
Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Gert Riethmüller

Monozyten-Populationen und
ihre Zytokin-Produktion
beim Erysipel

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexia Jacqueline Horelt

aus

München

Jahr

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.W.L. Ziegler-Heitbrock

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. H. Belohradsky
Prof. Dr. R. Haas

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: _____

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2004

Veröffentlichung:

Aus Gründen der Aktualität wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bereits vorab in zwei Publikationen veröffentlicht.

1. Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. 2002. **The CD14⁺CD16⁺ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production.** Eur. J. Immunol. 32:1319-27.
 2. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. 2002. **The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF.** J. Immunol. 168:3536-42.
-

„Wenn du eine weise Antwort verlangst, musst du vernünftig fragen.“ (*J.W. von Goethe*)

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das Erysipel - eine dermatologische Erkrankung	3
2.1.1 Definition und klinisches Bild	3
2.1.2 Terminologie	3
2.1.3 Epidemiologie und Lokalisation	4
2.1.4 Erscheinungsformen und Komplikationen	5
2.1.5 Erregerspektrum, Diagnostik und Differentialdiagnosen	6
2.1.6 Therapie, Verlauf und Prognose	6
2.2 Die CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten – Grundlagen	8
2.2.1 Allgemeines zu Monozyten	8
2.2.2 Phänotypisierung der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	8
2.2.3 Der Reifegrad der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	9
2.2.4 Zytokine mit Einfluss auf die Entwicklung der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	10
2.2.5 Funktionelle Eigenschaften	11
2.3 Zytokine: Tumornekrosefaktor, Interleukin-1 β und Interleukin-6	11
2.3.1 Der Tumornekrosefaktor	11
2.3.2 Das Interleukin-1 β	13
2.3.3 Das Interleukin-6	14
2.4 CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten bei verschiedenen Erkrankungen	15
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Untersuchtes Krankengut	18
3.1.2 Blutproben	19
3.1.3 Antikörper	19
3.1.4 Zytokine	20
3.1.5 Lösungen	20
3.2 Methoden	22

3.2.1	Immunfluoreszenzanalyse	22
3.2.1.1	Oberflächenanfärbung	22
3.2.1.1.1	Absolute Zellzahl-Bestimmung	22
3.2.1.1.2	Zweifارbenfluoreszenz	23
3.2.1.1.3	Dreifarbenfluoreszenz	24
3.2.1.2	Intrazelluläre Zytokinanalyse	25
3.2.1.2.1	Stimulierung der Zellen	25
3.2.1.2.2	Oberflächenanfärbung	25
3.2.1.2.3	Intrazelluläre Anfärbung	26
3.2.1.2.4	Spezifitätskontrolle der anti-Zytokin- Antikörper	26
3.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
3.2.2.1	Prinzip des Testes	28
3.2.2.2	IL-6, IL-10 und IFN- γ -ELISA	29
3.2.2.3	M-CSF-ELISA	30
3.3	Statistische Methoden	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Die CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozytenzellzahl am Tag 1	32
4.2	Veränderung der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozytenzahl im Verlauf	35
4.3	Korrelationen der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozytenzahlen zu klinischen Parametern	37
4.3.1	Korrelation zur Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS)	37
4.3.2	Korrelation zum C-reaktiven Protein (CRP)	38
4.3.3	Korrelation zur Temperatur	38
4.4	Korrelationen der CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozytenzahlen zu Serumzytokinspiegel	39
4.4.1	Korrelation zu Interferon-gamma (IFN- γ) und Interleukin-10 (IL-10)	39
4.4.2	Korrelation zu Interleukin (IL-6)	40
4.4.3	Korrelation zum Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF)	40
4.5	Produktion der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 durch Monozytenpopulationen bei gesunden Probanden	42
4.5.1	Problematik der Stimulation	42
4.5.2	Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)	44
4.5.2.1	Tumornekrosefaktor (TNF)	44
4.5.2.1.1	TNF-Spezifität der Färbung	44

4.5.2.1.2	TNF-Produktion der CD14 ⁺ CD16 ⁺ vs. CD14 ⁺⁺ Monozyten bei fünf gesunden Probanden	45
4.5.2.1.3	Zeit- und Dosisabhängigkeit der Zytokinproduktion	47
4.5.2.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	49
4.5.2.2.1	IL-1 β -Spezifität der Färbung	49
4.5.2.2.2	IL-1 β -Produktion der CD14 ⁺ CD16 ⁺ vs. CD14 ⁺⁺ Monozyten bei fünf gesunden Probanden	50
4.5.2.3	Interleukin-6 (IL-6)	51
4.5.2.3.1	IL-6-Spezifität der Färbung	51
4.5.2.3.2	IL-6-Produktion der CD14 ⁺ CD16 ⁺ vs. CD14 ⁺⁺ Monozyten bei fünf gesunden Probanden	53
4.5.3	Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA)	55
4.5.3.1	Ausschluss einer LPS-Kontamination in der LTA-Präparation	55
4.5.3.2	Vergleich zur Stimulation mit LPS	56
4.6	Intrazelluläre Zytokinproduktion bei Erysipelpatienten mit hohen CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern	57
4.6.1	Vergleich der intrazellulären Produktion von Interleukin-6	57
4.6.2	Vergleich der intrazellulären Produktion von Interleukin-1 β	58
4.6.3	Vergleich der intrazellulären Produktion von Tumornekrosefaktor	59
5	Diskussion	61
6	Literaturverzeichnis	69
7	Abkürzungen	78
8	Anhang	80
	Patientendaten	I
	Danksagung	II
	Lebenslauf	III
	Erklärung	IV

1 Zusammenfassung

Im menschlichen Vollblut können zwei Monozytensubpopulationen unterschieden werden, die „klassischen“ CD14⁺⁺CD16⁻DR⁺ Monozyten und die proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Zellen. Letztere machen nur ungefähr zehn Prozent aller Monozyten aus und sind bei zahlreichen Erkrankungen im zentralen Blutpool stärker vermehrt als die klassischen Monozyten.

Bei der Erysipelkrankung, einer lokalisierten Hauterkrankung durch Streptokokken, konnte am Tag der Diagnosestellung (Tag 1 der Studie) eine stark erhöhte CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl mit einem Mittelwert von $150,4 \pm 69,3$ Zellen / μ l Vollblut bei 11 Patienten gemessen werden, während ein Patient eine niedrige Zellzahl aufwies (35,4 Zellen / μ l, Kontrollspender $48,7 \pm 19,9$ Zellen / μ l). Dabei waren die klassischen Monozyten der Erysipelpatienten im Vergleich zu denen der Kontrollpersonen um den Faktor 1,7 nur mäßig erhöht. Bei vier Patienten, bei denen die CD14⁺CD16⁺ Monozyten am Tag 1 vermehrt waren, kehrten die Zellzahlen innerhalb von fünf Tagen unter antibiotischer Therapie in den Kontrollbereich zurück.

