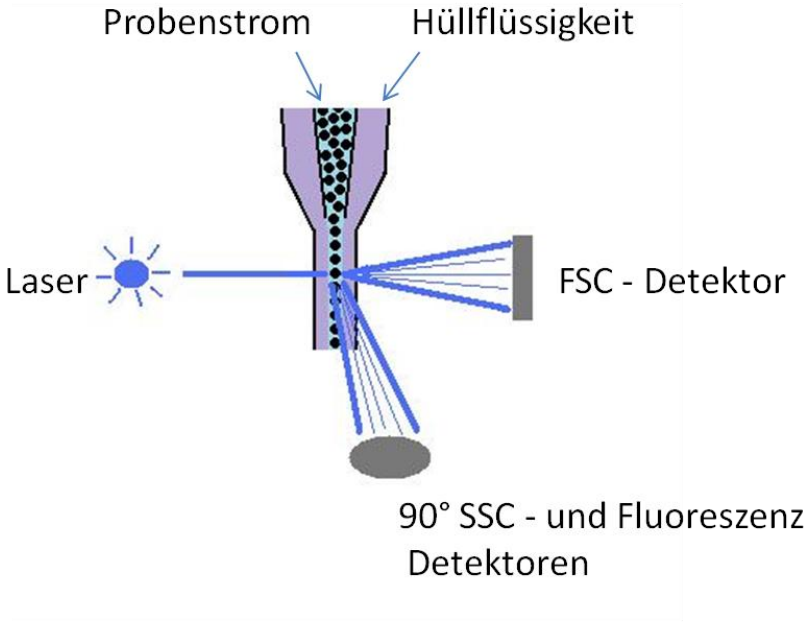


Abb. 3: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometer: Der Probenstrom passiert einen Laserstrahl, der rechtwinklig zum Probenfluss angeordnet ist. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter [FSC]) dient zur Analyse der Zellgröße; das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter [SSC]) wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und gibt Auskunft über die intrazelluläre Granularität.

2.6 Darstellung der Messergebnisse und Statistik

Das Hauptziel der Datenanlyse besteht in der Identifikation von so genannten Populationen (Zellen mit ähnlichen Eigenschaften) aus dem aufgenommenen Datensatz, welche dann in Hinblick auf ihren Anteil an den gemessenen Zellen, das Muster der Expression der gemessenen Parameter und ihre Heterogenität beschrieben werden. Hierzu sind verschiedene Darstellungen möglich, wobei Histogramme und Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) die gebräuchlichsten Formen sind (s. Abb. 4).

Das Histogramm ist die einfachste Form der Darstellung. Dargestellt wird nur ein Parameter in Form einer Häufigkeitsverteilung.

Beim Dot-Plot werden die Intensitätsverteilungen von zwei unterschiedlichen Messparametern auf der x- und y-Achse aufgetragen. Dabei wird jede Zelle entsprechend ihrer Messwerte als Punkt aufgetragen. Korrelieren nun die Messparameter in ihrer Expression miteinander, so verteilen sich die Zellen in Form einer Diagonale, sind sie unabhängig voneinander verteilt ergeben sich verschiedene Populationen von Zellen.

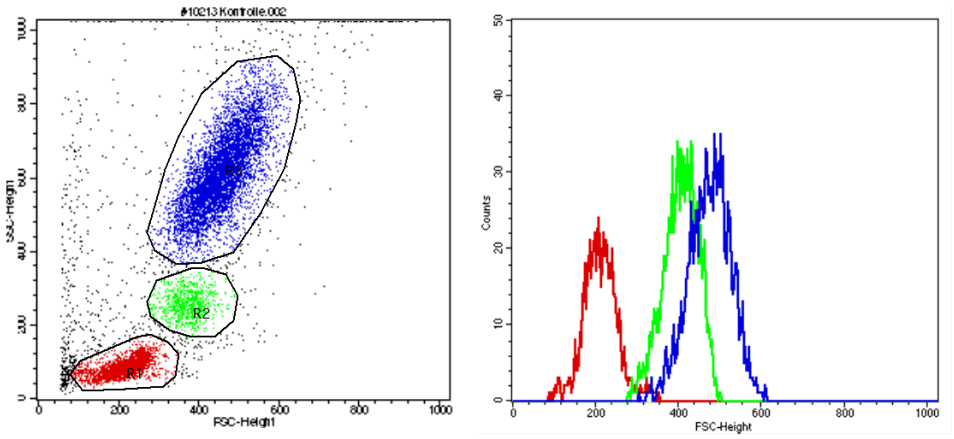


Abb. 4: Darstellung eines Dot-Plots (links) und eines Histogramms (rechts). Im linken Diagramm sind die verschiedenen Leukozytenpopulationen im humanen Vollblut zu erkennen (Lymphozyten – rot, Monozyten – grün, Granulozyten – blau); FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Das Histogramm (rechts) zeigt die Häufigkeit von Signalen von nur einem Parameter; hier: Vorwärtsstreulicht auf der x-Achse, Anzahl der gemessenen Zellen auf der y-Achse. Populationen und Farben entsprechend dem linken Diagramm.

Für die Darstellung und Analyse der Ergebnisse der FACS-Messungen wurde das Computerprogramm Cellquest™ 3.3 (BD) verwendet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA) erzeugt.

Um die Messwerte der Phagozytose der EosFP E.coli-Bakterien von den gesunden Kontrollen mit den Intensivpatienten zu vergleichen wurde der Mann-Whitney-U-test angewandt. Der Mann-Whitney-U-test ist ein nichtparametrischer Test, der die Verteilungen von zwei unabhängigen Gruppen vergleicht. Als signifikant wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 betrachtet.

2.7 Immunphänotypisierung

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Antigene, die sich durch Immunphänotypisierung nachweisen lassen.

Die Oberflächenmerkmale lassen sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien in Unterscheidungsgruppen („Cluster of Differentiation“ = CD) ordnen.

Die CD-Moleküle sind spezifisch für einen speziellen Zelltyp oder eine bestimmte Entwicklungsstufe von Zellen. Durch die Bindung monoklonaler Antikörper an

entsprechende Antigene ist es nun möglich, Zellen zu erkennen und auf diese Weise nachzuweisen.

Für die Markierung wurden $2x10^5$ der peripheren Blutmononukleären Zellen in je ein 4 ml Polypropylen-Falconröhrchen in einem Volumen von 0,5 ml pipettiert und mit $2x10^6$ EosFP E.coli-Bakterien in Medium (10% FCS, RPMI 1640) inkubiert.

Für die Bestimmung von Oberflächenmarkerrezeptoren wurden die PBMC mit PBS, 0,1% NaN_3, 0,25% FCS bei +4° C gewaschen, der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit 20µl Normalserum vom Kaninchen inkubiert, um Fc-Rezeptoren zu blockieren. Danach wurde die Zellsuspension und mit 25-50 µl/Röhrchen in FACS-Typisierungsröhrchen verteilt (ca. $1x10^5$ Zellen/tube). Die Zugabe der monoklonalen Antikörper erfolgte in einem Volumen von 5 µl (Antikörperkonzentration von 10µg/ml).

Um die in dieser Arbeit isolierten mononukleären Zellen phänotypisch zu analysieren wurden Antikörper gegen folgende Antigene verwendet:

-Mouse IgG1: Das monoklonale Mouse IgG1 besitzt eine unbekannte Bindungsspezifität und wird bei immunologischen Techniken als Isotypkontrolle für Maus-IgG1-Antikörper verwendet

-Mouse IgG2a: Mouse IgG2a reagiert nicht mit menschlichen Zellen und eignet sich daher als Mouse IgG2a-Isotypkontrolle

-CD14: befindet sich auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen [66]; wird in hoher Anzahl von Monozyten und zu einem geringen Anteil von Granulozyten exprimiert [54]

-HLA-DR: wird von antigenpräsentierenden Zellen und konstitutiv von Monozyten exprimiert [48], und wird durch Interferon-γ hochreguliert

-CD45: die Tyrosinphosphatase CD45 wird von allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert [24]

-CD337: (NKp30) wird auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert [44]

-CD303 (BDCA-2): wird spezifisch von humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) exprimiert [23]

-CD304 (BDCA-4, Neuropilin-1): Wie CD303 wird CD304 von humanen PDC exprimiert [23]. Außerdem wird BDCA-4 von dendritischen Zellen exprimiert, die von Monozyten abstammen [15]

-CD95 (Apo-1, Fas): dient als der prototypische Todesrezeptor für das Immunsystem [47]

-CD123: IL-3Rezeptor alpha-Kette, die von Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten, vaskulären Endothelzellen, einer Unterpopulation von B-Lymphozyten, einer Unterpopulation von hämatopoetischen Progenitorzellen und in großer Menge von einer Unterpopulation von dendritischen Zellen exprimiert wird [12]

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie der mononukleären Zellen wurden Zytospinpräparate hergestellt und dabei eine Hoechst-Färbung durchgeführt. Die Hoechst-Färbung macht den Zellkern fluoreszenzmikroskopisch durch eine blaue Färbung sichtbar.

Hierzu wurden 2 µl Hoechst in ein ml PBS pipettiert, welches in ein Eppendorf Safe-Lock Gefäß vorgelegt wurde. Die zu mikroskopierenden Zellen wurden nun in ein ml PBS mit FCS aufgenommen und 10 µl aus dem Eppendorf Safe-Lock Gefäß dazupipettiert. Danach erfolgte ein Waschschritt bei 900 Umdrehungen / Minute (150 g) für 5 Minuten. Durch vorsichtiges Schütteln wurde das Zellpellet resuspendiert und 0,5 ml PBS mit FCS hinzugegeben.

Der Objektträger, auf den ein Filterpapier (raue Seite nach oben) und ein Plastiktrichter kommen, wird in eine Metallklammer gespannt. In den Plastiktrichter wurden nun 300 µl der vorbereiteten Zellen pro Objektträger pipettiert.

Die Zytozentrifuge (Cytospin 3 der Firma Shandon) lief nun 5 Minuten lang bei 300 Umdrehungen / Minute.

Nachdem die Zytospins getrocknet waren wurden sie fixiert und mit May-Grünwald/Giemsa gefärbt. Die Präparate wurden am Laser Scanning Mikroskop „LSM 510 meta“ von Zeiss untersucht.

2.9 Materialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

- BD CellFIX (1:10 mit dest. H_2O, BD Biosciences)
- Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml, isoton, Biochrom AG)
- CELLSTAR 24 Well Zellkultur Multiwell Platten (Greiner Bio-One)

- CELLSTAR Polystyrol Zellkultur Röhrchen 12ml (Greiner Bio-One)
- DMSO (Sigma Life Science)
- D-PBS (ohne $CaCl_2$, $MgCl_2$, GIBCO)
- Facs Lysing Solution (BD Biosciences)
- FACSFlow (BD Biosciences)
- FACSRinse(BD Biosciences)
- FCS (GIBCO)
- Mikropipetten 20µl, 200µl, 1000µl (Eppendorf)
- Nunc Cryo Tube 1,8 ml (Nunc)
- Pipetten Serological Pipet 1ml, 2ml, 5ml, 10ml (BD Biosciences)
- Polypropylenröhrchen 13 ml (Sarstedt)
- Polystyrene-Round-Bottom-Tubes 5ml (BD Biosciences)

Geräte

- Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences)
- Mikroskop „LSM 510 meta“ (Zeiss)
- Pipettierhilfe Pipetboy plus (Integra Bioscience)
- Reinluftbank (Nunc HLB 2472 GS)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Zentrifuge Beckman Coulter GS-6K (Beckman Coulter)
- Zytozentrifuge Cytospin 3 (Shandon)

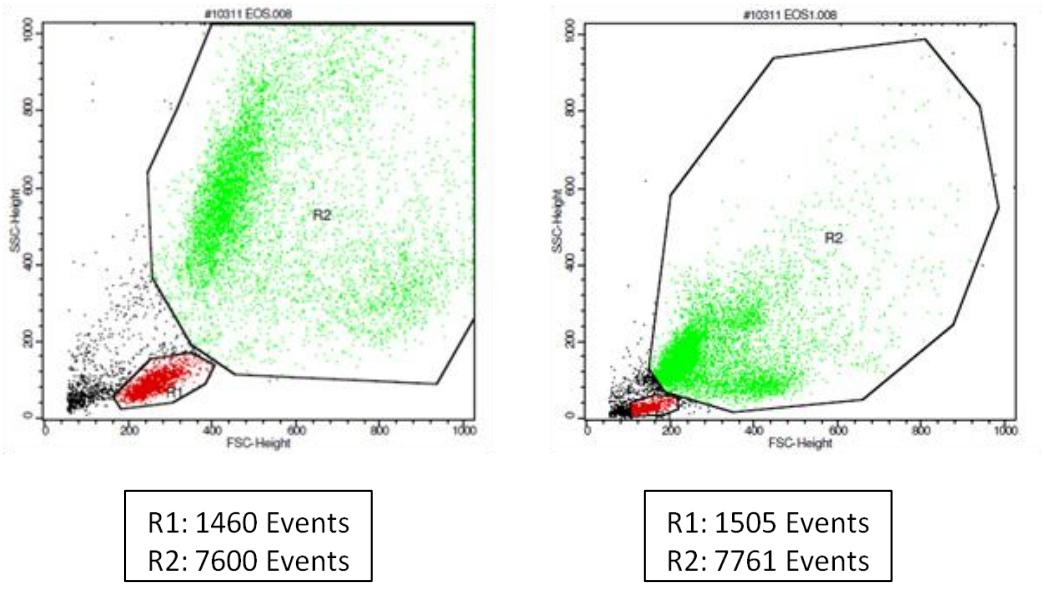
3 Ergebnisse

3.1 Fluoreszenz aktivierte Zellmessung

3.1.1 Test zur Verteilung der Leukozytenpopulationen im Dot Plot

Bei der FACS-Messung der isolierten mononukleären Zellen zeigt sich, dass sich bei den gewählten "Instrument Settings" (Einstellung der Spannung für die Messung) je nach Patient mehr oder weniger Zellen bestimmter Populationen am Rand des Dot Plots befinden. Durch Herunterregulieren der angelegten Spannung verschieben sich die Populationen und Zellen im Dot Plot nach links und unten. Durch entsprechendes "Gaten" bei der Messung der gleichen Probe mit unterschiedlichen "Instrument Settings" lässt sich zeigen, dass diese keinen Einfluss auf Populationsgröße und Fluoreszenzwerte (hier nicht gezeigt) haben.

Um die Populationen besser voneinander abgrenzen zu können wurden die ursprünglich gewählten "Instrument Settings" beibehalten.



R1: 1460 Events R2: 7600 Events	R1: 1505 Events R2: 7761 Events

Abb. 5: Leukozytenpopulationen einer Probe im Dot Plot: Links ist das Messergebnis mit den "Instrument Settings" zu sehen (Dot Plot nach 20 h Inkubationszeit von mittels Ficoll-Gradient isolierten mononukleären Zellen mit EosFP E.coli [Eos Fluorescent Protein Escherichia coli]-Bakterien), mit denen alle Messungen durchgeführt wurden, rechts das Ergebnis mit geänderten "Instrument Settings" (Spannung reduziert). Die Abweichung der gemessenen "Events" lässt sich auf das Setzen der "Gates" sowie die Verteilung der Zellen in der Probe während des Messvorgangs zurückführen. FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

3.1.2 Quantitative Verteilung der Zellpopulationen

Setzt man die "Gates" im Dot Plot so, dass die Lymphozyten und die restlichen mononukleären Zellen mit je einem "Gate" erfasst werden (s. Abb. 5) und errechnet für deren prozentualen Anteil an der gesamten Zellzahl im Dot Plot die Mittelwerte der Messungen aller Patienten, so zeigt sich im Balkendiagramm (s. Abb. 6), dass bei den Patienten, die intensivmedizinisch behandelt werden, der Anteil an Lymphozyten kleiner und der der restlichen mononukleären Zellen folglich größer ist als bei den Proben der Panels (Panels = die Proben der freiwilligen gesunden Spender) in Gruppe 1.

Des Weiteren ist ersichtlich, dass sich während der Inkubationszeit zwischen den beiden letzten Messpunkten (nach 6h und über Nacht) etwa zwischen 10 und 20% der gesamten Zellanzahl vom "Lymphozytengate" ins andere "Gate" verschiebt. Während bei den Intensivpatienten (Gruppen 2-4) die Lymphozyten dadurch nach der letzten Messung in Unterzahl sind, bleiben sie bei den Panels deutlich in Überzahl.

In den Gruppen 1, 2 und 4 liegt der Lymphozytenanteil zu jedem Messpunkt bei den Proben mit EosFP E.coli-Bakterien etwas höher als bei den jeweiligen Kontrollen, während er in Gruppe 3 deutlich darunter liegt. Bei den restlichen mononukleären Zellen hingegen ist der prozentuale Anteil in Gruppe 3 in beiden Ansätzen relativ ausgeglichen und liegt in den anderen Gruppen im Ansatz mit den Bakterien jeweils unter dem der Kontrollen.

Außerdem fällt auf, dass die Zahl toter Zellen (Debris) insgesamt in den drei Gruppen der Intensivpatienten höher liegt als bei den Panels. Im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 4, bei denen zum jeweiligen Messpunkt kaum ein Unterschied der Anzahl toter Zellen zwischen der Kontrolle und dem Ansatz mit EosFP E.coli-Bakterien vorliegt, liegt der Anteil toter Zellen in Gruppe 3 im Ansatz mit den Bakterien etwa 3-4 Mal höher als im Kontroll-ansatz. In Gruppe 2 liegt der Anteil toter Zellen In den Ansätzen mit den Bakterien bei den ersten drei Messpunkten ebenfalls deutlich höher als bei den Kontrollen, wobei für 3 der 11 Proben dieser Gruppe dieselben Bakterien wie für Gruppe 3 verwendet wurden.

In Gruppe 2 mit den 11 Proben mit den größeren Populationen neutrophiler Granulozyten zeigt sich, dass die Lymphozytenpopulationen der Kontrollen kleiner sind als bei den anderen 3 Gruppen (bei den Kontrollen ist der Anteil an Lymphozyten kleiner als der der restlichen mononukleären Zellen).