Die Patienten zeigten eine beschleunigte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS), eine erhöhte Körpertemperatur und ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), sowie erhöhte Interleukin (IL-6)- und *Macrophage-Colony-Stimulating-Factor* (M-CSF)- Serumspiegel auf. Unter diesen klinischen Entzündungsparametern korrelierten am Tag 1 nur die Körpertemperatur und der CRP-Spiegel signifikant mit den Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten.

Außerdem wurde die Tumornekrosefaktor (TNF)- Produktion bei beiden Populationen mit Hilfe der Dreifarbenfluoreszenzanalyse am Durchflusszytometer untersucht, zuerst nach Stimulation von Vollblut gesunder Probanden mit Lipopolysaccharid (LPS). Dabei konnte in den proinflammatorischen Monozyten im Vergleich zu den klassischen Monozyten ein dreifach erhöhter Median der Fluoreszenzintensität für das TNF-Protein gemessen werden.

Bei den Patienten wurde anschließend die intrazelluläre TNF-Bestimmung nach *ex vivo* Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) durchgeführt, einem typischen Bestandteil der Streptokokkenzellwand.

Messungen zum Vergleich der LPS- mit der LTA-Stimulation bei gesunden Probanden zeigten keinen Unterschied auf, da die TNF-Expression der proinflammatorischen Monozyten

im Vergleich zu den klassischen Monozyten nach Stimulation mit LTA ebenfalls um das Dreifache erhöht war.

Im Gegensatz dazu zeigten die CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten der Erysipelpatienten verglichen mit den entsprechenden Zellen gesunder Kontrollspender eine zweifach niedrigere TNF-Expression, wobei gleichzeitig die TNF-Expression der klassischen Monozyten unverändert blieb. Demzufolge produzierten die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten der Patienten *ex vivo* weniger TNF als die klassischen CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten derselben.

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺DR⁺ Monozyten bei Erysipelpatienten mengenmäßig vermehrt und selektiv tolerant gegenüber Stimulation mit Zellwandbestandteilen von Streptokokken sind.

2 Einleitung

2.1 Das Erysipel - eine dermatologische Erkrankung

2.1.1 Definition und klinisches Bild

Bei der Hauterkrankung Erysipel, die umgangssprachlich auch Wundrose oder Rotlauf genannt wird, handelt es sich um eine bakterielle Infektion der tiefen Hautschichten, genauer der Dermis und Subkutis (Hypodermis) (6, 8, 46). In der Regel ist es eine nicht eitrig, ödematöse Entzündung des oberflächlichen und tiefen Lymphnetzes der Haut, manchmal einhergehend mit Fieber und Schüttelfrost. Charakteristisch sind neben einem gestörten Allgemeinzustand die lokalen Inflammationszeichen wie Erwärmung, Schmerz, Schwellung und Rötung des betroffenen Hautareals. Gewöhnlich beginnt die meist asymmetrische Erkrankung mit Spannungsgefühl und Druckschmerz, gefolgt von der flächenhaften Rötung und Schwellung, die sich nach peripher ausbreiten, aber stets scharf begrenzt bleiben. Typisch sind kerzenflammartige oder unregelmäßige Ausläufer, wobei die Ausbreitung unterschiedlich schnell erfolgt. Gleichzeitig fühlt sich das befallene Gebiet heiß an und glänzt aufgrund der ödematös gespannten Haut (6, 8, 13, 23, 46).

2.1.2 Terminologie

Im englischen Sprachgebrauch gibt es zusätzlich zum Begriff *erysipelas* die irreführende Bezeichnung *cellulitis*. Letztere wird für den Befall der etwas tieferen Hautschichten, d.h. hauptsächlich der Subkutis, verwendet und unterscheidet sich durch eine fehlende klare Abgrenzung (Rötung und Erhabenheit der Ränder) des betroffenen Gebietes zur gesunden Haut, wie sie für die Wundrose charakteristisch ist (6, 16, 46). Oft wird *cellulitis* auch als Oberbegriff aller infektiösen Dermohypodermiden gebraucht, so dass es das Erysipel mit einschließt; dabei werden im englischen Sprachraum lediglich die von β -hämolyisierenden Streptokokken (vornehmlich der Gruppe A) hervorgerufenen Entzündungen als *erysipelas* bezeichnet (6, 13, 16).

2.1.3 *Epidemiologie und Lokalisation*

Anfang der 70er Jahre wurde in der Literatur das Erysipel kaum noch erwähnt und wenn doch, dann nur als eine fast schon verschwundene Krankheit. Die zwischen 1940 bis 1970 tatsächlich stattgefundenen Abnahme an Streptokokkeninfekten wurde auf die Antibiotikatherapie, die Verbesserung der Lebensbedingungen und die abnehmende Virulenz der infektiösen Organismen zurückgeführt (10). Doch in den vergangenen Jahren nahm die Inzidenz wieder stark zu und, was noch deutlicher zu sehen ist, die Lokalisation des Erysipels hat sich verändert. Üblicherweise wird heutzutage ein Befall der Unterschenkel beobachtet, während das Gesichtserysipel relativ selten geworden ist. Außerdem kommen viel häufiger atypische und rezidivierende Formen vor als früher (10, 55). Diese zunehmende Tendenz der Wundrose ist bis heute nicht befriedigend geklärt worden, doch werden bestimmte Risikofaktoren vermutet, wie z.B. junges oder betagtes Alter, Immundefizienz, lokoregionale und allgemeine Faktoren und eine wieder stärker werdende Virulenz der Bakterien (13, 55).

Die Erreger treten meist durch eine Hautstelle mit gestörter Barrierefunktion ein, etwa beim mazerativen Typ des Fußpilzes, *Ulcus cruris venosum*, Bagatellverletzungen oder bei Rhagaden und Erosionen (8). Gesichtserysipelen könnten auf Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes zurückzuführen sein (6). Neben diesen klassischen Eintrittspferten, die die Prädispositionsstellen des Erysipels bedingen, erhöhen u.a. die venöse Insuffizienz (z.B. nach Saphena-Ektomie bei Bypass-OP), Lymphödeme, Arteritiden, Traumata, Lymphknotenbestrahlung bzw. -ektomie und chirurgische Eingriffe als lokale Faktoren und Diabetes mellitus, Adipositas und Alkoholkonsum als allgemeine Faktoren das Erkrankungsrisiko (6, 13, 46, 55). Risikofaktoren für das Auftreten von chronisch rezidivierenden Erysipelen sind v.a. nicht erkannte oder nicht sanierte Eintrittspferten (meist mazerative Interdigitalmykose), primäre und sekundäre Lymphödeme (z.B.: nach Lymphadenektomie bei Mammakarzinom oder Hysterektomie, nach Bestrahlung, bei chronisch venöser Insuffizienz), periphere arterielle Verschlusskrankheit, immunologische Störungen (z.B.: hämatologische Grunderkrankungen, Immunsuppressiva) und nephrotisches Syndrom (2, 6, 13).