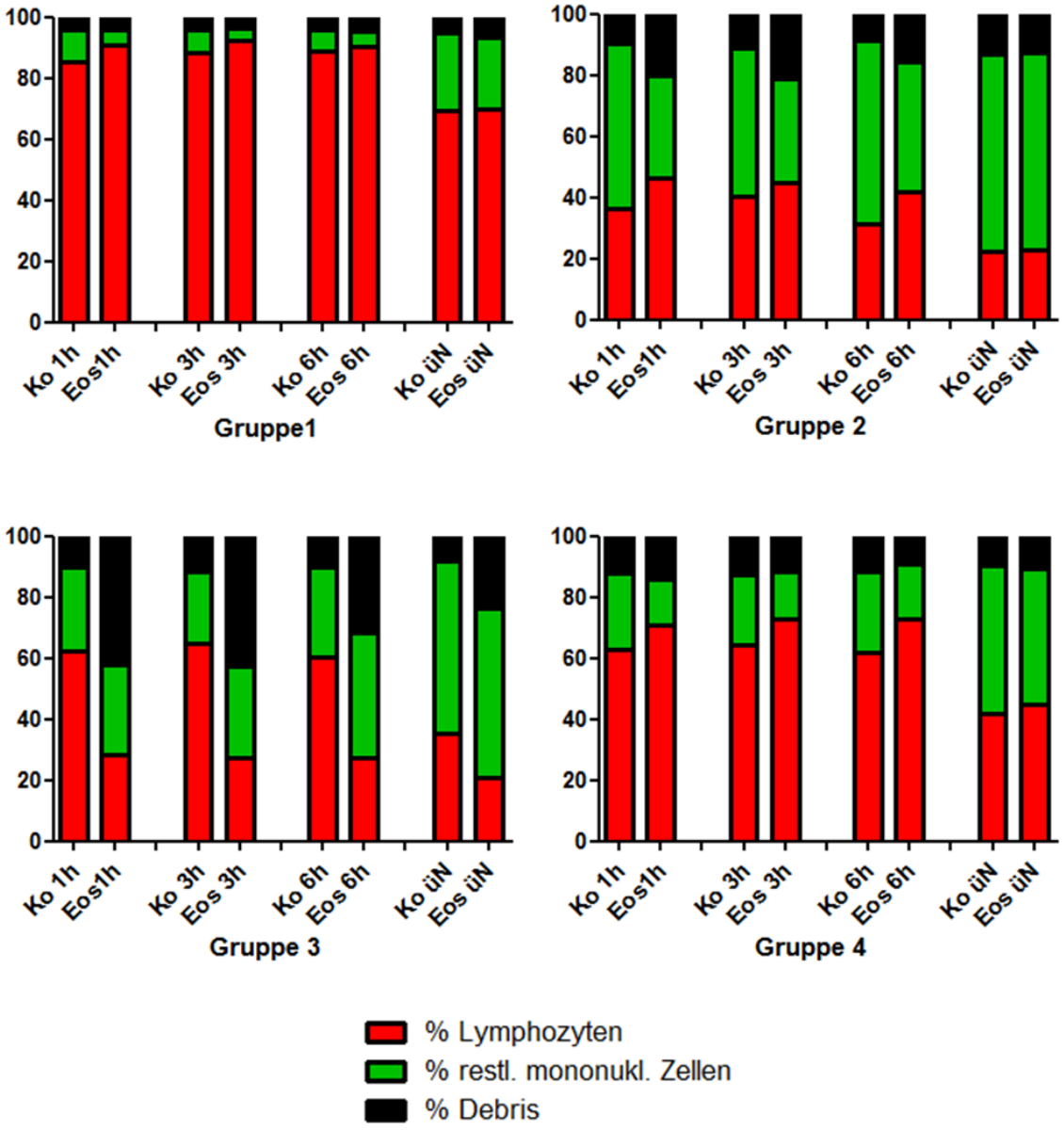


Abb. 6: Mittelwerte der prozentualen Anteile an der Gesamtzellzahl von Lymphozyten, den restlichen mononukleären Zellen (=restl. mononukl. Zellen) und des Debris der Gruppen 1-4:
-Gruppe 1: gesunde Kontrollen (Panels) ohne die Probe mit der Granulozytenpopulation
-Gruppe 2: Patientenproben, die eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten aufweisen
-Gruppe 3: Patientenproben, bei denen die Bakterien zum Teil verklumpt waren
-Gruppe 4: Patientenproben nach Wechsel der Bakterien
Ko=Kontrolle (Zellen ohne EosFP E.coli [Eos Fluorescent Protein Escherichia coli]-Bakterien); Eos= Zellen mit EosFP E.coli-Bakterien; üN=über Nacht; Debris=tote Zellen.

3.1.3 Darstellung von Phagozytose und Degradation der EosFp E.coli-Bakterien im Dot Plot

Wiedergabe der Phagozytose im Streulicht-Dot-Plot

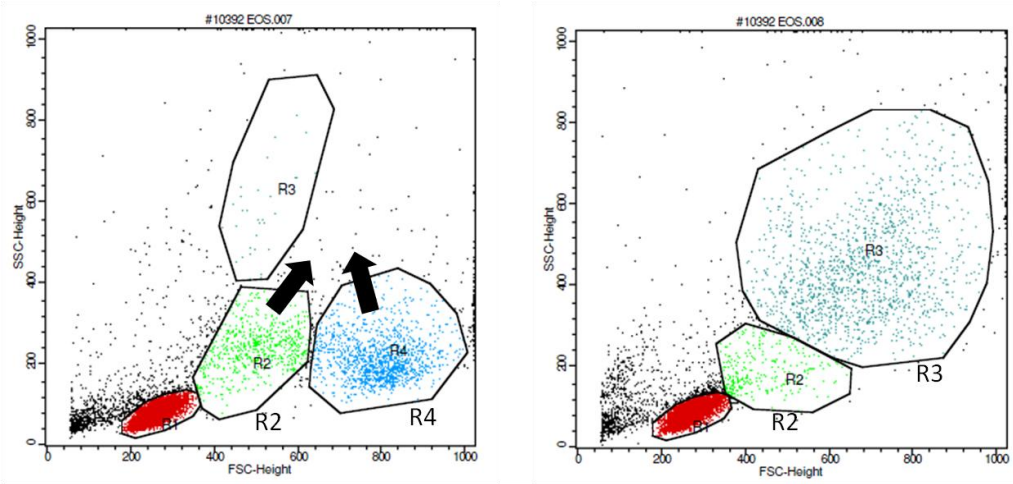


Abb. 7: Streudiagramme eines Patienten nach Inkubation über Nacht der isolierten mononukleären Zellen: links die Kontrolle ohne Bakterien und rechts der Ansatz mit EosFP E.coli (Eos Fluorescent Protein Escherichia coli)-Bakterien. Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. FSC Height =Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Die Streudiagramme in Abb. 7 zeigen das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung der isolierten Zellen nach Inkubation über Nacht. Anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC auf der x-Achse, SSC auf der y-Achse) erfolgt die Einteilung in verschiedene Populationen, deren Fluoreszenzeigenschaften dann durch das Setzen von "Gates" getrennt voneinander beurteilt werden können.

Nach einer bestimmten Inkubationszeit lässt sich im Ansatz mit den Bakterien eine Verschiebung der Populationen und einzelner Zellen beobachten.

Die Anzahl der Zellen in der Kontrolle ohne Bakterien links (R2(620) + R4(1265) = 1885) und rechts der Ansatz mit EosFP E.coli-Bakterien (R2(291) + R3(1495) = 1786) liegt nah beieinander.

Fluoreszenzdarstellung der EosFP E.coli-Bakterien im Dot Plot

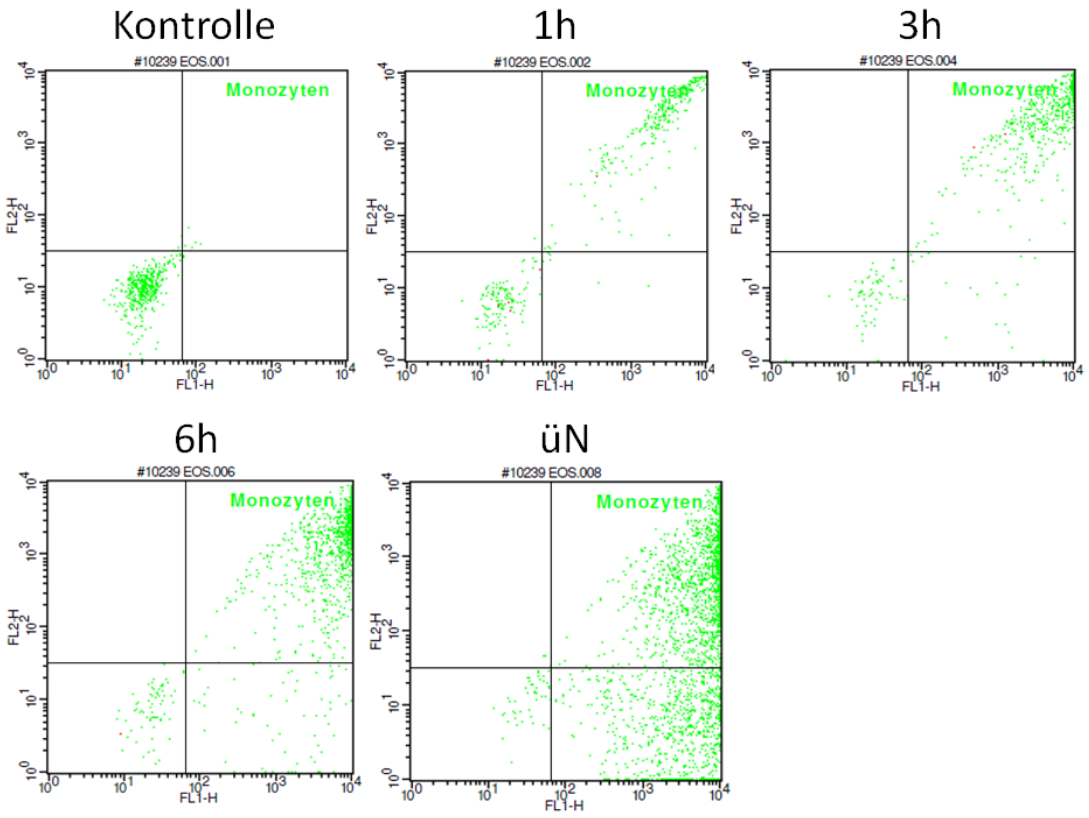


Abb. 8: Fluoreszenzdarstellung im Dot Plot der Population R2 aus Abbildung 17 A-C. Oben links der Ansatz ohne Bakterien nach 1h (Kontrolle). Daneben die Messergebnisse des Ansatzes mit den EosFP E.coli (Eos Fluorescent Protein Escherichia coli)-Bakterien nach 1, 3 und 6 Stunden Inkubationszeit und nach Inkubation über Nacht. Auf der x-Achse (FL1-H) wird die grüne Fluoreszenz von EosFP dargestellt, auf der y-Achse (FL2-H) die rote.

Abb. 8 zeigt die Verteilung der Zellen im Dot Plot nach ihrer Fluoreszenz. Die Zellen verteilen sich danach, wie viele EosFP E.coli-Bakterien sie phagozytiert haben und wie stark diese abgebaut wurden.

Nach einer Stunde zeigt sich, dass nahezu alle Zellen, die sich im Gate R2 befinden, Bakterien phagozytiert haben. Die Zellen, die phagozytiert haben, bei denen jedoch noch keine Fusion von Phagosom und Lysosom stattgefunden hat, verteilen sich im "Upper Right" (UR, der obere rechte Quadrant im Fluoreszenz-Dot Plot) annähernd auf einer Diagonalen. Je mehr Bakterien phagozytiert werden, desto weiter rechts und oben auf dieser Diagonalen befinden sich die Zellen.

Im Laufe der Inkubationszeit reduziert sich durch die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen und die daraus resultierende Verringerung des pH-Wertes die rote Fluoreszenz der EosFP E.coli-Bakterien, während die grüne Fluoreszenz relativ konstant bleibt. Folglich wandern die Zellen von der Diagonale langsam nach unten.

Dass sich über die Inkubationszeit immer mehr Zellen in den Dot Plots befinden liegt darin begründet, dass sich wie unter 3.1.2 dargestellt, die Zellanzahl innerhalb der "Gates" zwischen den Messpunkten deutlich verändert. Während sich in den Ansätzen mit den Bakterien nach 1 und 3 Stunden in etwa 2200 Zellen im "Gate" R2 befinden sind es nach 6 Stunden bzw. nach Inkubation über Nacht 4237 bzw. 4700 Zellen.

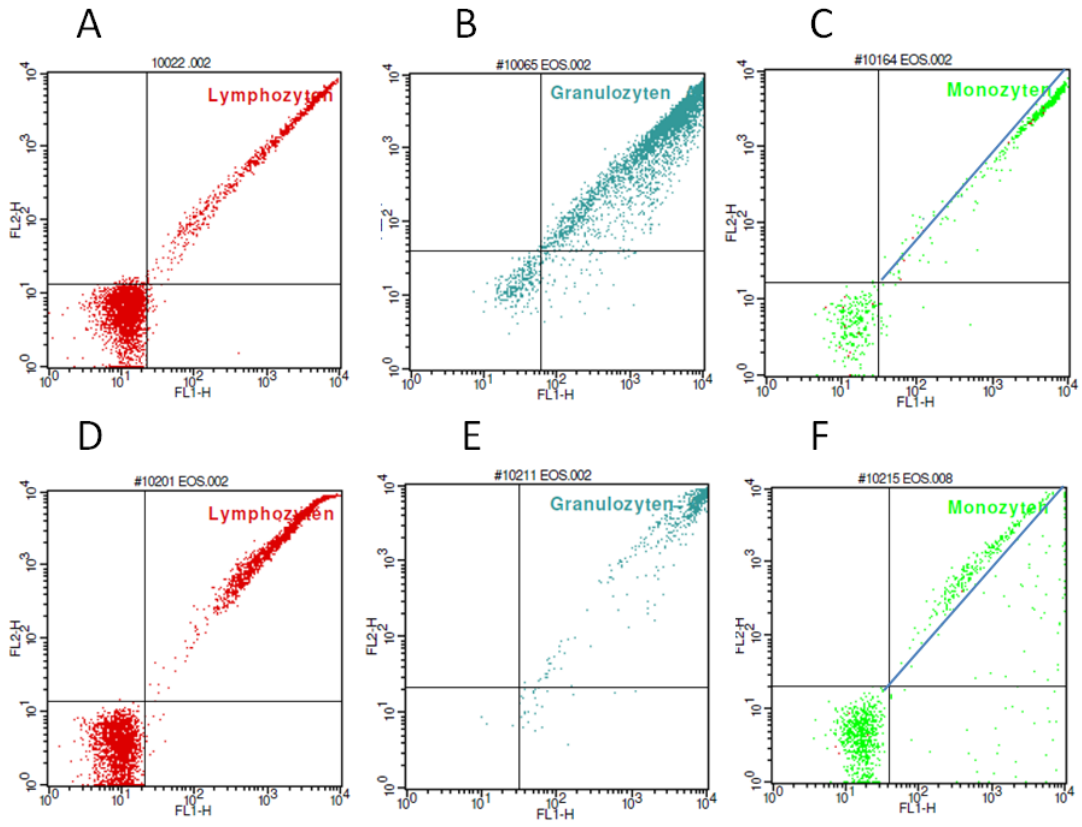


Abb. 9: Fluoreszenz-Dot-Plots von unterschiedlichen Patienten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die unterschiedlichen Farben der Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung gewählt. A-C sind Fluoreszenz-Dot-Plots aus Gruppe 3, bei deren Proben die Bakterien zum Teil verklumpt waren; D-F entsprechen Dot-Plots nach Wechsel der Bakterien. Nach Wechsel der Bakterien stellt sich die Fluoreszenz unabhängig von der Population spezifisch dar.

Auf der x-Achse (FL1-H) wird die grüne Fluoreszenz von EosFP dargestellt, auf der y-Achse (FL2-H) die rote.

Abbildungen 9 A-C sind Fluoreszenz-Dot-Plots aus Gruppe 3, bei deren Proben die Bakterien zum Teil verklumpt waren. Die Zellen im UR verteilen sich annähernd auf einer Diagonalen. Von den Lymphozyten werden die EosFP E.coli-Bakterien lediglich adsorbiert, d.h. sie reichern sich an der Oberfläche der Zellen an, ohne phagozytiert zu werden. Folglich ist hier auch nach Inkubation über Nacht keine Degradation zu beobachten.
Abbildungen 9 D-F entsprechen Dot-Plots nach Wechsel der Bakterien. Die Zellen verteilen sich hier auf einem leichten Bogen, der etwas nach links versetzt ist. Oben rechts im UR macht die Diagonale einen Knick nach rechts.
Die Fluoreszenz der EosFP E.coli-Bakterien stellt sich also unabhängig von der Population (Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten) vor und nach Wechsel der Bakterien spezifisch dar.

3.1.4 Zellpopulationen nach Inkubation der mononukleären Zellen

Nach Inkubation der mittels Ficoll-Gradienten isolierten mononukleären Zellen aus peripherem Blut zeigt sich im Streudiagramm, dass sich zu den jeweiligen Messpunkten nach 1, 3 und 6 Stunden und über Nacht nicht nur Lymphozyten und Monozyten in der Zellsuspension befinden, sondern auch Granulozytenpopulationen auftauchen. Bei nahezu allen Messungen stellen sich Differenzen der Populationen und deren Position im Streulicht-Dot-Plot zwischen der Kontrolle ohne Bakterien und dem Ansatz mit den EosFP E.coli-Bakterien dar. Des weiteren sieht man, dass sich die Position der Populationen im Dot Plot zwischen den Messpunkten bei den meisten Proben verändert und Populationen nach der Phagozytose der Bakterien zu "neuen" Populationen verschmelzen können. Außerdem verschiebt sich die Anzahl der Zellen in den jeweiligen "Gates" und es können neue Populationen von Zellen entstehen.
In Abb. 10 ist die Anzahl der Zellen in den jeweiligen "Gates" angegeben. Die Anzahl der Zellen im Lymphozytengate (rote Population links unten) nimmt im Laufe der Inkubationszeit ab und die Zellen aus dieser Population wandern in andere "Gates".
Nach Inkubation über Nacht sind im Ansatz mit den Bakterien nur noch die Lymphozyten sowie eine weitere Population von Zellen zu sehen.

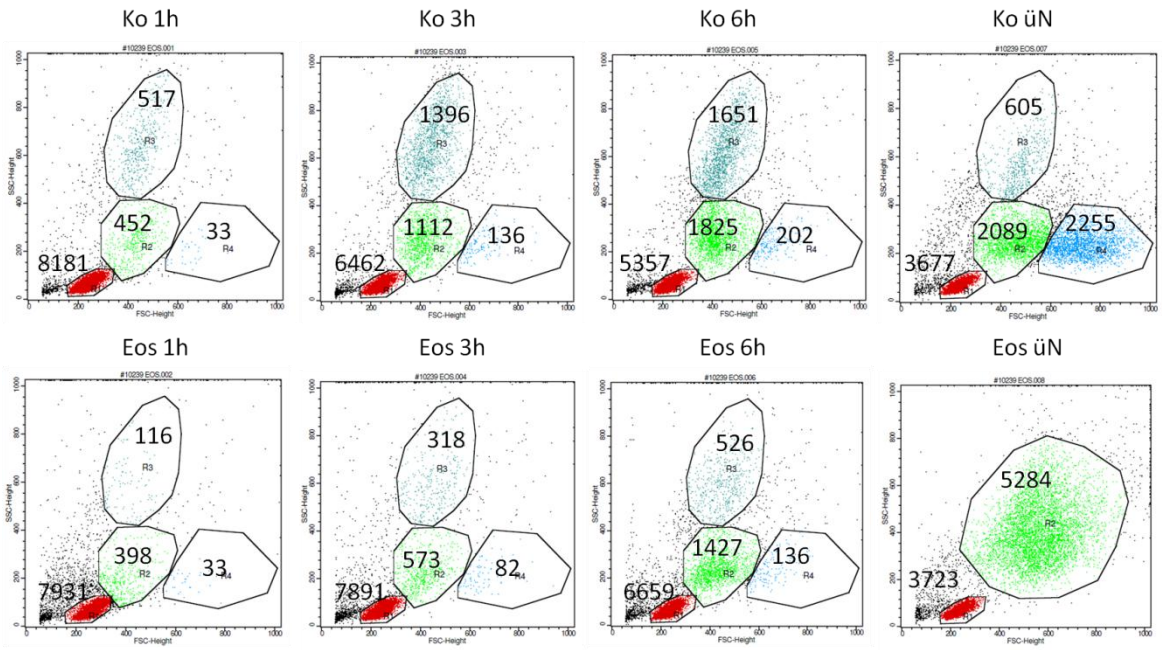


Abb. 10: Streudiagramme eines Patienten aus Gruppe 4. (Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht). Während der Inkubationszeit wandern Zellen aus dem Lymphozytengate (rot) in andere Gates oder es bilden sich neue Populationen. Es kann auch zum Verschmelzen von Populationen kommen.

Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Gruppe 1: gesunde Kontrollen (Panels)

Für die Panels wurden die gleichen Bakterien wie in Gruppe 4 verwendet.

Bei den Panels sieht man im Dot Plot bei 7 von 8 Versuchen ein nahezu gleiches Ergebnis. In den Dot Plots zu den Messpunkten nach 1, 3 und 6 Stunden verteilen sich die Zellen wie in Abb. 11 unter Ko 1h und Eos 1h dargestellt. Die Lymphozyten (Population R1, hier rot dargestellt) machen einen Anteil von 78-90 Prozent aus, die Monozyten (Population R2, hier grün dargestellt) von 2-10 Prozent. Im Gate R3 (neutrophile Granulozyten) befinden sich wenige Zellen (ca. 1 Prozent).

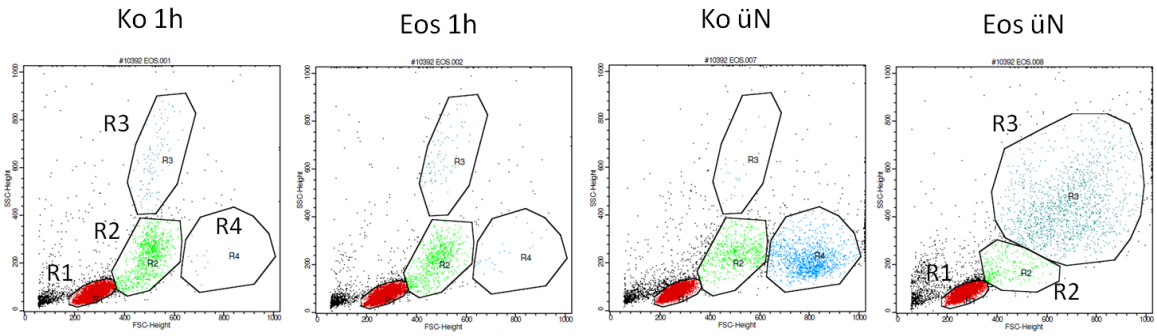


Abb. 11: Streudiagramme eines Panels nach 1h Inkubation (Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien) und nach Inkubation über Nacht (üN=über Nacht). Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Nach der Inkubation über Nacht zeigt sich in der Kontrolle (Ko üN), dass sich neben den Monozyten eine neue Population entwickelt hat (R4). Betrachtet man die Anzahl der Zellen in den Populationen (Kontrolle nach 6h bei dem Ansatz aus Abb. 11: R1 8045, R2 422, R4 63; Kontrolle über Nacht: R1 6672, R2 620, R4 1265) so müssen sich die Zellen aus Population R4 aus Zellen differenzieren, die sich zuvor im Lymphozytengate befinden.

Im Dot Plot mit den Bakterien nach Inkubation über Nacht ändert sich die Position der Zellen und Populationen, d.h. durch die Phagozytose der Bakterien wandern die Zellen der Populatioen R2 bzw. R4 aus Abb. 11 Ko üN nach rechts und oben bzw. nach links und oben und verschmelzen zu einer größeren Population (R3). Die Population R2 in Abb. 11 Eos üN enthält Zellen, bei denen so gut wie keine Degradation der Bakterien zu beobachten ist.

Bei einem Panel befindet sich im Streudiagramm nach Ficoll-Gradient zu jedem Messzeitpunkt eine Granulozytenpopulation (siehe Population R3 in Abb. 12).

Wie bei den anderen Panels entwickelt sich während der Inkubation über Nacht die Population R4 rechts unten im Dot Plot.

Im Dot Plot Eos üN in Abb. 12 kommt es im Gegensatz zu den anderen gesunden Spendern nicht zu einer Vereinigung der Populationen, jedoch befinden sich nach Phagozytose der Bakterien mehr Zellen oben rechts im Streudiagramm (R5) als bei der Kontrolle ohne Bakterien (Ko üN).

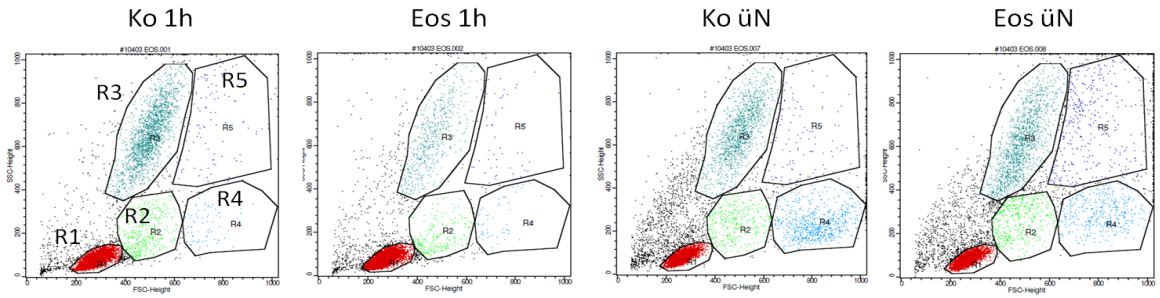


Abb. 12: Streudiagramme des Panels mit unreifen neutrophilen Granulozyten im Ansatz nach 1h Inkubation (Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien) und nach Inkubation über Nacht (üN=über Nacht). Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Zellpopulationen bei den Intensivpatienten

Bei den Intensivpatienten zeigen die Ergebnisse im Scatter eine große Heterogenität in Hinsicht auf vorhandene Populationen und die Verteilung der Populationen bzw. Zellen, was es schwierig macht, die Proben bezüglich der Fluoreszenz der phagozytierten EosFP E.coli Bakterien zu vergleichen. Wie unter 2.1.1 beschrieben wurden die Proben der Intensivpatienten in folgende Gruppen eingeteilt:

-Gruppe 2: Patientenproben mit Leukozytose

-Gruppe 3: Patientenproben, bei denen die Bakterien zum Teil verklumpt waren

-Gruppe 4: Patientenproben nach Wechsel der Bakterien

Gruppe 2: Patientenproben, die eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten aufweisen

In 11 der 42 Proben von Intensivpatienten findet sich eine größere Population von neutrophilen Granulozyten, wobei von zwei der 9 Patienten in dieser Gruppe zwei Mal Blut abgenommen wurde.

3 Proben dieser Gruppe enthalten dieselben Bakterien wie Gruppe 3, die restlichen Messungen wurden nach Wechsel der Bakterien gemacht.

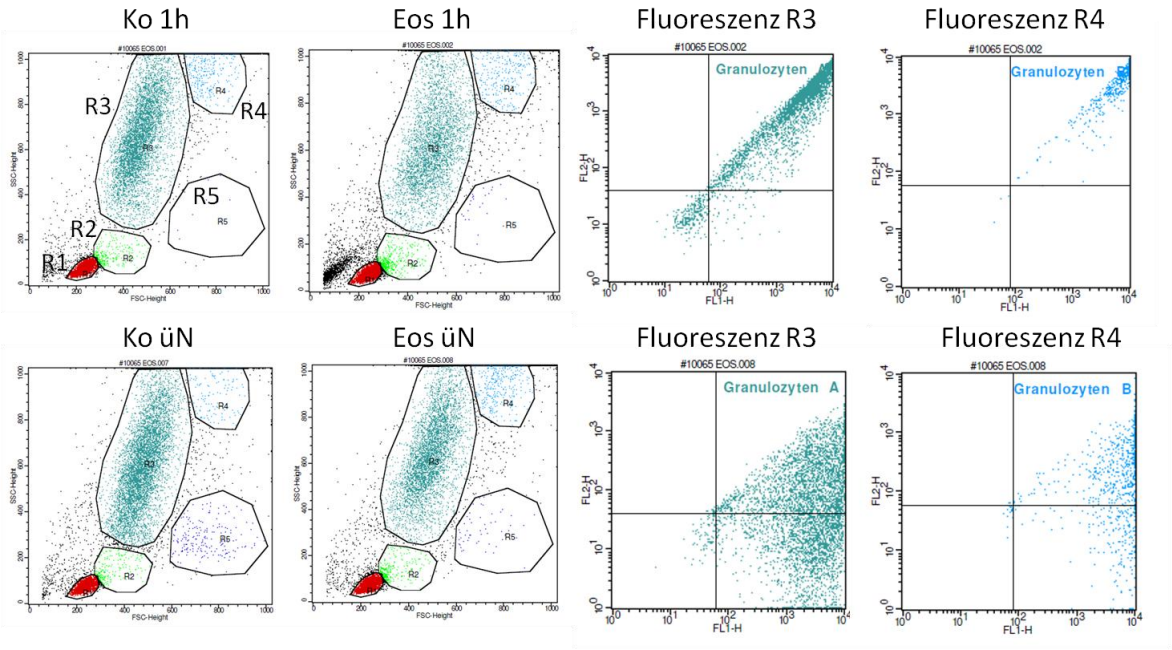


Abb. 13: Streudiagramme eines Intensivpatienten nach 1h Inkubation und nach Inkubation über Nacht mit Darstellung der Fluoreszenz der Populationen R3 und R4. Der Abfall der roten Fluoreszenz nach Inkubation über Nacht zeigt, dass beide Populationen die phagozytierten Bakterien abbauen. Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht; die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt; FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse; auf der x-Achse (FL1-H) wird die grüne Fluoreszenz von EosFP dargestellt, auf der y-Achse (FL2-H) die rote.

Bei diesen Patienten sind bei einem Messpunkt mindestens 2500 (bei 10000 gezählten Zellen im FACS) neutrophile Granulozyten "gegatet" worden, als Maximum sind bei einem Patienten 8651 von 10000 gezählten Zellen in diesem "Gate".

Die Zellen in der Population oben rechts in Abb. 13 (R4) sind aus physikalischer Sicht den eosinophilen Granulozyten zuzuordnen (hohe Granularität). Diese Population tritt bei 4 der 9 Patienten auf.

Die Population unten rechts im Dot Plot (R5 in Abb. 13) tritt in allen Proben nach Inkubation über Nacht auf.

Bei einem Patienten treten nach Ficoll-Gradient nach 1 Stunde Inkubation neben wenigen Lymphozyten (455 von 10000 gemessenen Zellen) fast ausschließlich neutrophile Granulozyten auf (siehe Abb. 14 E).

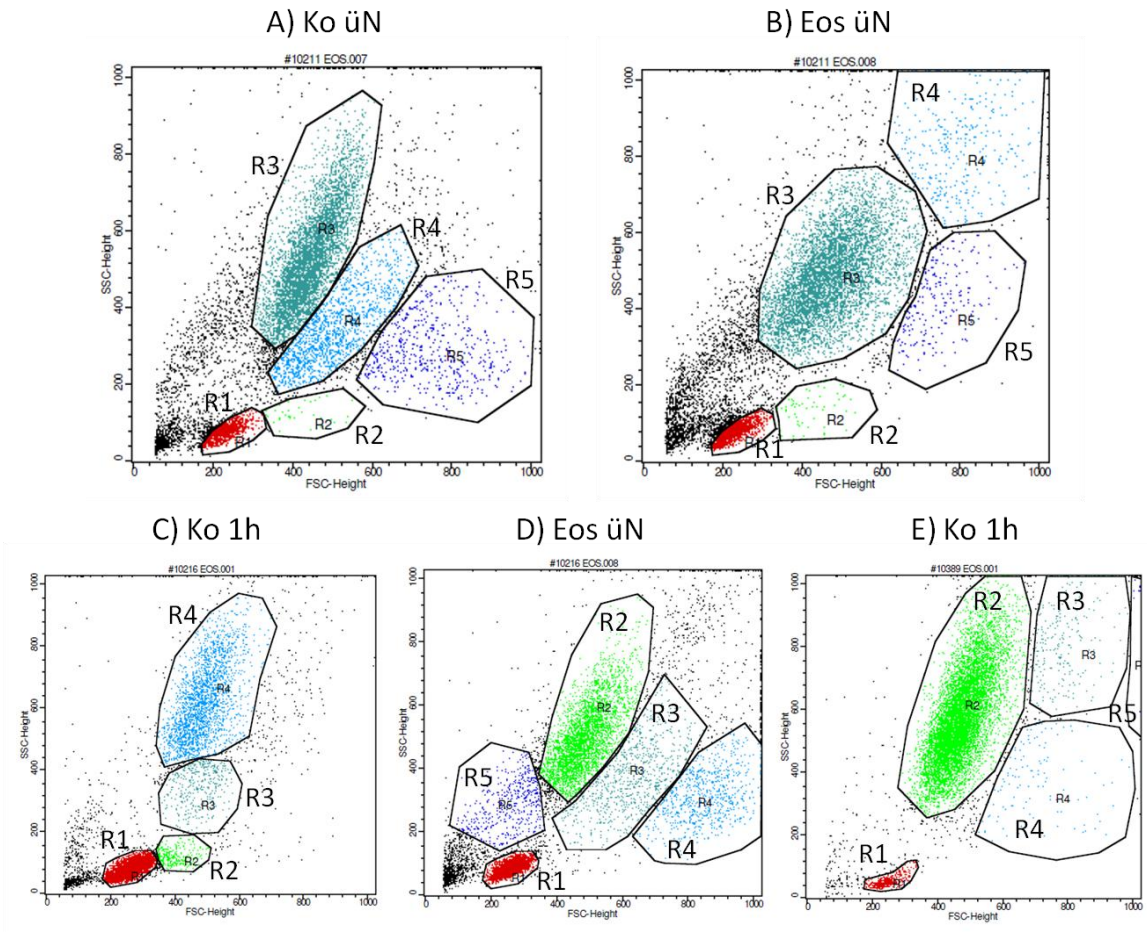


Abb. 14: Streudiagramme dreier Intensivpatienten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, wobei A+B (Vereinigung von Populationen) sowie C+D (Verschiebung von Populationen) je einem Patienten zuzuordnen sind. Bei E) waren fast ausschließlich neutrophile Granulozyten in der Probe. Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt; Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht, FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Bei 4 der 11 Proben kommt es nach Inkubation im Ansatz mit den Bakterien zur Vereinigung der Population der neutrophilen Granulozyten mit der Population der Monozyten (s. Abb. 14 A+14 B), wobei zwei dieser Proben einem Patienten entnommen wurden. Bei den restlichen Proben dieser Gruppe kommt es zu keiner Vereinigung von Populationen, wobei es zur Verschiebung einzelner Populationen im Streudiagramm kommen kann (s. Abb. 14 C+14 D).

Populationen, die sich an der Position befinden, die in Abb. 14 A, 14 B und 14 C als R2 gekennzeichnet ist, phagozytieren keine Bakterien. In der Fluoreszenzdarstellung verteilen sich die Zellen auf einer Diagonalen (s. Abb. 9 D) oder bleiben im "Lower Left"

(LL, der untere linke Quadrant im Fluoreszenz-Dot Plot). Dies ist bei allen ausgewerteten Proben dieser Arbeit zu beobachten.

Abgesehen von den eben beschriebenen Zellen und den Lymphozyten (in allen Abbildungen rot dargestellt) phagozytieren und degradieren fast sämtliche Zellen aller anderen Populationen die EosFP E.coli-Bakterien (siehe als Beispiel Abb. 8: nach Inkubation über Nacht befinden sich fast keine Zellen mehr im "Lower Left" und nahezu alle Zellen im "Upper Right" haben durch die Fusion von Phagosom und Lysosom die Diagonale verlassen und wandern nach unten).