2.1.4 Erscheinungsformen und Komplikationen

Es gibt verschiedene Formen des Erysipels, die nach ihrem Schweregrad eingeteilt werden. Gelegentlich können auch Lokalkomplikationen auftreten und unterschieden werden: auf dem Erythem können sich Bläschen und große Blasen bilden (*Erysipelas vesiculosum et bullosum*) und durch Hauteinblutungen in das hyperämisch-erythematöse Gebiet, vor allem in stasisabhängigen Körperpartien, kann das Erysipel hämorrhagisch-blasig werden. Gefürchtete, aber seltenere Verlaufsformen sind nekrotische und phlegmonöse Läsionen, die bei bestimmten Risikofaktoren häufiger auftreten (8, 55).

Prädisponierende Faktoren wie Leber- und Nierenerkrankungen - und in geringerem Maße Diabetes mellitus - erhöhen signifikant das Risiko einer Blasenbildung, wobei Diabetes zusätzlich ein Risikofaktor für hämorrhagische Läsionen darstellt. Außer Nierenerkrankungen prädisponieren eine periphere arterielle Verschlusskrankheit, eine geschwächte Abwehrlage und Hyperurikämie zu einem häufigeren Auftreten eines nekrotisierenden Erysipels (55). Phlegmonöse (eitrige) Komplikationen entstehen als schwerste Krankheitsform durch Bildung von Abszessen und sind meist mit einer Superinfektion durch Staphylokokken verbunden, wobei sie an der unteren Extremität auftreten (8, 55). Als mögliche Komplikation eines Gesichtserysipels wird eine Ausdehnung auf den Sinus sagittalis mit Sinusthrombose gefürchtet, besonders wenn die Entzündung im Bereich des Nasensattels beginnt. Schließlich ist, vor allem nach operativen Eingriffen an Nase und Nebenhöhlen, auch das Auftreten eines Erysipels an Schleimhäuten möglich. Dabei ist das Larynxerysipel gefährlich, da es durch ein Glottisödem tödlich enden kann (8). Ernste Krankheitsbilder wie eine nekrotisierende Faszitis und / oder das *Streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) werden zwar ebenfalls von *Streptococcus pyogenes* hervorgerufen, sie werden aber heutzutage nur selten als Komplikationen nach einfachen Erysipelerkrankungen beobachtet (6, 13, 46). Die mögliche spontane Ausheilung des Erysipels spricht für die hohe immunologische Potenz der Haut, die mit ihren zahlreichen dendritischen Zellen eine relativ schnelle Eindämmung der Erreger erlaubt und so eine Bakteriämie bzw. eine Ausbreitung in tiefere Hautschichten verhindern kann (13). Insgesamt gesehen ist die Mortalität durch das Erysipel sehr niedrig, nämlich 3 Todesfälle auf 1199 Erkrankungen (46).

2.1.5 Erregerspektrum, Diagnostik und Differentialdiagnosen

In der Literatur besteht eine einheitliche Meinung über das auslösende Agens des Erysipels, auch wenn der Erreger in vielen Fällen durch bakteriologische Untersuchungen (bakteriologischer Abstrich im Bereich der Eintrittspforte, Blutkulturen, Hautbiopsien etc.) nicht eindeutig nachgewiesen werden kann (6, 13, 16, 46). *Streptococcus pyogenes*, ein grampositiver β -hämolisierender Streptokokkus der Gruppe A, dessen Invasiv-Faktoren die Ausbreitung begünstigen, wird für das Krankheitsbild verantwortlich gemacht. An zweiter Stelle stehen grampositive Streptokokken der Gruppe G, die fast halb so viele Fälle wie die der Gruppe A ausmachen (16). Schließlich kommen auch Erreger aus den Gruppen B und C, sowie grampositive Staphylokokken und gramnegative Stäbchen (*Enterobacteriaceae*) in Betracht (6, 8, 13, 16, 46).

Da der Erregernachweis in vielen Fällen nicht gelingt, wird die Diagnose oft anhand des klinischen Bildes und hoher Entzündungswerte (erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und beschleunigte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, BKS) gestellt (8, 16, 10, 46). Eine Serokonversion des Antistreptolysin- (ASL) und des Antideoxyribonuklease B- (ADNase B) Titers ist aufgrund des nötigen Zeitintervalles (ca. 15-30 Tage) im klinischen Alltag schwierig zu verifizieren, doch findet sie in 36 % bis 58 % der Fälle statt; bis zu 58 % nur dann, wenn Streptokokken der Gruppe A die Erreger sind (16, 46). Dabei ist es auch möglich, dass eine frühzeitig eingeleitete Antibiotikatherapie die Bildung der Antikörper verhindert (46). Für eine sichere Diagnose eines streptokokkeninduzierten Erysipels könnte vermutlich der Nachweis der Keime in der Läsion mit Hilfe der *polymerase chain reaction* (PCR) erfolgreicher sein (34).

Die Differentialdiagnosen zum Erysipel sind sehr zahlreich, die häufigsten sind die akute Kontaktdermatitis, die tiefe Beinvenenthrombose, der Herpes zoster und das Erysipeloid (Zoonose, die auch Schweinerotlauf genannt wird, Unterscheidung zum Erysipel durch den Erreger: *Erysipelothrix insidiosa*; 8).

2.1.6 Therapie, Verlauf und Prognose

Streptococcus pyogenes ist weiterhin empfindlich gegen β -Lactam-Antibiotika, so dass die intravenöse Behandlung mit Penicillin G Mittel der ersten Wahl bleibt. Auch die β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppen B, C und G sprechen auf diese Behandlung an (6, 8, 10, 46). In leichten Fällen kann eine orale Therapie mit Phenoxymethylpenicillin