Gruppe 3: Patientenproben, bei denen die Bakterien zum Teil verklumpt waren

Nach Betrachtung einer Probe der mononukleären Zellen mit den EosFP E.coli-Bakterien unter dem Mikroskop zeigte sich, dass die verwendeten Bakterien zum Teil verklumpt waren, weshalb die bis dahin durchgeführten Messungen in einer separaten Gruppe zusammengefasst werden (mit Ausnahme der 3 Proben mit der großen Anzahl an neutrophilen Granulozyten).

Bel diesen Proben bewegt sich im Ansatz mit den Bakterien mindestens bei einem Messzeitpunkt die Lymphozytenpopulation in Richtung rechts oben aus ihrem Gate heraus (siehe Population R2 in Abb. 15 B) oder es bildet sich eine Population, deren Zellen sich auf einer Diagonalen rechts oberhalb der Lymphozyten verteilen (siehe Population R3 in Abb. 15 D).

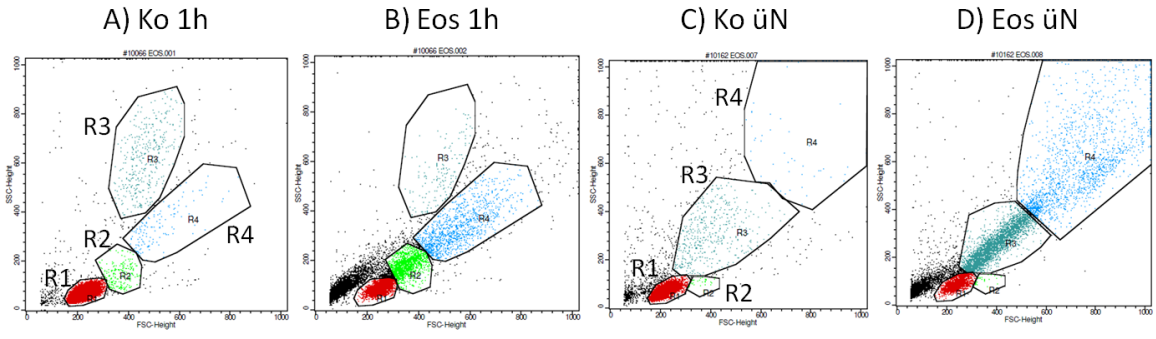


Abb. 15: Streudiagramm zweier Intensivpatienten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, wobei A+B sowie C+D je einem Patienten zuzuordnen sind. In den Ansätzen mit den Bakterien bewegt sich die Lymphozytenpopulation (rot) nach rechts oben aus ihrem "Gate" heraus. Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt; Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht, FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Die Probe 10162 ist die einzige dieser Gruppe, bei der in der Kontrolle nach Inkubation über Nacht keine Population rechts unten im Dot Plot entsteht (s. Abb. 15 C).

Ansonsten kommt es in den Ansätzen mit den Bakterien zu einer Vereinigung der phagozytierenden Populationen nach Inkubation über Nacht (s. Abb. 16 A+B: Die Populationen R2 bzw. R3 in Abb. 16 A bewegen sich im Dot Plot nach rechts oben bzw. links oben und vereinigen sich zu Population R3 in Abb. 16 B).

Betrachtet man die Fluoreszenz der EosFP E.coli-Bakterien in den einzelnen Populationen (s. Abb. 16 C-F), so ist zu sehen, dass bis auf ein paar Zellen in den Populationen, die rechts neben den Lymphozyten in den Ansätzen mit den Bakterien entstehen (Population R2 in Abb. 16 B), keine Degradation und folglich auch keine Phagozytose stattfindet (s. Abb. 16 D). Im Gegensatz zu den Lymphozyten, bei denen sich in Abb. 16 C noch 39,26% der Zellen im Lower Left befinden (die Zahl liegt bei den meisten anderen Proben höher), liegt bei dieser Population der Anteil der Zellen im Lower Left bei 0,09% (Abb. 16 D) und die Zellen liegen im Dot Plot im Upper Right rechts oben, sie adsorbieren also viele EosFP E.coli-Bakterien.

Im Gegensatz dazu phagozytieren und degradieren fast alle Zellen aus Population R3 (s. Abb. 16 E).

Da die Anzahl der Zellen im Lymphozytengate (Population R1 in Abb. 15 A) in den Kontrollen jeweils höher liegt als in den Ansätzen mit den Bakterien, ist davon auszugehen, dass es sich bei den Zellen der Population R3 in Abb. 15 D und den äquivalenten Zellen der anderen Proben um Lymphozyten (oder um Vorläufer anderer Zellen, die sich in der Kontrolle im Lymphozytengate befinden) handelt, die eine große Zahl von Bakterien oder verklumpte Bakterien adsorbieren.

Auffallend ist noch die im Vergleich zur Kontrolle große Anzahl an toten Zellen links unten in den Dot Plots in den Ansätzen mit den Bakterien (siehe Abb. 15 und 16). In Abb. 16 F ist die Fluoreszenz des Debris (R4) aus dem Dot Plot in Abb. 16 B dargestellt. Es zeigt sich, dass sich hier fast ausschließlich nicht degradierte Bakterien in oder an den Zellen befinden.

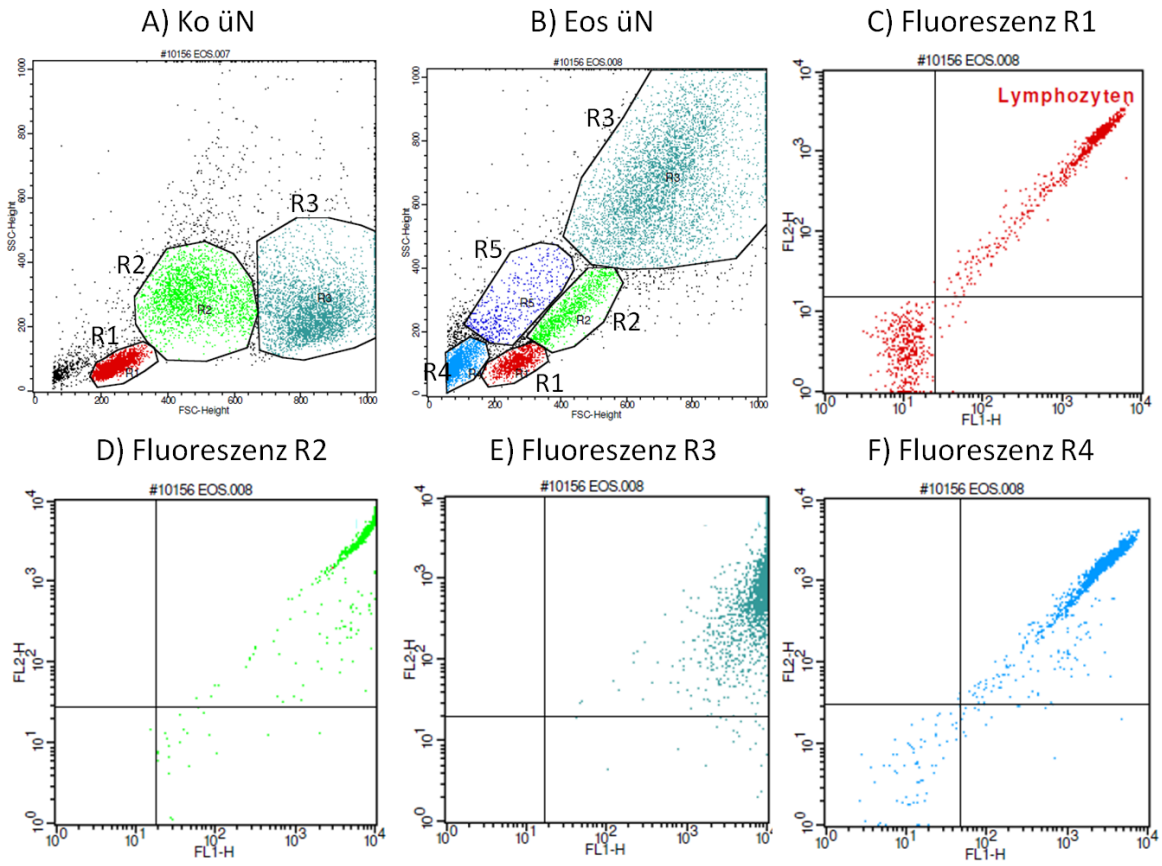


Abb. 16: Streudiagramme eines Intensivpatienten nach Inkubation über Nacht mit Darstellung der Fluoreszenz der Populationen R1, R2, R3 und R4 aus B (R4 = Debris / tote Zellen). Nur in Population R3 phagozytieren und degradieren fast alle Zellen die Bakterien. Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht, FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse; auf der x-Achse (FL1-H) wird die grüne Fluoreszenz von EosFP dargestellt, auf der y-Achse (FL2-H) die rote.

<u>Gruppe 4: Patientenproben nach Wechsel der Bakterien</u>

In diese Gruppe fallen 19 der 42 Proben von Intensivpatienten. Wie bei den Panels zeigt sich bis auf die Proben 10202 und 10244 in der Kontrolle (im Ansatz ohne Bakterien) nach Inkubation über Nacht eine Population rechts unten im Dot Plot (s. Abb. 17 B und 17 E). Bei 13 Patienten dieser Gruppe vereinigen sich die Populationen (abgesehen von den Lymphozyten) im Ansatz mit den Bakterien nach Inkubation über Nacht (s. Abb. 17 C). Bei den anderen 6 bleibt die Population rechts unten im Streudiagramm bestehen (s. Abb. 17 F). Außerdem treten bei 13 der Proben mengenmäßig kleine Granulozytenpopulationen auf.

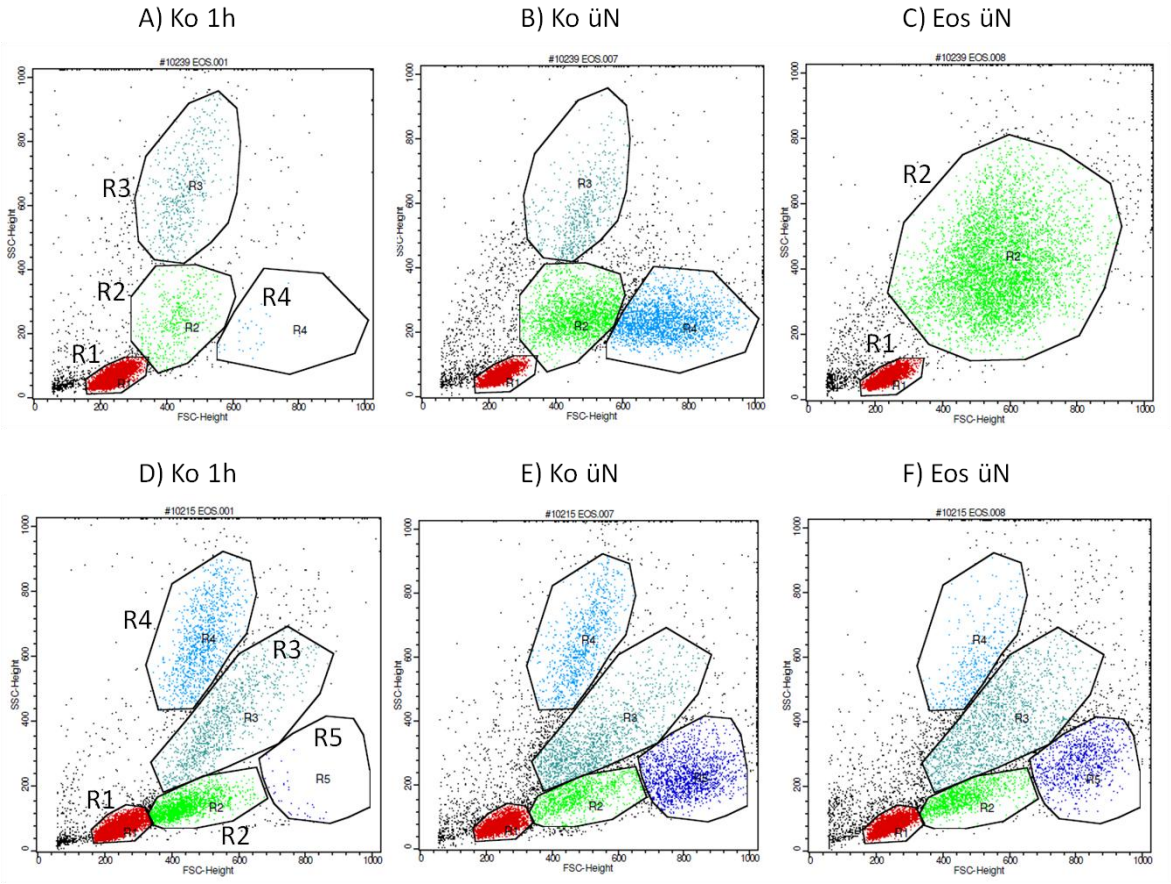


Abb. 17: Streudiagramm zweier Intensivpatienten nach 1h Inkubation und nach Inkubation über Nacht. A-C und D-F sind je einem Patienten zuzuordnen. Bei der Mehrheit der Proben dieser Gruppe kommt es nach Inkubation über Nacht im Ansatz mit den Bakterien zu einer Vereinigung der Populationen R2-R4 (A-C), während bei den restlichen Proben die Population rechts unten bestehen bleibt (D-F). Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. Ko=Kontrolle ohne Bakterien, Eos=Ansatz mit Bakterien, üN=über Nacht, FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height =Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Die Population R2 in Abb. 17 D-F stellt sich im Fluoreszenz-Dot Plot dar wie die Population R1 und ist daher als zweite Lymphozytenpopulation einzustufen (s. Abb. 18). Im Gegensatz zu Population R2 in Abb. 16 B (Anteil der Zellen im Lower Left in Abb. 16 D liegt bei 0,09%) bleibt hier über die Hälfte der Zellen im Lower Left. In dieser Gruppe tritt eine solche zweite Lymphozytenpopulation bei 9 Proben auf.

Anders als in Gruppe 3 ist bei den Proben in dieser Gruppe kein großer Unterschied in der Anzahl toter Zellen (Debris; im Dot Plot unten links) zwischen den Kontrollen und den Ansätzen mit den Bakterien festzustellen.

Eos 1h Fluoreszenz R1 Fluoreszenz R2

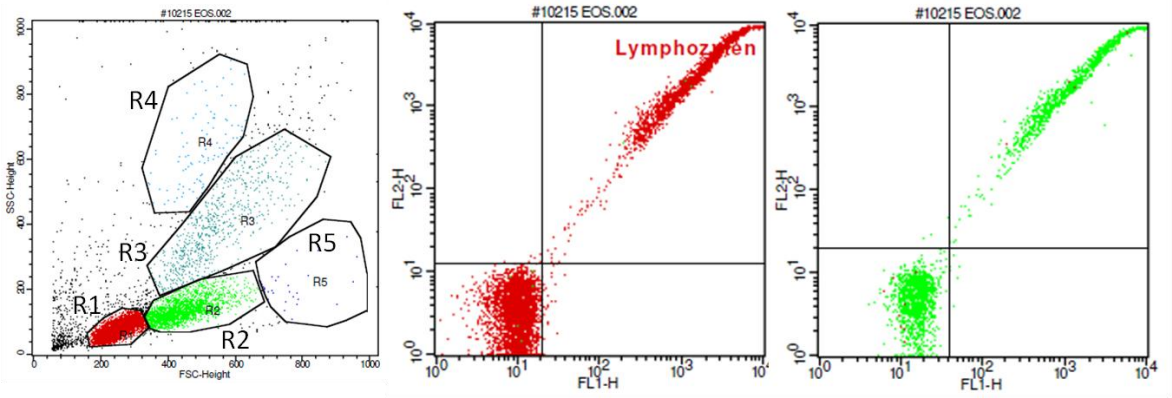


Abb. 18: Streudiagramm des gleichen Patienten wie in Abbildung 17 D-F nach 1h Inkubation mit Darstellung der Fluoreszenz der Populationen R1 und R2. Beide Populationen weisen fast identische Fluoreszenzeigenschaften auf. Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt. Eos=Ansatz mit Bakterien, FSC Height =Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse; auf der x-Achse (FL1-H) wird die grüne Fluoreszenz von EosFP dargestellt, auf der y-Achse (FL2-H) die rote.

3.1.5 Quantitativer Vergleich der Phagozytoseleistung

Um die Gruppen bezüglich ihrer Phagozytoseleistung quantitativ zu vergleichen wurden die X-Mean-Werte im "Upper Right", also im oberen rechten Quadranten des Fluoreszenz Dot Plots, verwendet. Diese Werte sind dimensionslos und entsprechen dem Mittelwert der Fluoreszenzwerte der gemessenen Zellen.

In den Gruppen 1, 3 und 4 wurde jeweils die Fluoreszenz der Monozytenpopulation verwendet. Nach den Inkubationszeiten können sich in diesen Populationen Zellen befinden, die beim letzten Messpunkt noch in einer anderen Population waren. Speziell nach Inkubation über Nacht kommt es bei den meisten Proben zu einer Vereinigung der Monozyten mit anderen Populationen (s. Abb. 17 B+C). In diesen Fällen wurde der Wert der aus mehreren Populationen entstandenen Population verwendet.

In Gruppe 2 wurden die X-Mean-Werte im Upper Right der unreifen neutrophilen Granulozyten herangezogen.

Bei den Panels sind die Werte der Monozyten der Patientin mit der großen Population an neutrophilen Granulozyten nur in Abb. 19 berücksichtigt.

In Gruppe 2 sind die 3 Proben, bei denen die Bakterien aus Gruppe 3 verwendet wurden, unberücksichtigt, da die Proben aus Gruppe 3 ein anderes Phagozytoseverhalten zeigen als die Proben , bei welchen die Bakterien ausgetauscht wurden.
Betrachtet man den Verlauf der X-Mean-Werte im Upper Right der einzelnen Proben der Gruppen 1-4 in Abb. 18, so zeigt sich ein heterogenes Bild.

In allen Gruppen erkennt man, dass die Werte bei den Inkubationszeiten von 1h, 3h und 6h eine große Varianz zeigen, während nach Inkubation über Nacht in den Gruppen 1 und 2 jeweils 6 der 8 Proben ähnliche hohe Werte haben. Auch in Gruppe 4 zeigt sich nach Inkubation über Nacht eine im Vergleich zu den Messwerten der anderen Inkubationszeiten kleine Varianz.
In Gruppe 3 hingegen ist nach Inkubation über Nacht keine Annäherung der Werte zu beobachten. Hier liegen die Kurven relativ horizontal und parallel zueinander. Die Werte nach Inkubation über Nacht liegen zum Teil unter denen nach 1h Inkubation, während sämtliche Kurven der anderen Gruppen nach Inkubation über Nacht einen höheren Wert haben als nach einer Stunde Inkubationszeit.

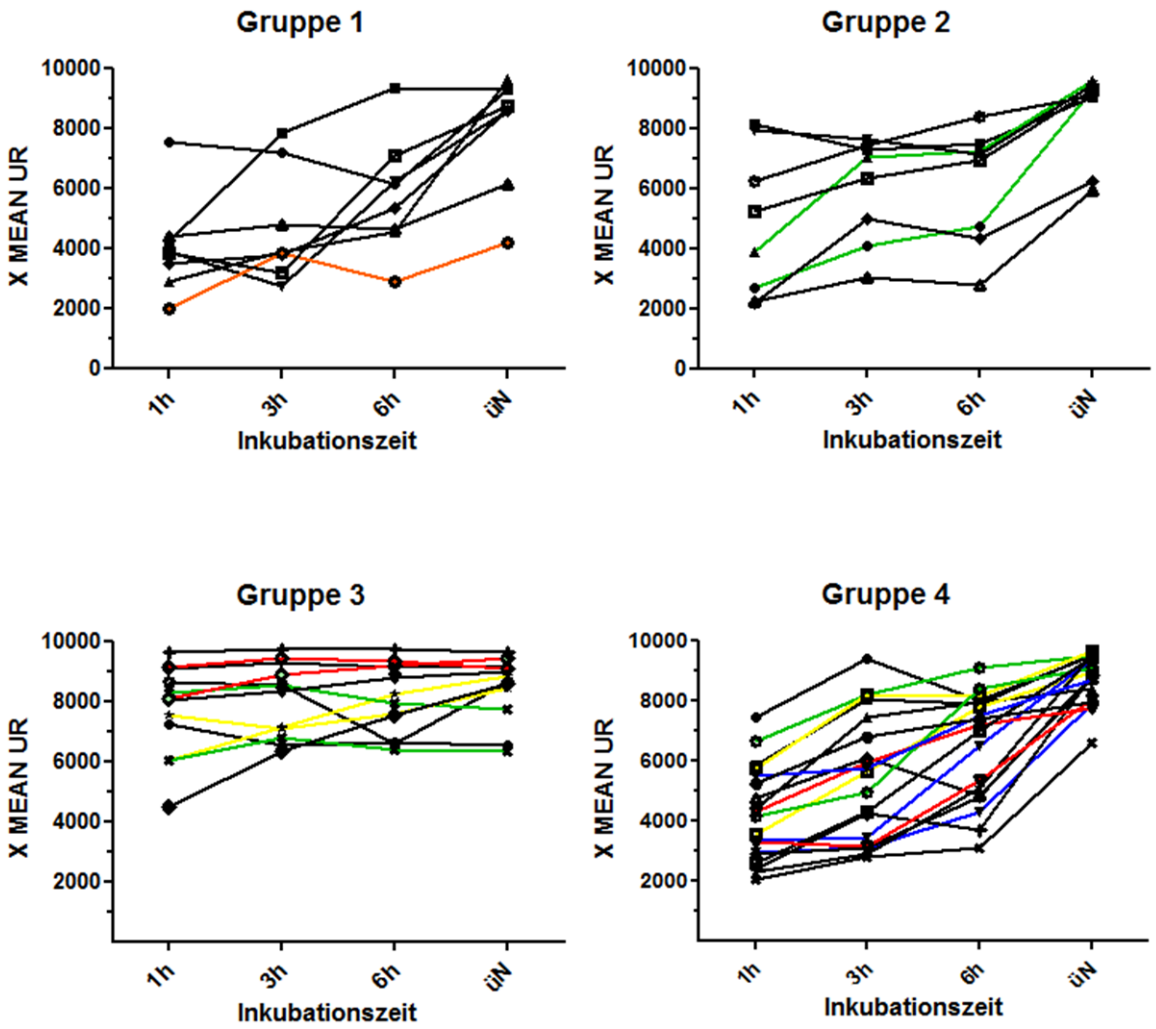


Abb. 19: Entwicklung der Aufnahme der EosFP E.coli (Eos Fluorescent Protein Escherichia coli)-Bakterien in den Gruppen 1-4 zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Jede Kurve entspricht einer Probe. Die farblich hervorgehobene Kurve in Gruppe 1 entspricht der Probe mit den unreifen neutrophilen Granulozyten. Die Proben, die in den Abbildungen 2-4 die gleiche Farbe haben, stammen innerhalb der jeweiligen Gruppe vom gleichen Patienten. X Mean UR (Upper Right) entspricht dem Mittelwert der grünen Fluoreszenz im oberen rechten Quadranten der Fluoreszenz-Dot-Plots. üN=über Nacht.

Abbildung 20 zeigt die X-Mean-Werte im Upper Right der Proben der Gruppen 2-4 im direkten Vergleich mit den Panels.

Betrachtet man die Mediane der X-Mean-Werte im Upper Right der Gruppen 1-4 zu den verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation im Vergleich, so sieht man, dass die Werte nach Inkubation über Nacht sehr nahe zusammen liegen.

Nach 1h Inkubation liegen auch die Werte der Gruppen 1, 2 und 4 nahe zusammen, wobei der Median der X-Mean-Werte von Gruppe 3 deutlich höher liegt. Nach einer Inkubationszeit von 3h ist die Varianz der Werte am größten.

In Gruppe 4 liegen die Werte bei den jeweiligen Inkubationszeiträumen stets über denen der Panels, wobei die Werte nach 1h Inkubation und nach Inkubation über Nacht die kleinste Differenz aufweisen.

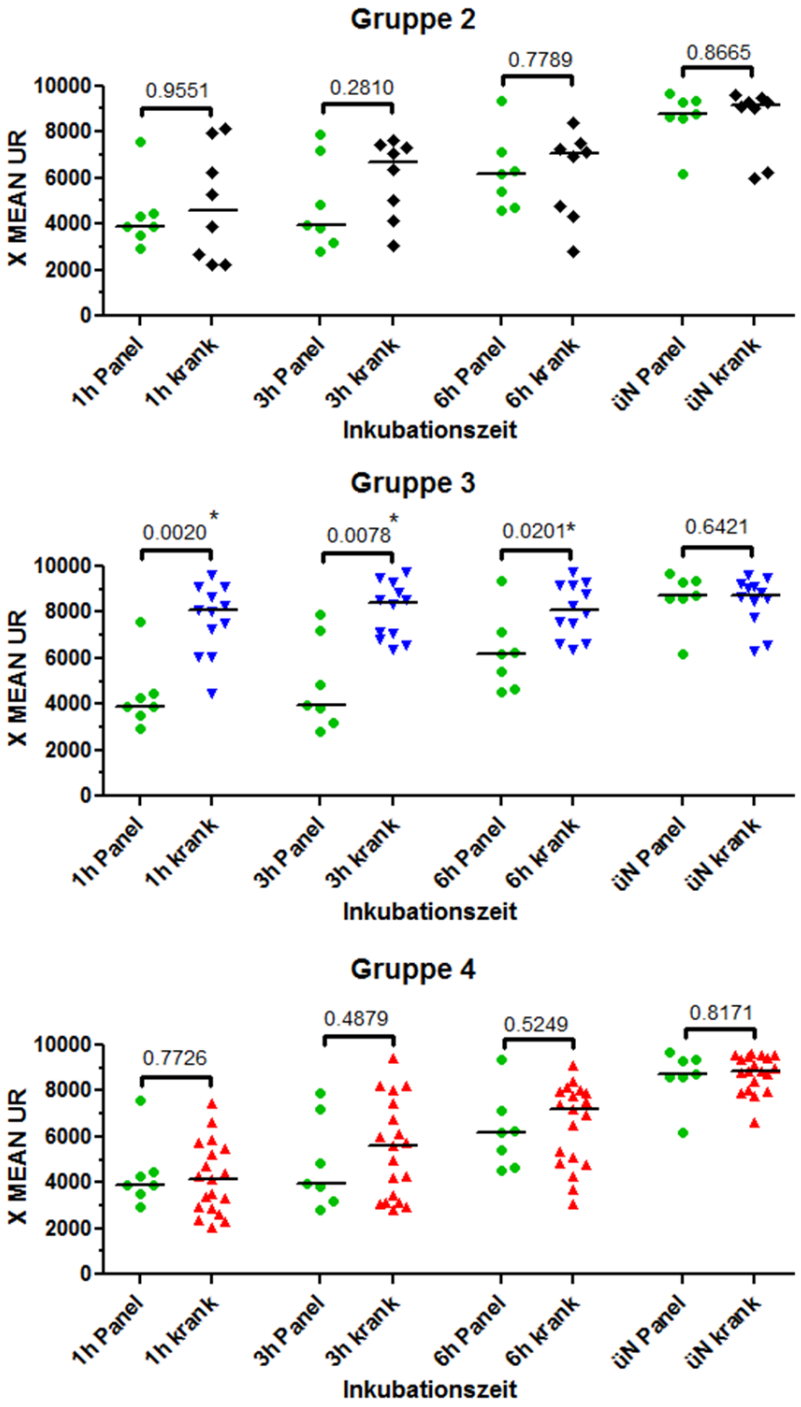


Abb. 20: Phagozytoseleistung (X-Mean-Werte im Upper Right der Fluoreszenz-Dot-Plots) der Gruppen 2-4 jeweils im Vergleich zu den Panels (gesunde Kontrollen, grün dargestellt). Schwarz: Gruppe 2, blau: Gruppe 3, rot: Gruppe 4. Werte der dargestellten Mediane nach 1h, 3h, 6h und nach Inkubation über Nacht (üN) (Grupppe 1 = Panels):

Gruppe 1: 3895, 3928, 6144, 8742; *Gruppe 2: 4573, 6697, 7047, 9184*

Gruppe 3: 8061, 8426, 8106, 8740; *Gruppe 4: 4149, 5625, 7172, 8851*

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit einem Sternchen hinter dem p-Wert gekennzeichnet.

3.1.6 Immunphänotypisierung

Um die Populationen der isolierten mononukleären Zellen zu verifizieren wurde eine Probe eines Panels nach Inkubation über Nacht immunphänotypisch analysiert.

Abb. 21 zeigt in den Streulicht-Dot-Plots die "gegateten" Populationen R1-R4 sowie exemplarisch für R1 (C-E) und R2 (F-H) Ergebnisse der Isotyp-Kontrolle (C+F) und der Antikörper CD95 sowie HLA-DR.

In Tabelle 2 sind die Prozentwerte der Zellen aus den Gates R1-R4 angegeben, die im Vergleich zur Negativkontrolle (Isotypkontrolle) positive Immunfluoreszenz aufweisen.

Die Antikörper CD14, CD45 und CD303 wurden im Ansatz mit den Bakterien nicht verwendet. Die Population R4 wurde nur im Kontrollansatz als Population gewertet.

Die Antikörper CD304, CD95 und CD123 weisen im Ansatz mit den Bakterien in den Populationen R2 und R3 deutlich höhere Werte von Zellen mit positiver Immunfluoreszenz auf als im Kontrollansatz. Für CD304 liegt der Anteil von positiv gewerteten Zellen in der Population R3 im Ansatz mit den EosFP E.coli-Bakterien mehr als doppelt so hoch.

Abb. 21 E+H zeigt Fluoreszenz-Dot-Plots von Testansätzen mit EosFP E.coli-Bakterien. Hier kann man ablesen, wie viele der für den entsprechenden Antikörper (hier HLA-DR) positiven Zellen auch Bakterien phagozytiert haben. Diese Zellen befinden sich dann im oberen rechten Quadranten des Dot-Plots.

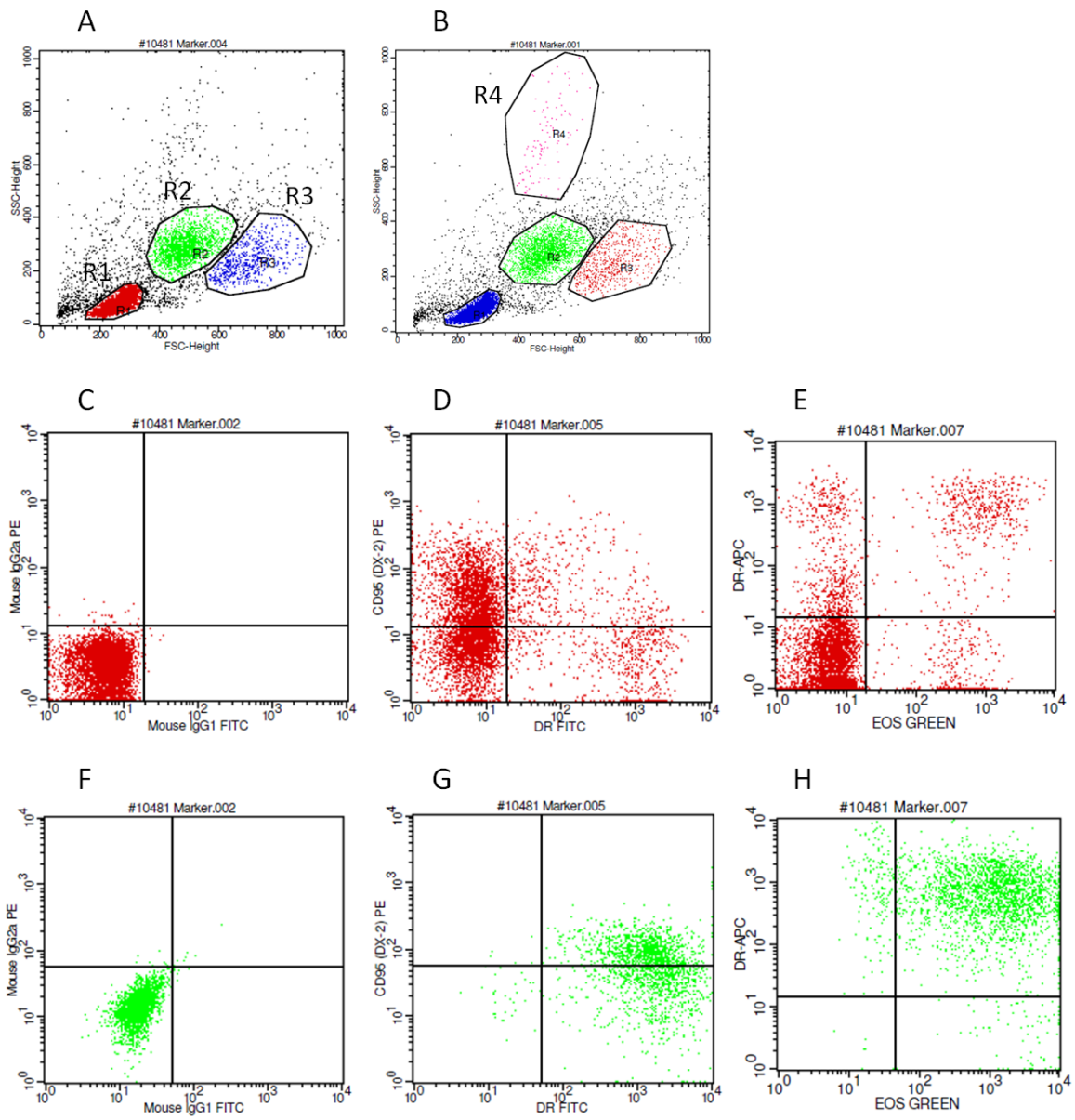


Abb. 21: Streulicht-Dot-Plots (A+B) und Fluoreszenz-Dot-Plots (C-H) der Probe, die nach Inkubation über Nacht immunphänotypisch untersucht wurde.

Die Dot-Plots C-E zeigen Ergebnisse der Isotyp-Kontrolle und der Antikörper CD95 sowie HLA-DR der Population R1 aus Dot-Plot A.

Die Dot-Plots F-H zeigen Ergebnisse der Isotyp-Kontrolle und der Antikörper CD95 sowie HLA-DR der Population R2 aus Dot-Plot A.

Dot-Plot B zeigt die Population R4.

Die Zellen, die sich im Vergleich zur Kontrolle aus dem unteren linken Quadranten heraus nach oben oder rechts bewegen tragen den entsprechenden Antikörper auf ihrer Oberfläche.

Die Farben in den Dot Plots wurden lediglich zur besseren Unterscheidung der Populationen gewählt.

FSC Height=Vorwärtsscatter auf der x-Achse; SSC Height=Seitwärtsscatter auf der y-Achse.

Tabelle 2: Prozentangabe der Zellen aus den Gates R1-R4 (Abb.21), die im Vergleich zur Negativ-kontrolle (Isotypkontrolle) positive Immunfluoreszenz aufweisen. In Klammern in der linken Spalte ist der Anteil der sich im jeweiligen "Gate" befindlichen Zellen von der Gesamtzahl der gemessenen Zellen angegeben. Im Testansatz mit den Bakterien ist in Klammern der Anteil der Zellen angegeben, die für den entsprechenden Antikörper positiv sind und die auch Bakterien phagozytiert haben.

Positive Zellen in den Gates R1-R4 im Kontrollansatz (ohne Bakterien)								
	CD14	HLA-DR	CD45	CD337	CD303	CD304	CD95	CD123
R1(54%)	4,55%	17,66%	99,10%	2,72%	0,41%	0,63%	49,02%	1,59%
R2(22%)	84,01%	97,95%	97,36%	1,13%	0,66%	30,60%	55,36%	63,44%
R3(7%)	59,42%	98,50%	93,07%	1,00%	0,83%	25,87%	54,50%	58,56%
R4(1%)	13,79%	17,46%	85,34%	4,85%	9,71%	3,88%	64,28%	11,90%
Positive Zellen in den Gates R1-R3 im Testansatz mit den Bakterien								
	CD14	HLA-DR	CD45	CD337	CD303	CD304	CD95	CD123
R1(56%)		18,50% (8,14%)		2,16% (0,02%)		0,17% (0,02%)	43,40% (4,66%)	1,99% (0,83%)
R2(26%)		96,63% (90,18%)		1,93% (1,89%)		47,70% (44,18%)	76,29% (72,69%)	85,20% (80,28%)
R3(3%)		96,83% (92,09%)		3,56% (3,26%)		61,37% (57,39%)	81,73% (72,60%)	87,41% (80,99%)

3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie erschienen die nicht phagozytierten EosFP E.coli-Bakterien bei Anregung mit 450-490 nm und einer FT (Farb-Teiler) 510 nm und LP (Lang-Pass) 520 nm Filterkombination orange, während phagozytierte EosFP-E.coli-Bakterien grünes Fluoreszenzlicht emittieren.