dreimal tägl. 1,2 Mio. IE (Internationale Einheiten) eingeleitet werden; bei mäßiggradiger Ausprägung sollten 1-4 Mio. IE Penicillin G pro Tag intravenös (i.v.) oder intramuskulär (i.m.) verabreicht werden, wobei einige Kliniken bei unkompliziertem Verlauf nach ca. 6 Tagen auf eine orale Therapie umstellen (8, 46). In schweren Fällen wird Benzylpenicillin in einer Einzeldosis von 10 Mio. IE 4-mal tägl. per Kurzinfusion gegeben. Nur bei einer nachgewiesenen Allergie gegen Penicillin sollte man auf ein Makrolidantibiotikum, z.B. Erythromycin, ausweichen (8, 10, 46). Können andere Erreger außer Streptokokken nicht ausgeschlossen werden, ist ein Drittgenerationscephalosporin, z.B. Cefotaxim (dreimal 2 g tägl.), als Kurzinfusion zu empfehlen. Zusätzlich zur Bettruhe und Hochlagerung der betroffenen Extremität werden äußerlich feuchte Umschläge mit Desinfizienzlösungen angewendet (8). Bei Infektionen mit einer hohen Bakterienanzahl erreichen die Erreger relativ schnell die stationäre Phase ihres Wachstums, so dass die Effektivität des Penicillins abnimmt. Dieses Phänomen kommt nicht bei unkompliziert verlaufenden Erysipelen vor, sondern vielmehr bei nekrotisierender Faszitis oder bei STSS. Bei einem komplizierten Verlauf der Wundrose mit einer Entwicklung in Richtung einer nekrotisierenden Faszitis kann die frühzeitige Gabe von Clindamycin oder Gentamicin zur Unterstützung des bakteriziden Effektes des Penicillins gerechtfertigt sein (6, 46).

In der Regel kann das Erysipel heutzutage bei rechtzeitiger und adäquater Behandlung gut geheilt werden (außer bei vorbestehenden Risikofaktoren); dabei können aber chronische Schwellungszustände bedingt durch die Verklebung von Lymphgefäßen zurückbleiben, die wiederum ein erneutes Auftreten des Erysipels an gleicher Stelle begünstigen, ein sog. *chronisch-rezidivierendes Erysipel*. Dieses nimmt im Allgemeinen einen mitigierten Verlauf, d.h. die Allgemeinreaktionen (Fieber, Schüttelfrost) sind abgeschwächt (2, 8). Bei vielen Patienten mit immer wiederkehrendem Erysipel wird das Erreichen eines ausreichenden lokalen Antibiotika-Wirkspiegels durch chronische Ödeme der betroffenen Extremität erschwert, so dass eine relativ hochdosierte intravenöse Behandlung erforderlich ist. Außerdem werden die Ödeme durch die rezidivierenden Entzündungen des Lymphsystems mit nachfolgender Verschlechterung der lymphatischen Drainage in ihrer Ausprägung immer weiter verstärkt. Um diesen *Circulus vitiosus* zu durchbrechen, sollte die Lymphdrainage, neben der Antibiose und der Sanierung von Eintrittspforten, beim chronisch rezidivierenden Erysipel zur Therapie dazugehören (2). Die Erysipelrezidive sind relativ häufig, sie machen ungefähr ein Viertel aller Fälle aus (46).

2.2 Die CD14⁺CD16⁺ Monozyten - Grundlagen

2.2.1 Allgemeines zu Monozyten

Die Zellen des humanen Monozyten- und Makrophagensystems leiten sich von myelomonozytischen Vorläuferzellen ab, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Aus diesen Stammzellen entstehen die Monoblasten, Zellen mit ausgeprägter Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die weiter ausreifen und schließlich als Monozyten in die Blutbahn gelangen. Dort zirkulieren die Zellen mit einer Halbwertszeit von ca. drei Tagen, bevor sie ins Gewebe wandern und sich zu verschiedenen Arten von Makrophagen entwickeln (35).

Die Monozyten stellen 4-10% aller kernhaltigen Blutzellen dar, was ca. 250-850 Zellen / μ l Vollblut entspricht (25). Zusammen mit den Granulozyten, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen (NK), gehören die Monozyten und Makrophagen der unspezifischen Immunabwehr an; allerdings tragen sie durch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APCs) nach Phagozytose, Produktion von Sauerstoffradikalen und Sezernierung wichtiger Zytokine auch zur spezifischen Immunantwort bei (12, 35, 71).

Entzündungsreaktionen beschleunigen die Migration der Monozyten aus der Blutbahn ins Gewebe und deren Aktivierung durch den Konzentrationsanstieg verschiedener Faktoren (Chemokine, bakterielle Proteine, Komplementfaktoren, Fibrinopeptide, Wachstumsfaktoren und Zytokine). Monozyten werden vor allem durch Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, einem Glykolipid das Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien ist. Das CD14-Antigen auf der Monozytenoberfläche bindet den Komplex aus LPS-bindendem Protein plus LPS, was zu einer Aktivierung des Monozyten führt (35, 71). Obwohl die genauen Aktivierungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, ist dennoch unbestritten, dass der CD14-Rezeptor bei diesen Vorgängen eine zentrale Rolle spielt. Aber auch andere bakterielle Produkte wie die Lipoteichonsäure (LTA) oder das Peptidoglykan können die Monozyten u.a. über CD14 aktivieren (58, 63). Dabei benutzt LPS den Korezeptor *Toll-like receptor* (TLR) 4 und LTA den Korezeptor TLR2 (31).

2.2.2 Phänotypisierung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten

Die Verschiedenartigkeit der Gewebsmakrophagen in Bezug auf ihre Größe, ihrer Morphologie und auch ihrer Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene kann ebenfalls in der Monozytenpopulation beobachtet werden (44, 68, 71). Durch Anfärbung der

Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD16 können zwei Arten von Monozyten unterschieden werden: die "klassischen" Monozyten, die stark CD14 positiv sind, aber negativ für CD16 (CD14⁺⁺ Monozyten) und die schwach CD14 positiven Monozyten, die gleichzeitig CD16 exprimieren (CD14⁺CD16⁺ Monozyten). Letzteres Oberflächenmolekül ist ein transmembranöser, niedrig affiner Rezeptor für den konstanten Teil eines Antikörpers der IgG-Klasse (Fc γ -Rezeptor Typ III), der die Phagozytose sowie die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von NK, Neutrophilen und Makrophagen vermittelt (12, 71). Normalerweise können die CD14⁺CD16⁺ Zellen in der Zweifarbenfluoreszenz recht klar von den klassischen Monozyten unterschieden werden, doch erschwert in manchen Individuen ein kontinuierlicher Übergang zwischen den beiden Zellwolken die genaue Abgrenzung der verschiedenen Monozytensubpopulationen. Obwohl bis jetzt noch keine große Anzahl gesunder Kontrollspender untersucht worden ist, machen die CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der Regel 10% aller Monozyten aus, wobei eine Zellzahl von ca. 50/ μ l Vollblut bestimmt werden kann (3, 67, 71).

Phänotypische Analysen der CD14⁺CD16⁺ Zellen zeigten eine charakteristische monozytäre Morphologie, doch scheinen sie etwas kleiner als die CD14⁺⁺ Monozyten zu sein, so dass sie im Punktdiagramm (*Dot-Plot-Analyse*) mit Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung in dem Bereich zwischen der Lymphozyten- und der Monozytenwolke zu liegen kommen (44, 71).