Analog zu den Ergebnissen der FACS-Untersuchungen lassen sich also auch fluoreszenzmikroskopisch durch die Farben des emittierten Fluorsezenzlichtes Rückschlüsse darauf ziehen, ob die EosFP E.coli-Bakterien sich außerhalb oder innerhalb des Phagozyten befinden.

Abb. 22 aus einer Arbeit von Schreiner et al. [53] zeigt Phagozyten während der Phagozytose von EosFP E.coli-Bakterien (a: Standardfluoreszenzmikroskopie, b: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie).

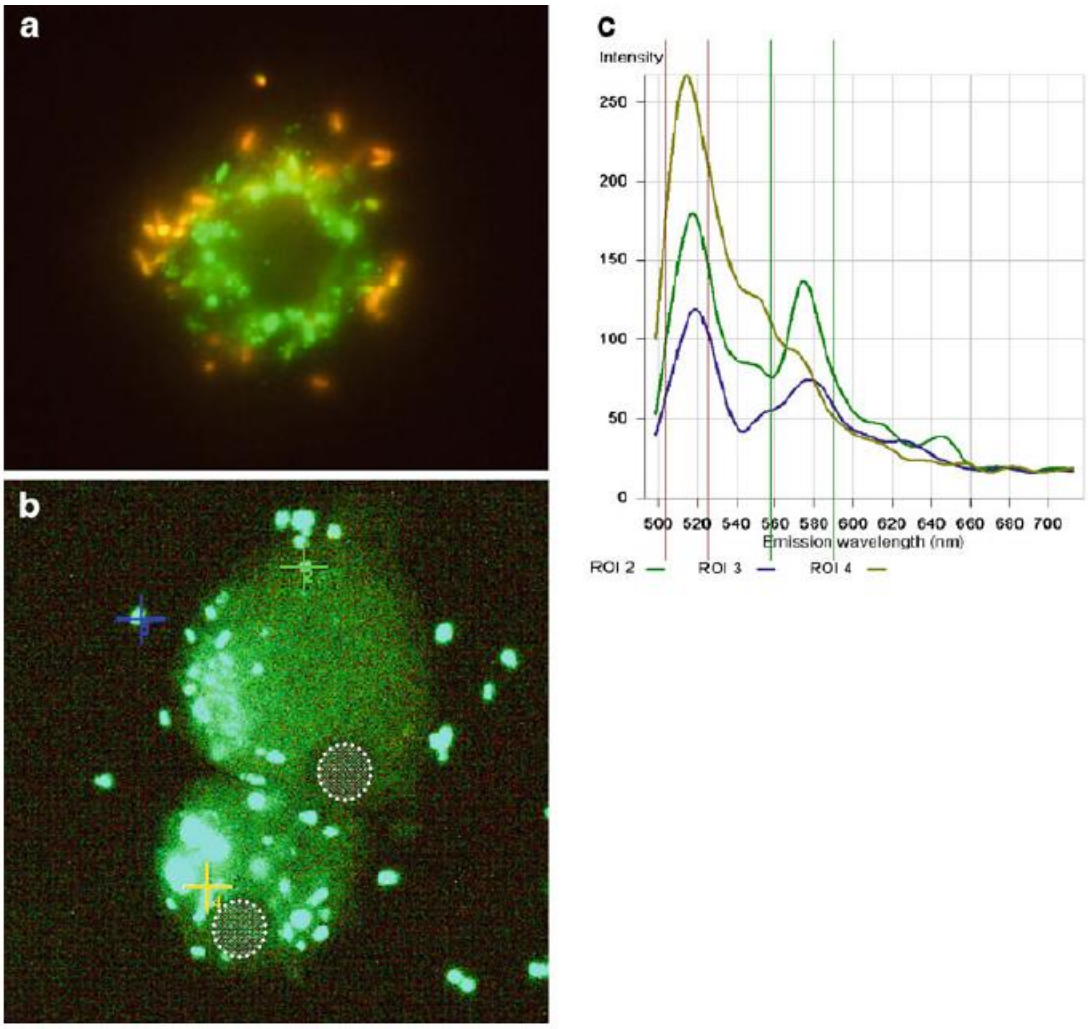


Abb. 22 [53]:

a) Fluoreszenzbild von Phagozyten nach 3 stündiger Phagozytose von EosFP E.coli (Eos Fluorescent Protein Escherichia coli)-Bakterien. Standardimmunfluoreszenzmikroskopie mit einer Anregung von 450-490 nm und einer FT (Farb-Teiler) 510 nm und LP (Lang-Pass) 520 nm Filterkombination sowie einem 63x Ölimmersionsobjektiv. Die außen gelegenen, orange erscheinenden Bakterien wurden gerade erst phagozytiert und leuchten grün und rot. Die phagozytierten Bakterien, die sich im Phagolysosom befinden, sind teilweise abgebaut und leuchten nur noch grün.

b) Mittels "Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie" erzeugtes Bild (Zeiss LSM510 Meta, 63x Ölimmersionsobjektiv) und Spektralanalyse einzelner Bereiche (Regions of intersest , "ROI"), durch farbige Kreuze markiert: ROI2-grün, ROI3-blau, ROI4-gelb. Die Zellkerne der Phagozyten sind durch gepunktete Kreise markiert.

c) Die Spektralanlyse von ROI2 (grün) zeigt 2 Spitzen von emittiertem Fluoreszenzlicht bei ≈515 nm und bei ≈575-580. ROI3 (blau) zeigt die gleichen Spitzen bei 515 nm und 580 nm, jedoch ist die Spitze bei 580 nm schwächer. ROI4 (gelb) zeigt nur bei 515 nm eine Fluoreszenzemission.

4 Diskussion

4.1 Zellpopulationen nach Ficoll-Gradient und deren anteilmäßige Verteilung

Bei Begutachtung der Streulicht-Dot-Plots der isolierten mononukleären Zellen ist festzustellen, dass sich je nach Patient mehr oder weniger Zellen am oberen oder rechten Rand ansammeln. Durch Ändern der "Instrument Settings" (Ändern der angelegten Spannung) am FACSCalibur lassen sich die Positionen der gemessenen Zellen innerhalb des Dot-Plots verschieben. Die Messung der gleichen Probe mit unterschiedlichen "Instrument Settings" (s. Abb. 5) zeigt durch entsprechendes "Gaten", dass die gemessenen Zellen den Dot-Plot nicht verlassen und Populationsgröße sowie Fluoreszenzwerte unbeeinflusst sind. Da die Populationen besser voneinander abzugrenzen sind, wenn sie sich im Dot-Plot auf einen größeren Bereich verteilen, wurde in Kauf genommen, dass sich manche Zellen am Rand ansammeln und deren genaue Position so nicht ersichtlich ist.

Die Morphologie von reifen Monozyten im peripheren Blutkreislauf ist heterogen. Sie variieren in der Größe, im Ausmaß der Granularität und haben unterschiedliche Zellkern-morphologien, was bei starken Abweichungen zu Verwechslungen mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und DCs führen kann [22]. Allein morphologisch oder durch Streulichteigenschaften sind sie schwer von den soeben genannten Zellen zu unterscheiden [1].
Um die Populationen der isolierten mononukleären Zellen zu verifizieren wurde eine Probe eines Panels nach Inkubation über Nacht immunphänotypisch analysiert (Ergebnisse siehe Tabelle 2). Durch die Expression von HLA-DR konnten die Monozyten nachgewiesen werden. Bei der Population, die bei vielen Proben rechts neben der Monozytenpopulation auftritt (s. Population R3 in Abb. 22 A) handelt es sich ebenfalls um Monozyten, allerdings mit einer niedrigeren Expression von CD 14. Diese Population enthält reifere Zellen als die linke Monozytenpopulation. In diesen

Monozytenpopulationen sind auch dendritische Zellen enthalten. Es ist gezeigt worden, dass sich Monozyten in vitro und in vivo in dendritische Zellen differenzieren können [68]. Die Zellen der Population R4 in Abbildung 22 B konnten durch die Expression von CD14 und CD45 als Granulozyten identifiziert werden. Die Expression von CD45 ist auf Granulozyten typischerweise geringer als auf Monozyten. Bei den Monozyten war im Bakterienansatz die Expression von CD95 im Vergleich zum Ansatz ohne Bakterien erhöht. CD95 ist ein TNF-Rezeptor, der nach Ligandenbindung die Apoptose der betreffenden Zelle initiiert. Gille et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Oberflächenexpression von CD95 durch die Phagozytose von E.coli-Bakterien nicht beeinflusst wird, sich jedoch der intrazelluläre Anteil von CD95L signifikant erhöht [20].

Unter den mononukleären Zellen liegen Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) üblicherweise im Bereich von 70-90%, Monozyten bei 10-30% und dendritische Zellen nur bei 1-2%. Bei den Zellpopulationen, die mittels Ficoll-Gradient aus den 50 untersuchten Proben isoliert wurden, gibt es hinsichtlich Vorkommen und anteilmäßiger Verteilung große Unterschiede (s. Abb. 6). Auch kommt es während der Inkubationszeit durch die Differenzierung von Zellen zu einer anteilsmäßigen Verschiebung innerhalb der "Gates"(s. Abb. 10).

Bei den Intensivpatienten war der Anteil toter Zellen (Debris in Abb. 6) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht. Auffallend ist vor allem die große Anzahl toter Zellen bei den Proben mit den Bakterien in Gruppe 3. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen: Bei Sepsispatienten (bei den untersuchten Intensivpatienten liegt SIRS oder Sepsis vor) ist die Anzahl apoptotischer Zellen, vor allem von Lymphozyten, dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen, erhöht [3, 20, 49].

In einer Studie von Hoser et al. war die Anzahl der Lymphozyten bei Sepsispatienten kleiner als die der gesunden Kontrollen. Bei den Monozyten hingegen war die Anzahl je nachdem, ob die Sepsis intraabdomineller Herkunft war oder von einer Pneumonie herrührte, erhöht (intraabdominelle Herkunft) oder ein wenig niedriger (Pneumonie) als die Anzahl der Kontrollen [28].

Bei den hier untersuchten Intensivpatienten war der Anteil der mononukleären Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Als Reaktion auf inflammatorische Reize steigern Monozyten ihre proliferative Aktivität im Knochenmark, was sich klinisch an einer erhöhten Anzahl von zirkulierenden Monozyten widerspiegelt [64].

Van den Akker et al. untersuchten die Reinheit von mittels Ficoll isolierten mononukleären Zellen von Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei den Sepsispatienten enthielt die Interphase im Vergleich zu den Kontrollen wegen einer hohen Kontamination mit Granulozyten (48-89%) einen niedrigen Anteil mononukleärer Zellen (11-52%). Die Kontrollen hingegen wiesen einen hohen Anteil mononukleärer Zellen von 88-100% auf (Granulozyten 0-12%). Das folge aus einer reduzierten Anzahl von Lymphozyten bei Sepsis sowie einem Anstieg der Wanderung von Granulozyten in die Interphase. Des Weiteren zeigte sich, dass sich diese Granulozyten aus unreifen Formen(4-21%: stabkernige neutrophile Granulozyten und Myelozyten) und aus polymorphonukleären Granulozyten zusammensetzen. Bei den gesunden Kontrollen wurden keine unreifen Formen gefunden [60]. In einer Studie von Taneja et al. hatten Sepsispatienten trotz normaler Leukozytengesamtzahl durchschnittlich einen Anteil von 39% unreifer neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu weniger als 5% bei den gesunden Kontrollen [57]

Bei Stress oder während einem Infekt gelangen unreife neutrophile Granulozyten in den Blutkreislauf. Dies wird als Linksverschiebung bezeichnet, einem erhöhten Verhältnis von unreifen Granulozyten zur Gesamtmenge an Granulozyten [8]. Die Anzahl unreifer Granulozyten wurde auch als Hinweis auf Sepsis beschrieben. Es wurde aufgezeigt, dass der DNI (delta neutrophil index), der den Anteil unreifer Granulozyten im Blutkreislauf widerspiegelt, mit dem Schweregrad der Sepsis bei Intensivpatienten korreliert [38, 45, 46].

Normalerweise sind im peripheren Blut von Gesunden keine unreifen Granulozyten vorhanden [60]. Bei der Blutprobe der gesunden Kontrolle mit der großen Granulozytenpopulation liegt folglich eine Linksverschiebung vor. Es handelt sich also um unreife (stabkernige) neutrophile Granulozyten und zum Zeitpunkt der Blutabnahme lag höchstwahrscheinlich ein Infekt vor.

Ein Nachteil beim Vorgehen, die Zellpopulationen nach Streulichteigenschaften bei der FACS-Messung zu bestimmen, ist die Beobachtung, dass ein Teil der Monozytenpopulation im Lymphozytengate zu finden ist und sich ein Teil der Lymphozyten (aktivierte T-Zellen) im Monozytengate befindet [67]. Unter pathologischen Bedingungen kann ein erheblicher Anteil der Partikel mit Lymphozytengröße erythroider oder nicht-lymphoider Herkunft sein [2].

Bei den 10-20% der gesamten Zellen, die während der Inkubationszeit zwischen den beiden letzten Messpunkten (nach 6 h und über Nacht) vom "Lymphozytengate" ins andere "Gate" wandern handelt es sich wohl um unreife Monozyten, die durch entsprechende Differenzierung an Größe und Granularität zunehmen. Analog zu einer Studie von Rothe und Valet wird das Zellvolumen der Lymphozyten durch die Inkubation mit Bakterien nicht beeinflusst [50].

Wie bereits unter 3.1.4 erwähnt handelt es sich in Gruppe 3 bei den Populationen, deren Zellen sich in den Ansätzen mit den Bakterien in den Streulicht-Dot-Plots auf einer Diagonalen rechts oberhalb der Lymphozyten verteilen, um Zellen aus dem Lymphozytengate, die eine große Zahl von Bakterien oder verklumpte Bakterien adsorbieren. Durch die damit verbundene gleichzeitige Zunahme von Größe und Granularität kommt es dann zu dieser Anordnung der Zellen. Es ist anzunehmen, dass die im Vergleich zur Kontrolle große Anzahl an toten Zellen in dieser Gruppe (R4 in Abb. 16 B) aus der Adsorption der verklumpten Bakterien dieser Zellen resultiert, da sich im Debris als auch in den Zellen, die sich rechts neben der Lymphozytenpopulation befinden, vergleichbare Fluoreszenz-Dot-Plots zeigen (siehe Abbildung 16 D + F).

Der Grund für die Verklumpung der Bakterien liegt wohl an der Präparation von EosFP E.coli. Vielleicht wurde die Formalin-Fixierung nicht ausreichend inaktiviert oder vor der Fixierung wurde nicht gut resuspendiert.

4.2 Patientenkollektiv und Gruppeneinteilung

In der vorliegenden Arbeit wurden 42 Blutproben von Intensivpatienten der Sektion Operative Intensivmedizin der Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Ulm untersucht. Alle Intensivpatienten litten an einem SIRS oder einer Sepsis. Weiterhin wurden die Blutproben von 8 gesunden Spendern untersucht. Im Unterschied zu Untersuchungen, die an Vollblut durchgeführt wurden (Schreiner et al. [53], Schreiner Dissertation (eingereicht) [52]), wurden hier mittels Ficoll isolierte mononukleäre Zellen für den Phagozytoseassay eingesetzt. Damit konnte die Phagozytosefunktion von isolierten Zellen untersucht werden und es ist davon auszugehen, dass Plasmaproteine weder positive noch negative Effekte bewirken. Hierbei könnte es sich um Pathogen-spezifische Antikörper handeln, welche Fc-Rezeptor-spezifische Effekte vermitteln [25, 41, 58]. Im Unterschied zum Vollblutassay lag der Schwerpunkt der hier durchgeführten

Untersuchungen auf der Analyse von Monozyten und dendritischen Zellen. Dendritische Zellen exprimieren die Immunkomplexrezeptoren nicht, sondern nur den monomeren FcR CD64, wohingegen Monozyten für CD64 aber auch für die Immunkomplexrezeptoren CD16 und CD32 positiv sind. Demnach ist für dendritische Zellen kein Einfluss durch Plasmaproteine zu erwarten.

Es wurden 2 Versuchsreihen mit unterschiedlichen EosFP-Bakterienpräparationen durchgeführt. In der ersten Serie waren die Bakterien z.T. verklumpt, in der zweiten Serie lagen die EosFP-Bakterien als saubere Zellsuspension vor. Die Ergebnisse der ersten Serie zeigten einen relativ hohen Anteil toter Zellen nach Durchlaufen des Phagozytoseassays. Grundsätzlich kann die Phagozytose auch zur Apoptose der Phagozyten führen [13]. Nach mikroskopischer Analyse war zu beobachten, dass die Phagozyten die Bakterien z.T. nur gebunden hatten und eine echte Phagozytose nicht stattgefunden hatte. Diese Tatsache erklärt auch das Streulichtbild, in dem die Zellen in einer Diagonalen angeordnet waren (s. Abb. 15 D). Zudem lassen sich dadurch die hohen Fluoreszenzwerte bereits nach 1 Stunde Inkubation in Gruppe 3 erklären. Wenn man nach dem Phagozytoseassay einen Farbstoff zugesetzt hätte, welcher die Fluoreszenz entsprechend quencht, dann tragen nur die wirklich aufgenommenen Partikel zum Fluoreszenzsignal bei [42].

In den Streulicht-Dot-Plots der Ansätze mit den Bakterien der zweiten Serie wurden Zellen von Intensivpatienten sowie die der gesunden Spender mit denselben EosFP E.coli-Bakterien durchgeführt. Die Ergebnisse wurden aufgrund der Zusammensetzung der mononukleären Zellen in 4 Gruppen eingeteilt (s. unter 2.1.1).

Diese Einteilung unterscheidet die Zusammensetzung der isolierten Zellen (Lymphozyten, Monozyten/dendritische Zellen, unreife neutrophile Granulozyten, kontaminierte reife Granulozyten), die sich bei der Auswertung der Streulicht-Dot-Plots zeigte, um die Phagozytoseleistung quantitativ vergleichen zu können. Mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsscatters konnte die individuelle Phagozytoseleistung der einzelnen Populationen unterschieden werden. Im Unterschied zu anderen experimentellen Ansätzen (z.B. Oda et al., FITC E.coli [43]) kann bei dem hier angewandten Testsystem genau unterschieden werden, ob und wann die phagozytierten Bakterien im Phagolysosom verdaut werden. Weiterhin kann aufgrund der Zunahme des Vorwärtsscatters eine Aussage über die Menge der phagozytierten Partikel gemacht werden. Bei extrem starker Phagozytose-

und Verdauaktivität muss dann auch mit einer Abnahme der Größe der Phagozyten (=Abnahme des Vorwärtsscatters) zu rechnen sein (s. Abb. 7).

Grundsätzlich wäre aufgrund der Gruppeneinteilung eine Unterscheidung der Phagozytose- und Verdauleistung der einzelnen Leukozytensubpopulationen leicht möglich. Nach 24 Stunden Inkubation zeigt sich aber eine Verschmelzung der einzelnen Populationen und die physikalischen Eigenschaften (Scatteranalyse) lassen sich nicht mehr trennen. Die einzige Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, besteht in der Verwendung von Oberflächenmarkern für Differenzierungsantigene (s. Abb. 22, Tab. 2).

4.3 Phagozytose und Degradation der EosFp E.coli-Bakterien im Streulicht- und Fluoreszenz-Dot-Plot

Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Messung der isolierten Zellen lässt sich in den Streulicht-Dot-Plots nach einer bestimmten Inkubationszeit, insbesondere zum Messpunkt nach Inkubation über Nacht, das Auftreten neuer Populationen beobachten. Grund hierfür ist die Differenzierung unreifer Zellen in einen stärker spezialisierten Zustand. Durch die damit verbundene Veränderung der Zellgröße und Granularität entstehen so nach den Inkubationszeiträumen neue Zellpopulationen, deren Zellen sich zu Beginn der Inkubationszeit bei der Messung im Dot Plot noch in einem anderen "Gate", also einer anderen Population befinden.

Im Testansatz mit den Bakterien ist eine Verschiebung der Populationen und einzelner Zellen zu beobachten. Diese Verschiebung resultiert aus der Phagozytose der Bakterien und der damit verbundenen Änderung der Zellgröße sowie der Granularität. Während sich die Monozytenpopulation, die schon zum Messpunkt nach 1 Stunde da war, durch die Phagozytose der Bakterien nach rechts (Vorwärtsscatter ↑)und oben (Seitwärts-scatter ↑) bewegt, bewegen sich die reiferen Monozyten, die erst nach Inkubation über Nacht hinzukamen, leicht nach links (Vorwärtsscatter ↓) und oben (Seitwärtsscatter ↑). Das heißt, dass die reiferen Monozyten eher an Größe verlieren, während die anderen an Größe zunehmen.

In Untersuchungen von Rothe und Valet nahm das Zellvolumen von neutrophilen Granulozyten durch die Inkubation mit Bakterien deutlich zu, während das Volumen von Lymphozyten unverändert blieb [50]. Gille et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die

erkennbaren morphologischen Veränderungen nach der Inkubation von Monozyten mit Bakterien, bezogen auf eine Abnahme der Größe und eine Zunahme der Granularität, ähnlich waren wie die morphologischen Eigenschaften von apoptotischen Zellen [19].

Bei den Fluoreszenz-Dot-Plots verteilen sich die Zellen, die EosFP E.coli-Bakterien phagozytiert haben, wie erwartet auf einer Diagonalen im "Upper Right". Je weiter rechts und weiter oben auf dieser Diagonalen sich die Zellen befinden, desto mehr fluoreszierende Bakterien wurden phagozytiert. Nach Verringerung des ph-Wertes durch die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen kommt es nach und nach zu einem Verlust der roten Fluoreszenz der EosFP E.coli-Bakterien. Da die grüne Fluoreszenz säurestabil ist [13, 53, 61], wandern die Zellen folglich in den Fluoreszenz-Dot-Plots im Idealfall von der Diagonalen in einem Winkel von 45° nach unten. Durch proteolytischen Abbau dar phagozytierten Bakterien sowie der EosFP-Proteine reduziert sich schließlich die grüne Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz der EosFP E.coli-Bakterien wies unabhängig von der Population (Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten) vor und nach Wechsel der Testbakterien kleine charakteristische Unterschiede auf (s. Abb. 9). Da sich diese Fluoreszenz-charakteristika bei allen Populationen und Proben jeweils vor und nach Wechsel der Bakterien zeigte, muss die Ursache in der Präparation von EosFP E.coli-Bakterien, liegen. Am wahrscheinlichsten ist wohl ein Fehler bei der Fixierung (s. oben).

Nach Inkubation über Nacht befinden sich in den Fluoreszenz-Dot-Plots der "Monozytengates" bei den Ansätzen mit den Bakterien fast keine Bakterien mehr auf der Diagonalen. Daraus lässt sich folgern, dass sich keine oder zumindest wenige adhärente Bakterien auf den Zelloberflächen befinden.

Bei den Lymphozyten hingegen sieht man zu allen Messpunkten zwischen 10-25% der "gegateten" Lymphozyten auf einer Diagonalen im "Upper Right" der Fluoreszenz-Dot-Plots, während die restlichen Lymphozyten im "Lower Left" bleiben. Bei den Zellen im "Upper Right" ist auch nach Inkubation über Nacht kein Verlust der roten Fluoreszenz zu beobachten. Man hat herausgefunden, dass sich Bakterien reproduzierbar an Lymphozytensubpopulationen binden [59]. Beruhend auf der Adhärenz von Bakterien wurden Lymphozytensubpopulationen identifiziert [11, 55].

Die Emission der grünen Fluoreszenz von EosFP wird solange aufrechterhalten, bis das Protein vollständig abgebaut ist. Da sich in allen Ansätzen mit den EosFP E.coli-Bakterien

nach Inkubation über Nacht bei den phagozytierenden Zellen(Monozyten, dendritische Zellen und Granulozyten) so gut wie keine Zellen im "Lower Left" (Bereich des Fluoreszenz-Dot-Plots, in dem sich die nicht fluoreszierenden Zellen aufhalten) befinden, findet während der Inkubationszeit auch kein vollständiger Abbau des EosFP-Proteins statt (da sich nach Inkubation über Nacht kaum noch Zellen auf der Diagonalen der Fluoreszenz-Dot-Plots befinden, werden nach dieser Zeit auch keine oder wenn dann nur wenige Bakterien phagozytiert).

Dadurch, dass es insbesondere zum Messzeitpunkt nach Inkubation über Nacht zu einer Verschiebung von Zellen aus dem Lymphozytengate ins Monozytengate und einer Differenzierung von Zellen (s. Abb. 10) kommt, entspricht die Darstellung der Phagozytose in den Fluoreszenz-Dot-Plots nach Inkubation über Nacht nicht der Entwicklung der Zellen, die beispielsweise nach einer Stunde im Fluoreszenz-Dot-Plot dargestellt sind.

Ebenso kommt es bei der Darstellung der Fusion von Phagosomen und Lysosomen, also dem nach unten Wandern der Zellen in den Fluoreszenz-Dot-Plots von der Diagonale, zu Verzerrungen auf der y-Achse. Durch Zellen, die erst im Laufe der Inkubationszeit ins Monozytengate wandern, kommen im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt Zellen hinzu, die dann "neue" EosFP E.coli-Bakterien phagozytieren und wieder grün und rot fluoreszieren, wodurch die Werte auf der y-Achse nach oben verschoben werden. Demzufolge zeigen auch hier die Fluoreszenz-Dot-Plots nach Inkubation über Nacht nicht die Degradationsleistung der Zellen, die sich zu Beginn der Inkubation im Monozytengate befanden.

Die Lösung dieses Problems besteht wie bereits erwähnt in der Verwendung von Oberflächenmarkern für Differenzierungsantigene.

4.4 Phagozytoseleistung der isolierten Zellen bei den Intensivpatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen

In der Theorie gibt es eine Korrelation der Intensität der grünen Fluoreszenz mit der Menge phagozytierter EosFP E.coli-Bakterien sowie des Verhältnisses der grünen zur roten Fluoreszenz mit der Fusion von Phagosom mit Lysosom. Ein Verlust der grünen Fluoreszenz lässt einen proteolytischen Abbau dar phagozytierten Bakterien sowie der EosFP-Proteine erkennen. Die Verwendung von EosFP-Bakterien erlaubt eine deutlich weiter reichende Interpretation von Phagozytoseassays als dies unter Verwendung von

z.B. FITC- oder GFP-markierten Pathogenen möglich ist. Andererseits können mit EosFP im Gegensatz zu Untersuchungen von Bicker et al. und Maselli et al., in denen lebende Bakterien verwendet wurden [4, 34], nur abgetötete Bakterien verwendet werden.

Wie unter 4.3 erwähnt, kommt es durch die Bewegung der Zellen im Streulicht-Dot-Plot nach der Phagozytose, die Zelldifferenzierung und das Auftauchen neuer Populationen während der Inkubation sowohl bei den Werten der Phagozytose, der Fusion von Phagosomen mit Lysosomen als auch des proteolytischen Abbaus zu Veränderungen, wodurch eine quantitative Beurteilung der Zellen, die zum ersten Messzeitpunkt "gegatet" wurden, im Verlauf fehlerhaft und nicht ohne weiteres möglich ist.

Darüber hinaus macht es die Heterogenität der isolierten mononukleären Zellen der Intensivpatienten schwierig, die Proben hinsichtlich ihrer Phagozytoseleistung zu vergleichen.

Die Werte, die für den quantitativen Vergleich der Phagozytoseleistung herangezogen wurden, entsprechen den X-Mean-Werten im "Upper Right". Verglichen werden die Werte der Zellen, die sich zum jeweiligen Messzeitpunkt einer jeden Probe im "Gate" der phagozytierenden Monozyten beziehungsweise in Gruppe 2 der Granulozyten befinden.

Die X-Mean-Werte entsprechen also der Gesamtphagozytoseleistung der Monozyten oder Granulozyten zum entsprechenden Messzeitpunkt, spiegeln jedoch nicht die Entwicklung genau der Zellen wider, die sich zum ersten Messpunkt (nach 1 Stunde Inkubation) im entsprechenden Gate befinden.

Der quantitative Vergleich des Verhältnisses der grünen zur roten Fluoreszenz, um eine Aussage über das Ausmaß der Fusion von Phagosom mit Lysosom (saurer pH-Wert nach der Phagozytose von EosFP E.coli-Bakterien) zu machen, ist nicht aussagekräftig, da die Werte auf der y-Achse (der roten Fluoreszenz) durch Bakterien, die später phogozytiert werden (auch durch Zellen, die erst im Laufe der Inkubationszeit ins entsprechende "Gate" dazukommen), nach oben verschoben werden.

Betrachtet man die Mediane der X-Mean-Werte im Upper Right der einzelnen Proben der Gruppen 1-4 in Abb. 20, dann ergeben sich nach den jeweiligen Messpunkten mit Ausnahme von Gruppe 3 durchweg steigende Werte. Zwischen dem ersten und zweiten beziehungsweise dem zweiten und dritten Messpunkt gibt es jedoch in den Gruppen 1, 2 und 4 einzelne Proben, bei denen die Intensität der grünen Fluoreszenz abfällt. Dieser Abfall des X-Mean-Wertes (dazu hätten mehr EosFP E.coli-Bakterien komplett abgebaut

als phagozytiert werden müssen) ist eher nicht auf einen proteolytischen Abbau von EosFP zurückzuführen, als auf das Absterben von Zellen, die viel phagozytiert haben und Zellen, die durch Differenzierung ins entsprechende Gate hinzugekommen sind und noch nicht so viele EosFP E.coli-Bakterien phagozytiert haben.

Letztlich zeigen sich bei den X-Mean Werten der einzelnen Proben im Verlauf bei den ersten 3 Messpunkten große Unterschiede ohne erkennbares gemeinsames Muster. Nach Inkubation über Nacht hingegen liegen die meisten Proben relativ eng beieinander. Da sich weder auf der Diagonalen der Fluoreszenz-Dot-Plots noch im "Lower Left" nach etwa einem Tag ein nennenswerter Anteil von Zellen befindet, sind nach dieser Zeit wohl alle Bakterien phagozytiert und der proteolytische Abbau des EosFP-Proteins hat noch nicht stattgefunden.

In Gruppe 3 mit den verklumpten Bakterien liegen im Verglich zu den anderen Gruppen bereits zum ersten Messpunkt hohe X-Mean-Werte vor, die dann relativ konstant bleiben. Die Kurven der jeweiligen Proben verlaufen also einigermaßen horizontal und parallel zueinander. Die genaue Ursache hierfür ist unklar, es kann nur spekuliert werden, ob diese gleichbleibend hohen Werte durch die Phagozytose und zusätzlich Adhäsion der verklumpten Bakterien an extrazelluläre Strukturen zustande kommen.

Einzig die ersten drei Messpunkte in Gruppe 3 weisen signifikante Unterschiede bezüglich der Phagozytoseleistung im Vergleich mit den gesunden Kontrollen auf (s. Abb. 21), was aber höchstwahrscheinlich den Eigenschaften der Bakterien verschuldet ist, die in dieser Gruppe verwendet wurden.

In einer Studie mit denselben fluoreszierenden Proteinen, die auch in unserem Versuch verwendet wurden, wurde die Phagozytose von Granulozyten im Vollblut nach 30, 60 und 120 Minuten sowie nach Inkubation über Nacht untersucht. Hier werden nach 120 Minuten und nach Inkubation über Nacht signifikante Unterschiede erreicht (Phagozytose bei den Sepsispatienten erhöht)[53], wohingegen sich bei den Granulozyten aus Gruppe 2, die bei der Isolation der mononukleären Zellen mittels Ficoll in die Interphase wandern und zum Teil aus unreifen Formen bestehen, zu keinem Messpunkt signifikante Unterschiede zeigen.

Laut Taneja et al. weisen reife neutrophile Granulozyten von Sepsispatienten verglichen mit ihren unreifen Vorläufern und reifen neutrophilen Granulozyten von gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Phagozytosewerte auf. Es ist auch möglich, dass nicht

berücksichtigte Granulozytenvorläufer ein Grund für widersprüchliche Studienergebnisse sind [57].

Hirsh et al. haben gezeigt, dass die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert ist [26].

Bicker et al. untersuchten die Phagozytose und Degradation von Bakterien mithilfe von EGFP (Enhanced green fluorescent protein). Die Granulozyten von Sepsispatienten wiesen hier eine signifikant verminderte Phagozytose der E.coli-Bakterien im Vergleich mit den gesunden Kontrollen auf, wobei die Unterschiede bei den Monozyten nicht signifikant waren [4].

Danikas et al. sind mit ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis gekommen, dass die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten am Aufnahmetag bei Patienten mit schwerer Sepsis, die nicht überlebten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedriger war. Dahingegen unterschied sich die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten von Patienten, die überlebten, nicht von den gesunden Kontrollen. Die Phagozytoseleistung der Monozyten am Aufnahmetag bei den Patienten (überlebend und nicht überlebend) war gleich wie die der gesunden Kontrollen. Bei den überlebenden Patienten blieb die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten und Monozyten am Aufnahme- und Entlassungstag gleich [10].

4.5 Eignung von EosFP zur Etablierung eines Phagozytosetests

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von EosFP, einem nach entsprechender Vorbehandlung grün und rot fluoreszierendem Protein, welches in E.coli-Bakterien transfiziert wurde, die Phagozytose von mononukleären Zellen untersucht. Erfolgt bei Bestrahlung mit 400 nm eine unvollständige Konversion von EosFP, so entsteht ein Molekül, dessen rote Fluoreszenz ph-empfindlich ist [61, 62].

In einer Untersuchung von Rothe und Valet wurde mit dem Acridin-Farbstoff Acridinorange das Ausmaß der Phagozytoseleistung von Granulozyten bestimmt [50]. Gille et al. verwendeten für ihre Arbeit über die Phagozytose von Monozyten mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) markierte E.coli-Bakterien und Streptokokken der Gruppe B. Die Aufnahme der Bakterien wurde dabei durch den Mittelwert der GFP-Fluoreszenz der GFP-positiven Monozyten bestimmt und der intrazelluläre Abbau durch den Verlust

der GFP-Fluoreszenz (durchflusszytometrisch gemessen)[19, 21]. Dasselbe Prinzip wurde ein Jahr zuvor von Bicker et al. angewandt, die mit EGFP (enhanced green fluorescent protein) markierten E.coli-Bakterien Monozyten und Granulozyten untersuchten [4]. Beinahe ausnahmslos wurden für Phagozytosemessungen mit FITC markierte Erreger verwendet [42].

Die Verwendung des Farbstoffes EosFP stellt eine Erweiterung zu den Phagozytoseuntersuchungen dar, in denen FITC markierte Erreger zum Einsatz kamen. EosFP E.coli-Bakterien eignen sich, um mittels Durchflusszytometrie den Anteil phagozytierender Zellen zu bestimmen, die Menge aufgenommener Bakterien zu erfassen (Intensität der grünen Fluoreszenz) und um die Fusion von Phagosom mit Lysosom zu ermitteln (Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz). Ein Absinken der grünen Fluoreszenz weist auf einen proteolytischen Abbau der aufgenommenen Bakterien mitsamt des EosFP-Proteins hin [53]. Durch die Auswertung der Fluoreszenz-Dot-Plots ist es darüber hinaus möglich anhand des Verlustes der roten Fluoreszenz Rückschlüsse auf die untersuchten Zellen zu schließen. Findet kein Verlust der roten Fluoreszenz statt, so handelt es sich lediglich um Zellen mit adhärenten EosFP E.coli-Bakterien, die nicht phagozytieren.