2.2.3 Der Reifegrad der CD14⁺CD16⁺ Monozyten

Studien von Ziegler-Heitbrock *et al.* (9, 14) zeigten eine niedrigere Expression des CD33-Oberflächenmoleküls auf den CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Dieses Protein ist ein myelomonozytisches Stammzellantigen, das mit zunehmender Reifung der Zellen in seiner Expressionsdichte abnimmt (9, 67, 71). Da bestimmte Gewebsmakrophagen auch CD16 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (vor allem Alveolarmakrophagen) und die CD16-Antigendichte mit *in vitro* Kultivierung dieser Zellen zunimmt, können die CD14⁺CD16⁺ Monozyten als reifere Subpopulation der Monozyten angesehen werden, die noch nicht die Endothelschranke passiert haben und im Blut bereits Eigenschaften von Gewebsmakrophagen aufweisen (67, 71). Außerdem besitzen die CD14⁺CD16⁺ Monozyten im Vergleich zu den klassischen eine höhere Expression der Antigene CD11a und c, die an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) binden, und von VLA-4 (*very late antigen*), welches an VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) bindet (67, 71). Diese Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und VCAM-1) werden an Entzündungsherden von den Gefäßwandzellen hochreguliert, damit

durch eine verstärkte Interaktion zwischen dem Endothel und den am Rande des Blutstromes “rollenden” Leukozyten der Übergang ins Gewebe erleichtert wird. Durch die erhöhte Antigendichte an CD11a, CD11c und an VLA-4 können die CD14⁺CD16⁺ Monozyten vermutlich schneller als die CD14⁺⁺ Zellen ins Gewebe wandern (71).

2.2.4 Zytokine mit Einfluss auf die Entwicklung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten

Die Reifung von hämatopoetischen Stammzellen wird überwiegend durch Zytokine wie die *Colony-Stimulating-Factors* (CSF) festgelegt; auch die Reifung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten könnte durch solche Signale dirigiert werden (71). Die *in vitro* Induktion des CD16-Antigens durch TGF- β (*Transforming Growth Factor* β), M (*Macrophage*)-CSF oder Interleukin (IL)-10 konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (3, 9, 71). Das Zytokin IL-10 induziert z.B. eine hohe CD16-Expression auf Monozyten innerhalb von 18 Stunden, während eine spontane Induktion des CD16-Moleküls, die normalerweise nach zwei Tagen auftritt, durch anti-IL-10-Antikörper verhindert werden kann (9). Weitere *in vitro* Studien belegten eine Herunterregulierung des CD14-Moleküls durch GM (*Granulocyte-Macrophage*)-CSF, noch verstärkt durch Zugabe von IL-4 (3, 71). Allerdings bleibt es schwierig zu sagen, ob die *ex vivo* aus Monozyten induzierten Zellen den CD14⁺CD16⁺ Blutmonozyten tatsächlich entsprechen, denn die Bedingungen im menschlichen Körper resultieren aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zytokine. Allein durch eine fünftägige Kultur von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in zehnprozentigem Humanserum können von Monozyten abstammende Makrophagen induziert werden, die ebenfalls schwächer CD14, dafür aber CD16 exprimieren (67). Ob diese Zellen nur bezüglich einzelner Marker den CD14⁺CD16⁺ Monozyten entsprechen oder aber bezüglich Phänotyp und Funktion mit den CD14⁺CD16⁺ Monozyten identisch sind, ist jedoch nicht klar. *In vivo* Studien zeigten eine Induktion der CD14⁺CD16⁺ Monozyten durch eine Behandlung mit *Macrophage-Colony-Stimulating-Factor* (M-CSF), wobei dieser Effekt durch die Kombination mit Interferon (IFN)- γ noch verstärkt werden konnte (64, 71).

Zusammengefasst erklären die bisherigen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien noch nicht, welche Signale die Induktion der CD14⁺CD16⁺ Monozyten determinieren, d.h. welcher “Zytokincocktail” im Humanserum für die Ausreifung der Zellen verantwortlich ist.

2.2.5 Funktionelle Eigenschaften

Da sowohl die CD14⁺⁺ wie auch die CD14⁺CD16⁺ Population den LPS-Rezeptor (CD14) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, können beide Zelltypen über LPS-Stimulation zur Zytokinproduktion angeregt werden. In Untersuchungen mit *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) konnten ähnliche Mengen an *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) von TNF, IL-1 und IL-6 gefunden werden. Im Gegensatz dazu war die mRNA für IL-10 in CD14⁺⁺ Monozyten deutlich detektierbar, während sie in den CD14⁺CD16⁺ Monozyten mengenmäßig niedriger oder gar nicht nachweisbar war. Durch die Abwesenheit des stark anti-entzündlich wirkenden IL-10 können die CD14⁺CD16⁺ Monozyten als Zellen mit proinflammatorischen Eigenschaften angesehen werden (21, 71).

Weitere für Monozyten spezifische Funktionen wie Phagozytose und die Produktion von reaktivem Sauerstoff waren im Vergleich mit den CD14⁺⁺ Monozyten bei der CD14⁺CD16⁺ Subpopulation etwas geringer (44, 71). Andererseits wurde eine hohe Expressionsdichte vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse II (Humanes Leukozyten Antigen, HLA-DR) sowie von kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD86) auf den CD14⁺CD16⁺ Zellen gefunden (3, 71). Die niedrige IL-10-Produktion und die hohe Menge an HLA-DR und kostimulierenden Molekülen lassen eine stärkere antigenpräsentierende Potenz dieser Monozyten vermuten.

2.3 Zytokine: Tumornekrosefaktor, Interleukin-1 β und Interleukin-6

2.3.1 Der Tumornekrosefaktor

Im Jahre 1984 wurden der Tumornekrosefaktor (TNF) und Lymphotoxin-a (LT-a, ehemals TNF- β), das 78 % Homologie mit ersterem aufweist, molekular kloniert und es wurde gezeigt, dass diese beiden Moleküle *in vitro* auf einige Tumorzelllinien zytotoxisch wirken (45, 53). Damals wurde auch ein als *cachectin* bekannter Faktor aus Mausmakrophagen isoliert, der sich als identisch mit TNF erwies, und nicht als Zytolysin, sondern als Inhibitor der Lipoproteinlipase und anderer anabolischer Enzyme im Fettgewebe - und daraus resultierendem Gewichtsverlust - identifiziert wurde (4, 14, 45, 53). TNF und LT-a rufen fast identische biologische Effekte hervor, obwohl sie von verschiedenen Zellen produziert werden: LT-a wird ausschließlich von Lymphozyten und NK gebildet, während TNF vor allem von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Lymphozyten und Mastzellen

produziert wird. Das Zytokin TNF bindet an Rezeptoren, die sich auf fast allen Zellen des Körpers befinden und besitzt dementsprechend ein breitgefächertes Wirkungsspektrum. Wie auch LT-a kommt TNF als Homotrimer vor (TNF kann auch membrangebunden sein, wird aber überwiegend (> 90 %) sezerniert) und beide Zytokine können in dieser trimeren Form über den 55kD- und den 75kD-TNF-Rezeptor ein zelluläres Signal erzeugen (4, 14, 53). Monomeres TNF mit einem Molekulargewicht von 17 kD kann durch verschiedene Nachweismethoden, wie z.B. *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), detektiert werden, besitzt aber in dieser Form keine biologische Aktivität (14).

Wird TNF auf einen Schlag und in großer Menge systemisch in den Kreislauf abgegeben, so führt es zu einer erhöhten Gerinnungsaktivität durch die Veränderung der anti-koagulatorischen Eigenschaften des Endothels, welches vermehrt *platelet-activating factor* und *plasminogen activator inhibitor* produziert. Diese Veränderungen führen zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und schließlich zu einem verlangsamten Blutstrom. Weiterhin stimuliert TNF die Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, sowie es die Produktion und Ausschüttung weiterer inflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-1 und IL-6, induziert. Durch überschießende TNF-Produktion nach Endotoxinstimulierung können die Koagulopathie und die durch den Entzündungsvorgang hervorgerufene Gewebedestruktion bis zum kardiovaskulären Zusammenbruch führen, dem Höhepunkt des septischen Schocks. Dabei ist eine wichtige und faszinierende Funktion des TNF, nämlich die Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod), an den toxischen Effekten des Zytokins während des Schocks oder des Entzündungsprozesses beteiligt. Die Auslösung der Apoptose könnte auch eine wichtige physiologische Aufgabe des TNFs sein, in dem der TNF-vermittelte programmierte Zelltod dazu beiträgt, den Wirt vor infizierten Zellen zu schützen. Im Gegensatz dazu unterhält chronisch und in geringen Mengen überproduziertes TNF einen entzündlichen Prozess wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis. Die Effekte wie die Resorption von Knochen, Fieber, Anämie und Gewichtsabnahme können alle in einem gewissen Grade dem TNF zugeschrieben werden, ebenso wie die Stimulierung der Produktion von Akutphasenproteinen in Hepatozyten (4, 14). Die durch TNF erhöhte Prostaglandin- und Kollagenaseproduktion der Synovialzellen kann Gelenkdestruktionen bei Entzündungen noch verstärken (14). Außerdem spielt die Fähigkeit zur Fieberinduktion durch erhöhte Prostaglandinproduktion im Hypothalamus vor allem in der Pathogenese des Endotoxinschocks eine Rolle. Gleichzeitig wird IL-1 durch hohe Dosen an TNF induziert, wobei IL-1 als stärkstes endogenes Pyrogen gilt. Schließlich nimmt der Tumornekrosefaktor

auch auf die Hormonausschüttung (erhöhtes adrenokortikotropes Hormon) und -sensitivität (TNF erzeugt eine Insulinresistenz) Einfluss (4, 14).

Damit ist TNF ein ausgesprochen pleiotropes Zytokin. Aufgrund seiner Fähigkeit andere Zytokine zu regulieren, wird TNF auch als „*master cytokine*“ bezeichnet (53).

2.3.2 Das Interleukin-1 β

Als Interleukine werden Glykoproteine bezeichnet, die hauptsächlich von Leukozyten gebildet werden und die vornehmlich die Aktivität dieser weißen Blutzellen regulieren. Interleukine sind also Glykoproteine, die zwischen Leukozyten vermitteln (38). Trotzdem ist der Terminus „Interleukin“ sowohl für IL-1 wie auch für IL-6 eigentlich unzutreffend, denn beide Zytokine werden, wie auch TNF und IFN, von vielen verschiedenen Zellen gebildet (außer von den „klassischen“ leukozytären Zellen auch von Mesenchym- und Gliazellen, vom Endothel und vom Mesangium) und wirken auf multiple „Nicht-Leukozyten“ (14). Lange vor der Entdeckung der Zytokine als Wachstumsfaktoren des Immunsystems wurden sie als endogene Mediatoren des Fiebers erforscht und deshalb als „*endogenous pyrogen*“ (EP) bezeichnet. Heutzutage bezieht sich dieser Terminus häufig auf IL-1, weil dieses Zytokin als erstes aufgereinigt und sowohl als pyrogen, als auch als lymphozytenaktivierendes Molekül charakterisiert wurde. Als im Jahre 1984 IL-1 molekular kloniert wurde, konnte man den zwei damals bekannten unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (iP) für humanes EP auch zwei verschiedene Genprodukte (mit ca. 22-26% Homologie ihrer Aminosäuresequenzen) zuordnen: IL-1a für den sauren iP von 5 und IL-1 β für die alkalischere Form mit einem iP von 7 (14, 38).

Als endogenes Pyrogen stimuliert IL-1 sehr stark die endogene Bildung und Ausschüttung von Prostaglandinen, die wiederum im Hypothalamus zu einer Erhöhung des Körpertempersollwertes führen. Zusammen mit TNF führt IL-1 ebenfalls zu einer verstärkten Gerinnung (s. oben) und vor allem zu einer Steigerung der zellulären Infiltration des Gewebes. IL-1 induziert die Expression von ICAM-1 in kultivierten Gefäßendothelzellen in relativ niedrigen Konzentrationen innerhalb einer Stunde, so dass Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten stärker an ihnen adhären können. Mit TNF teilt es weitere biologische Eigenschaften, wie z.B.: Zytotoxizität gegenüber bestimmten Tumorzellen und gegenüber den β -Zellen des Pankreas, Lymphozytenaktivierung, Induktion hepatischer Akutphasenproteine, Stimulierung von Synovialzellen zur Bildung von Prostaglandinen und Kollagenase und Ausschüttung von ACTH, dem adrenokortikotropen Hormon. Trotzdem besitzen IL-1 und

TNF keine erkennbaren homologen Regionen, noch sind sich ihre jeweiligen Rezeptoren ähnlich (14, 38).

Ein prominenter Effekt von IL-1 auf die Leukozyten besteht in der Induktion der T-Zellproliferation, vor allem auch im Zusammenspiel mit IL-6 (s. unten, 38, 62).

2.3.3 Das Interleukin-6

Ursprünglich wurde dieses Polypeptid aus Fibroblasten isoliert und wegen seiner antiviralen Eigenschaft "IFN- β 2" genannt. Als sich diese Fähigkeit aber als sehr gering erwies und andere Forscher ein B-Zellen aktivierendes Polypeptid aus T-Lymphozyten isolierten, stellte sich die Identität der beiden Moleküle heraus und das Zytokin wurde als IL-6 neu benannt (14, 38, 62).