Um das ganze Potenzial von Eos-FP nutzen zu können ist es jedoch nötig, das hier beschrieben Vorgehen zur Untersuchung der Phagozytose von mononukleären Zellen zu modifizieren. Aufgrund der Kontamination der isolierten Zellen mit unreifen Vorläuferzellen und neutrophilen Granulozyten bei den Intensivpatienten sind weitere Isolierungsschritte nötig, zum Beispiel durch magnetische Zellsortierung, um reine mononukleäre Zellen zu erhalten. Auch ist ein erweiterter Satz an monoklonalen Antikörpern sinnvoll, da eine alleinige Bestimmung der Zellen und Populationen durch die Streulichteigenschaften wegen der Heterogenität der isolierten Zellen und der morphologischen Veränderungen während der Inkubationszeit nicht möglich ist.

Die Differenzierung von unreifen Vorläuferzellen sowie die Verschiebung der Position der Zellen im Streulicht-Dot-Plot durch morphologische Veränderung macht es auch schwierig, die gemessenen Werte zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten zu vergleichen. Speziell die Werte des Verhältnisses von grüner zu roter Fluoreszenz sind ohne Weiteres (siehe 4.3) nicht zu verwerten, da der Wert der roten Fluoreszenz durch das Hinzukommen von phagozytierenden Zellen nach oben verfälscht wird.

Ein weiterer Nachteil dieser Verfahrensweise ist, dass der Durchschnittswert (MFI, Mean Fluorescence Intensity) der jeweils untersuchten Population erfasst wird und mögliche Heterogenitäten innerhalb der Population unerkannt bleiben.

Die Werte der grünen Fluoreszenz (X-Mean-Werte im "Upper Right") werden vermutlich größtenteils durch die Aufnahme und den Abbau der EosFP E.coli-Bakterien bestimmt. Eine Änderung dieser Werte nach oben oder unten kann jedoch auch daher rühren, dass sich adhärente Bakterien an der Zelle befinden und sich später wieder von der Oberfläche lösen. Auch wenn die Zelle im Fluoreszenz-Dot-Plot nach unten wandert können sich adhärente Bakterien an der Zelloberfläche befinden und den X-Mean-Wert nach oben verschieben.

Das Auslöschen der extrazellulären Fluoreszenz, wodurch phagozytierte von adhärenten Bakterien unterschieden werden können, kann durch Farbstoffe wie Trypanblau und Kristallviolett erreicht werden [42].

Trotz der Probleme, die im Besonderen der Heterogenität der isolierten Zellen geschuldet sind, konnte der Nutzen von EosFP E.coli-Bakterien bei der Etablierung eines Phagozytosetests zur Untersuchung der Phagozytose und zugleich dem Abbau von Erregern gezeigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Phagozytose und anschließende Abtötung von Pathogenen in Phagosomen bilden die Grundlage der angeborenen Immunabwehr. Der Abbau von Pathogenen im Phagolysosom und die Produktion von Antigenen, die von mononukleären Zellen präsentiert werden, um Lymphozyten zu aktivieren, verbindet die Phagozytose außerdem mit der adaptierten Immunabwehr.

Das mononukleäre Phagozytensystem stellt eine Untergruppe der Leukozyten dar und schließt im Blut zirkulierende Monozyten, Gewebsmakrophagen sowie dendritische Zellen mit ein.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Etablierung eines Phagozytoseassays, mit dem sich die Phagozytoseleistung sowie das Degradationsvermögen von mononukleären Zellen simultan messen lassen. Hierfür wurden mit EosFP (Eos Fluorescent Protein)-transfizierte E.coli (Escherichia coli)-Bakterien verwendet. EosFP ist ein photokonvertierbares Protein aus der Familie der grün fluoreszierenden Proteine. Bei einer Anregung mit 490 nm emittieren die transfizierten Bakterien grünes (516 nm) und rotes (581 nm) Fluoreszenzlicht. Da die rote Fluoreszenz nicht säurestabil ist, geht sie bei den phagozytierten Bakterien nach der Bildung des Phagolysosoms verloren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 42 Blutproben von Intensivpatienten, bei denen SIRS oder Sepsis vorlag, sowie 8 Blutproben von gesunden Spendern untersucht. Mittels Ficoll-Gradient wurden die mononukleären Zellen aus peripherem Blut isoliert und mit den EosFP E.coli-Bakterien inkubiert. Nach 1, 3, und 6 Stunden sowie nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte anhand von Durchflusszytometrie und Mikroskopie.

Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der mononukleären Zellen wurden die Ergebnisse in 4 Gruppen eingeteilt, um die Phagozytoseleistung quantitativ vergleichen zu können. Gruppe 1 schließt die 8 Blutproben der gesunden Spender mit ein. Die Gruppen 2-4 enthalten die Blutproben der Intensivpatienten, wobei Gruppe 2 die Blutproben beinhaltet, bei denen die isolierten Zellen mit unreifen neutrophilen Granulozyten kontaminiert waren. Gruppe 3 umfasst Blutproben, bei denen die EosFP E.coli-Bakterien zum Teil verklumpt waren und Gruppe 4 die Blutproben nach Wechsel der Bakterien. Mit

Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsscatters konnte so die Phagozytoseleistung unterschieden werden. Darüber hinaus erkennt man an der Verminderung der roten Fluoreszenz, ob und wann die phagozytierten Bakterien im Phagolysosom verdaut werden.

Die Unterschiede der Phagozytoseleistung zwischen den Intensivpatienten und den gesunden Kontrollen waren nicht signifikant, wobei sich die untersuchten Populationen, aufgrund morphologischer Veränderungen durch Zelldifferenzierung und die Phagozytose der Bakterien während der Inkubationszeit (nach 24 Stunden Inkubation zeigt sich eine Verschmelzung der einzelnen Populationen), meist nicht mehr physikalisch durch Scatteranalyse trennen lassen. Die einzige Möglichkeit, dies zu erreichen, liegt in der Verwendung von Oberflächenmarkern für Differenzierungsantigene.

Obwohl für eine genaue quantitative Beurteilung der Phagozytoseleistung und Verdauung der Bakterien in den Populationen von mononukleären Zellen das hier beschriebene Vorgehen erweitert werden muss, so zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass sich mit EosFP-transfizierte Bakterien für einen Phagozytoseassay mit mononukleären Zellen eignen, um gleichzeitig die Menge der phagozytierten Partikel zu bestimmen und festzustellen, ob und wann sie im Phagolysosom verdaut werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Auffray C., Sieweke M.H., and Geissmann F., *Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells.* Annu Rev Immunol 27: 669-692. (2009)
2. Ault K.A., Antin J.H., Ginsburg D., Orkin S.H., Rappeport J.M., Keohan M.L., Martin P., and Smith B.R., *Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation.* J Exp Med 161: 1483-1502. (1985)
3. Bantel H. and Schulze-Osthoff K., *Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where.* Crit Care 13: 173-175. (2009)
4. Bicker H., Hoflich C., Wolk K., Vogt K., Volk H.D., and Sabat R., *A simple assay to measure phagocytosis of live bacteria.* Clin Chem 54: 911-915. (2008)
5. Castellheim A., Brekke O.L., Espevik T., Harboe M., and Mollnes T.E., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis.* Scand J Immunol 69: 479-491. (2009)
6. Chauvin C. and Josien R., *Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles.* J Immunol 181: 11-16. (2008)
7. Comstedt P., Storgaard M., and Lassen A.T., *The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study.* Scand J Trauma Resusc Emerg Med 17: 67-72. (2009)
8. Cornbleet P.J., *Clinical utility of the band count.* Clin Lab Med 22: 101-136. (2002)
9. Dale D.C., Boxer L., and Liles W.C., *The phagocytes: neutrophils and monocytes.* Blood 112: 935-945. (2008)
10. Danikas D.D., Karakantza M., Theodorou G.L., Sakellaropoulos G.C., and 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: 87-97. (2008)
11. DeBoer K.P., Kleinman R., and Teodorescu M., *Identification and separation by bacterial adherence of human lymphocytes that suppress natural cytotoxicity.* J Immunol 126: 276-281. (1981)

12. Del Giudice I., Matutes E., Morilla R., Morilla A., Owusu-Ankomah K., Rafiq F., A'Hern R., Delgado J., Bazerbashi M.B., and Catovsky D., *The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes.* Haematologica 89: 303-308. (2004)

13. Dreschers S., Gille C., Haas M., Grosse-Ophoff J., Schneider M., Leiber A., Buhring H.J., and Orlikowsky T.W., *Infection-induced bystander-apoptosis of monocytes is TNF-alpha-mediated.* PLoS ONE 8: e53589. (2013)

14. Dunkelberger J.R. and Song W.C., *Complement and its role in innate and adaptive immune responses.* Cell Res 20: 34-50. (2010)

15. Dzionek A., Fuchs A., Schmidt P., Cremer S., Zysk M., Miltenyi S., Buck D.W., and Schmitz J., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.* J Immunol 165: 6037-6046. (2000)

16. Flannagan R.S., Cosio G., and Grinstein S., *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies.* Nat Rev Microbiol 7: 355-366. (2009)

17. Flannagan R.S., Jaumouille V., and Grinstein S., *The cell biology of phagocytosis.* Annu Rev Pathol 7: 61-98. (2012)

18. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., and Ley K., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.* Science 327: 656-661. (2010)

19. Gille C., Leiber A., Mundle I., Spring B., Abele H., Spellerberg B., Hartmann H., Poets Ch F., and Orlikowsky T.W., *Phagocytosis and postphagocytic reaction of cord blood and adult blood monocyte after infection with green fluorescent protein-labeled Escherichia coli and group B Streptococci.* Cytometry B Clin Cytom 76: 271-284. (2009)

20. Gille C., Leiber A., Spring B., Kempf V.A., Loeffler J., Poets C.F., and Orlikowsky T.W., *Diminished phagocytosis-induced cell death (PICD) in neonatal monocytes upon infection with Escherichia coli.* Pediatr Res 63: 33-38. (2008)

21. Gille C., Spring B., Tewes L., Poets C.F., and Orlikowsky T., *A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled Escherichia coli: comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults.* Cytometry A 69: 152-154. (2006)

22. Gordon S. and Taylor P.R., *Monocyte and macrophage heterogeneity.* Nat Rev Immunol 5: 953-964. (2005)

23. Grage-Griebenow E., Loseke S., Kauth M., Gehlhar K., Zawatzky R., and Bufe A., *Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells.* Immunol Cell Biol 85: 383-390. (2007)

24. Hermiston M.L., Xu Z., and Weiss A., *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells.* Annu Rev Immunol 21: 107-137. (2003)

25. Hill D.L., Eriksson E.M., Li Wai Suen C.S., Chiu C.Y., Ryg-Cornejo V., Robinson L.J., Siba P.M., Mueller I., Hansen D.S., and Schofield L., *Opsonising antibodies to P. falciparum merozoites associated with immunity to clinical malaria.* PLoS ONE 8: e74627. (2013)

26. Hirsh M., Mahamid E., Bashenko Y., Hirsh I., and Krausz M.M., *Overexpression of the high-affinity Fcgamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis.* Shock 16: 102-108. (2001)

27. Horner C., Bouchon A., Bierhaus A., Nawroth P.P., Martin E., Bardenheuer H.J., and Weigand M.A., *[Role of the innate immune response in sepsis].* Anaesthesist 53: 10-28. (2004)

28. Hoser G.A., Skirecki T., Zlotorowicz M., Zielinska-Borkowska U., and Kawiak J., *Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: a pilot study.* Folia Histochem Cytobiol 50: 420-426. (2012)

29. Hume D.A., *Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system.* Mucosal Immunol 1: 432-441. (2008)

30. Jutras I. and Desjardins M., *Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity.* Annu Rev Cell Dev Biol 21: 511-527. (2005)

31. Kiama S.G., Cochand L., Karlsson L., Nicod L.P., and Gehr P., *Evaluation of phagocytic activity in human monocyte-derived dendritic cells.* J Aerosol Med 14: 289-299. (2001)

32. Kumar S. and Jack R., *Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells.* J Endotoxin Res 12: 278-284. (2006)

33. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., and Ramsay G., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.* Crit Care Med 31: 1250-1256. (2003)

34. Maselli A., Laevsky G., and Knecht D.A., *Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by Dictyostelium discoideum.* Microbiology 148: 413-420. (2002)

35. Matsuda N. and Hattori Y., *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy.* J Pharmacol Sci 101: 189-198. (2006)

36. Metnitz B., Schaden E., Moreno R., Le Gall J.R., Bauer P., and Metnitz P.G., *Austrian validation and customization of the SAPS 3 Admission Score.* Intensive Care Med 35: 616-622. (2009)

37. Mogensen T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.* Clin Microbiol Rev 22: 240-273, Table of Contents. (2009)

38. Nahm C.H., Choi J.W., and Lee J., *Delta neutrophil index in automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis.* Ann Clin Lab Sci 38: 241-246. (2008)

39. Nienhaus G.U. and Wiedenmann J., *Photoaktivierbare fluoreszente Proteine für die Zellbiologie.* BIOspektrum 4/2010 432-434. (2010)

40. Nienhaus K., Nienhaus G.U., Wiedenmann J., and Nar H., *Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP.* Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9156-9159. (2005)

41. Nordenfelt P., Waldemarson S., Linder A., Morgelin M., Karlsson C., Malmstrom J., and Bjorck L., *Antibody orientation at bacterial surfaces is related to invasive infection.* J Exp Med 209: 2367-2381. (2012)

42. Nuutila J. and Lilius E.M., *Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells.* Cytometry A 65: 93-102. (2005)

43. Oda T. and Maeda H., *A new simple fluorometric assay for phagocytosis.* J Immunol Methods 88: 175-183. (1986)

44. Pandey R., DeStephan C.M., Madge L.A., May M.J., and Orange J.S., *NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-kappaB pathway in NK cells.* J Immunol 179: 7385-7396. (2007)

45. Park B.H., Kang Y.A., Park M.S., Jung W.J., Lee S.H., Lee S.K., Kim S.Y., Kim S.K., Chang J., Jung J.Y., and Kim Y.S., *Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis.* BMC Infect Dis 11: 299-307. (2011)

46. Park H.J., Ha Y.J., Pyo J.Y., Park Y.B., Lee S.K., and Lee S.W., *Delta neutrophil index as an early marker for differential diagnosis of adult-onset Still's disease and sepsis.* Yonsei Med J 55: 753-759. (2014)

47. Paulsen M. and Janssen O., *Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells.* Cell Commun Signal 9: 7-15. (2011)

48. Perry S.E., Mostafa S.M., Wenstone R., Shenkin A., and McLaughlin P.J., *HLA-DR regulation and the influence of GM-CSF on transcription, surface expression and shedding.* Int J Med Sci 1: 126-136. (2004)

49. Pinheiro da Silva F. and Nizet V., *Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection.* Apoptosis 14: 509-521. (2009)

50. Rothe G. and Valet G., *Phagocytosis, intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry.* Cytometry 9: 316-324. (1988)

51. Savina A. and Amigorena S., *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells.* Immunol Rev 219: 143-156. (2007)

52. Schreiner L., *Phagozytose und Abbau von EosFP E.coli-Bakterien (transfiziert mit pH-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff) in Vollblutproben von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock*. Med Dissertation, Universität Ulm (2015).

53. Schreiner L., Huber-Lang M., Weiss M.E., Hohmann H., Schmolz M., and Schneider E.M., *Phagocytosis and digestion of pH-sensitive fluorescent dye (Eos-FP) transfected E. coli in whole blood assays from patients with severe sepsis and septic shock.* J Cell Commun Signal 5: 135-144. (2011)

54. Simmons D.L., Tan S., Tenen D.G., Nicholson-Weller A., and Seed B., *Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein.* Blood 73: 284-289. (1989)

55. Spear G.T. and Teodorescu M., *Specific cytotoxicity of human lymphocyte subpopulations defined by bacterial adherence.* Clin Exp Immunol 61: 450-458. (1985)

56. Stuart L.M. and Ezekowitz R.A., *Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly.* Nat Rev Immunol 8: 131-141. (2008)

57. Taneja R., Sharma A.P., Hallett M.B., Findlay G.P., and Morris M.R., *Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling.* Shock 30: 618-622. (2008)

58. Taylor N.J., Nishtala A., Manakkat Vijay G.K., Abeles R.D., Auzinger G., Bernal W., Ma Y., Wendon J.A., and Shawcross D.L., *Circulating neutrophil dysfunction in acute liver failure.* Hepatology 57: 1142-1152. (2013)

59. Teodorescu M., *Binding of bacteria in lymphocyte subpopulations: role of lectin-carbohydrate interactions.* Biol Cell 51: 251-258. (1984)

60. van den Akker E.L., Baan C.C., van den Berg B., Russcher H., Joosten K., Hokken-Koelega A.C., Lamberts S.W., and Koper J.W., *Ficoll-separated mononuclear cells from sepsis patients are contaminated with granulocytes.* Intensive Care Med 34: 912-916. (2008)

61. Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F., Rocker C., Salih A., Spindler K.D., and Nienhaus G.U., *EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion.* Proc Natl Acad Sci U S A 101: 15905-15910. (2004)

62. Wiedenmann J. and Nienhaus G.U., *Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family.* Expert Rev Proteomics 3: 361-374. (2006)

63. Wynn T.A., Chawla A., and Pollard J.W., *Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease.* Nature 496: 445-455. (2013)

64. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.F., and Wang H., *Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.* Biomark Res 2: 1-9. (2014)

65. Yona S. and Jung S., *Monocytes: subsets, origins, fates and functions.* Curr Opin Hematol 17: 53-59. (2009)

66. Zamani F., Zare Shahneh F., Aghebati-Maleki L., and Baradaran B., *Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach.* Adv Pharm Bull 3: 329-332. (2013)

67. Ziegler-Heitbrock H.W., *Definition of human blood monocytes.* J Leukoc Biol 67: 603-606. (2000)

68. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., and Lutz M.B., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.* Blood 116: e74-80. (2010)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die an der Durchführung der vorliegenden Promotionsarbeit beteiligt waren.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Marion Schneider, für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die hervorragende Betreuung.

Herrn Dr. Harald Hohmann danke ich für die Einführung in die Durchflusszytometrie sowie die Betreuung bei den Laborarbeiten.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Weiß aus der Abteilung Klinische Anästhesiologie für seine Unterstützung bei der Begutachtung der Patientendaten danken.

Ein weiterer Dank gilt Leonhard Schreiner für die Unterstützung bei der Immunphänotypisierung.

Ebenfalls bedanken möcht ich mich bei meiner Familie, die mir stets unterstützend zur Seite stand.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.