Fast jede Zelle ist zur Synthese von IL-6 imstande, darunter die Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen und eine Vielzahl von Tumorzelllinien. Zwar können T- und B-Lymphozyten IL-6 produzieren, doch sind die akzessorischen Zellen zweifelsfrei die Hauptquelle des Zytokins. Die Bildung von IL-6 kann nicht nur durch verletztes Gewebe (z.B. bei Verbrennungen), viralen Entzündungen oder LPS induziert werden, sondern auch durch viele andere Zytokine wie IL-1, TNF (entweder alleine oder in Kombination mit IFN- γ), IL-3 und GM-CSF (14, 62). Dabei reagieren nicht alle Zellen in gleicher Weise auf die Faktoren: z.B. induziert IL-1 in Fibroblasten stark IL-6, während es in Knochenmarkszellen kaum wirkt; dort reagieren die Zellen besser auf eine Stimulierung mit IL-3 oder GM-CSF (38, 62).

Das *in vitro* Wachstum von B-Zellhybridomen und von Mausplasmazytomen ist in Gegenwart von IL-6 deutlich verbessert, was für die Produktion monoklonaler Antikörper (mAk) praktische Auswirkungen hat (14, 38, 62). Nicht nur die Proliferation von Mausplasmazytomen, sondern auch das Wachstum von bestimmten humanen Myelomzellen konnte *in vitro* durch IL-6 verstärkt oder durch anti-IL-6-Antikörper inhibiert werden. Und schließlich wurde eine quantitativ erhöhte IL-6-Produktion im Knochenmark von Patienten mit multiplem Myelom beobachtet. Weiterhin stimuliert IL-6 langwirkend die Synthese von Immunglobulinen (Ig) ohne die Proliferation der B-Lymphozyten zu induzieren und trägt somit zur Bildung einer antigenspezifischen humoralen Immunantwort bei. Dabei ist ein Synergismus mit IL-1 zu beobachten, der bei der T-Zell-Aktivierung noch deutlicher wird. Da die Expression des IL-6-Rezeptors im Laufe der T-Zell-Aktivierung herunterreguliert wird, wirkt IL-6 vermutlich hauptsächlich in der initialen Phase. Weiterhin spielt IL-6 eine Rolle im

Wachstum von peripheren und aus dem Thymus stammenden T-Lymphozyten, sowie in der zytolytischen T-Zellantwort. Und auch in der Hämatopoese scheint IL-6 den in G_0 arretierten Stammzellen den Eintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen, wobei Synergismen mit IL-3, GM-CSF und M-CSF beobachtet werden konnten (62).

Zwar waren IL-1 und TNF die ersten Zytokine bei denen eine leberstimulierende Wirkung dokumentiert wurde, doch keiner der beiden Faktoren konnte das volle Spektrum der Akutphasenproteine induzieren, wie es beim IL-6 der Fall ist (38, 62). Während der Immunantwort verursacht auch IL-6 Fieber, doch ist die dafür nötige Konzentration des Zytokins 50- bis 100-fach größer als die von IL-1 (14).

Eine gemeinsame Wirkung des IL-6 mit TNF und IL-1 ist außerdem die vermehrte Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen. Wie wichtig IL-6 in der Immunantwort ist, zeigt sich über dessen Anstieg in den verschiedenen Körperflüssigkeiten (Plasma, Liquor, Synovia) bei einer Vielzahl unterschiedlichster Erkrankungen und Verletzungsgeschehen (u.a. virale oder bakterielle Infekte des zentralen Nervensystems, schwere Verbrennungen, rheumatoide Arthritis, Sepsis). Der IL-6-Spiegel kann beim septischen Schock sogar eine prognostische Aussagekraft besitzen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass viele Wirkungen, die früher allein dem IL-1 zugeschrieben wurden, eigentlich einem kombinierten Effekt von IL-1 und IL-6 entsprechen (14, 38, 62).

2.4 CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei verschiedenen Erkrankungen

Da manche Zytokine die CD14⁺CD16⁺ Monozyten *in vivo* zu induzieren scheinen, ist es nachvollziehbar, dass die Zellen bei Erkrankungen oder Situationen, die mit einer erhöhten Zytokinproduktion einhergehen, ebenfalls durch diese endogenen Faktoren induziert werden. Ein solcher Fall ist z.B. die Dialyse, auf die Patienten mit chronischem Nierenversagen für längere Zeit angewiesen sind (50, 71). Diese Patienten zeigen eine Immundefizienz gegenüber den unterschiedlichsten Erregern, die auf eine eingeschränkte Funktion der Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen in der Immunabwehr zurückzuführen ist. Schon allein die Urämie verursacht eine Verschlechterung der zellvermittelten Immunität, während der Kontakt der Blutzellen mit der Filtermembran eine Aktivierung der Monozyten durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF und IL-6 hervorruft. Sowohl Hämodialyse-, wie auch Peritonealdialysepatienten zeigen eine relative und absolut erhöhte Zellzahl der

CD14⁺CD16⁺ Monozyten auf, die außerdem mit einem Anstieg des M-CSF-Spiegels im Plasma korreliert (50).

Ein Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl konnte auch bei schwerkranken Patienten nach einer herzchirurgischen Operation beobachtet werden. Dieser große chirurgische Eingriff ist eine mögliche Ursache für das sog. *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS, Syndrom einer generalisierten Entzündungsreaktion), das in der Abwesenheit einer konkreten bakteriellen oder viralen Infektion mit einer starken Zytokinbildung und Inflammation einhergeht. Obwohl bei den schwerkranken Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine offensichtlichen Infektionszeichen vorhanden waren, stieg die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahl am ersten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an und schien mit der klinischen Erkrankungsschwere zu korrelieren (20).

Aber auch beim mukokutanen Lymphknotensyndrom (*Kawasaki-Syndrom*), einer Kinderkrankheit deren Ätiologie noch nicht geklärt wurde und die durch die Infiltration mononukleärer Zellen in kleine und mittelgroße Gefäße charakterisiert ist, konnte ein Zusammenhang zwischen der relativen und absoluten Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten, dem Krankheitsverlauf und dem C-reaktiven Protein (CRP) festgestellt werden. Dabei war im akuten Stadium dieser Erkrankung der Serumspiegel von IL-10 signifikant erhöht, wobei dieses Zytokin unzweifelhaft mit den CD14⁺CD16⁺ Monozyten in engem Zusammenhang steht (9, 28).

Weiterhin wurde ein Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Subpopulation bei Patienten mit Tuberkulose, soliden Tumoren oder unbehandeltem Asthma beschrieben, während eine Abnahme der Zellzahl bis jetzt nur nach einer GM-CSF- oder Glukokortikoidtherapie oder nach extremer physischer Anstrengung verzeichnet wurde (19, 48, 51, 71).

Rothe *et al.* (49) konnten einen Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozyten auch für Patienten mit Hypercholesterinämie zeigen, wobei dieser interessanterweise mit niedrigen *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterinspiegeln korrelierte, die als Risikoindikatoren für die Entwicklung der Artherosklerose gelten.

Auch bei der schweren systemischen Erkrankung mit dem *human immunodeficiency virus* (HIV)- 1 konnte eine Zunahme der CD14⁺CD16⁺ Monozyten beobachtet werden, wobei diese Zellen im Stadium AIDS bis zu 40 % der Gesamtmonozyten ausmachten (42, 59, 71). Dabei produzierten diese Zellen mehr IL-1a und TNF als die CD14⁺⁺ Monozyten der gleichen Patienten, während beide Monozytenpopulationen gesunder Kontrollspender spontan weder IL-1a noch TNF produzierten (59, 71).

Zweifellos findet die dramatischste Zunahme der CD14⁺CD16⁺ Monozytensubpopulation bei Patienten mit schwersten Infektionen, wie z.B. bei Sepsis, statt. Bei manchen Sepsispatienten wurden die CD14⁺CD16⁺ Zellen mit einem Anteil von über 50 % zum vorherrschenden Subtyp aller Monozyten und stiegen auf eine Zellzahl von mehr als 500 / μ l Vollblut an, was eine mehr als zehnfache Steigerung im Vergleich zur Zellzahl von Kontrollpersonen ausmacht (7, 18, 71). In einer klinischen Fallstudie eines Patienten mit selbstinduzierter Septikämie gingen hohe Zytokinspiegel an M-CSF, TNF und IL-6 dem Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozyten voran. Unklar bleibt jedoch, ob M-CSF selbst oder von M-CSF induzierte Zytokine für diese Vermehrung der Zellen verantwortlich ist (7, 20). Eine Expansion der CD14⁺CD16⁺ Monozyten ging in der Studie über Sepsispatienten gleichzeitig mit verstärkter Zytokinproduktion einher, da der IL-6-Spiegel der Patienten im Vergleich zu dem von Kontrollpersonen erhöht war und mit der Zunahme der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl korrelierte (18).

Um die Mechanismen des Anstiegs der CD14⁺CD16⁺ Monozyten und die Genexpression in diesen Zellen zu analysieren, sind komplexe intensivmedizinische Erkrankungen, wie z.B. Sepsis oder postoperative SIRS, wegen der Polyprognose und der Heterogenität der Patienten schlecht geeignet.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war daher, diese CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei einer klar definierten lokalen Hautinfektion, wie es beim Erysipel der Fall ist, zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden:

1. ob eine Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten stattfindet,
2. unter welchen Bedingungen diese Vermehrung der Zellen auftritt,
3. welche Zytokine für einen Anstieg dieser Zellen verantwortlich sein könnten,
4. und in welchem Ausmaß die CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei gesunden Probanden und im Vergleich dazu bei den Erysipelpatienten proinflammatorische Zytokine bilden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchtes Krankengut

Es wurden 12 Patienten, nach Erhalt der Einverständniserklärung und Eingrenzung basierend auf den nachfolgend erläuterten Einschlusskriterien, aus der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)- München in die Studie aufgenommen. Die diagnostischen Kriterien für die Erkrankung "Erysipel" waren das klinische Bild, d.h. scharf begrenzte Rötung mit flammenförmigen Ausläufern, Schmerzhaftigkeit, Erwärmung und Schwellung, ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), Normbereich 0-0,5 mg/dl, im Serum und eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BKS), die normalerweise bis 12 mm in der ersten und bis 24 mm in der zweiten Stunde beträgt. Obwohl eine Serokonversion des Antistreptolysin (ASL)- und des Antideoxyribonuklease B (ADNase B)- Titer aufgrund des nötigen Zeitintervalls (ca. 15-30 Tage) schwierig zu verifizieren war und sie nur in knapp über ein Drittel der Fälle stattfindet (16, 46), galten als weitere Einschlusskriterien zur Aufnahme in die Studie ein Antikörpertiter von über 1000 IU / ml für ASL oder über 1000 U / ml für ADNase B (Normbereich für beide 0 - 200) bzw. ein Titeranstieg oder Titerabfall einer der beiden Antikörper innerhalb von drei Monaten um mindestens den Faktor drei. Deshalb wurden letztendlich von insgesamt 33 untersuchten Patienten nur 12 Patienten in die Studie aufgenommen, was 36 % aller Erkrankten entspricht und mit Literaturwerten übereinstimmt (16, 46 und siehe 2.1.5 der Einleitung). Aufgrund dieser strengen Kriterien handelt es sich demzufolge bei allen Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Erysipel.

Als Tag 1 der Studie wurde der Aufnahmetag der Patienten in die Klinik bezeichnet. Dabei war bei jedem Einzelnen vorher ein unterschiedlicher Zeitraum zwischen den ersten Krankheitsanzeichen und dem Arztbesuch verstrichen (in der Regel zwischen zwei und vier Tagen). Wichtig war die noch nicht angefangene Antibiotikatherapie, um einen Einfluss der medikamentösen Substanzen, vor allem auf die Zytokinproduktion, zu verhindern. Ab dem Aufnahmetag wurden die Patienten entweder mit Cefotaxim (3 x 2 g i.v. / Tag bei 8 Patienten), Flucloxacillin (3 x 1 g i.v. / Tag bei 2 Patienten), Ciprofloxacin (2 x 200 mg p.o. / Tag bei einem Patienten) oder Penicillin G (3 x 1 Mio. IE i.v. / Tag bei einem Patienten) behandelt.

Die Kontrollspender waren 12 offensichtlich gesunde und freiwillige Personen aus dem Kollegen-, Familien- und Freundeskreis. Das durchschnittliche Alter (57 ± 7 Jahren) der Kontrollpersonen entsprach demjenigen des Patientenkollektivs (s. Tab. im Anhang).

3.1.2 Blutproben

Den Patienten wurde baldmöglichst nach Diagnosestellung der Erysipelkrankung Blut aus der Armvene in Kalium-Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)-, Ammonium (NH_4)-Heparin- und Serum Gel-S-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und innerhalb von 1 bis maximal 4 h untersucht.

Ebenso wurde peripheres Blut von offensichtlich gesunden Spendern unterschiedlichen Geschlechts aus dem Institut für Immunologie und aus dem privaten Umfeld in die gleichen Röhrchen entnommen. Für die Dosis- und Zeitabhängigkeit der TNF- und IL-6-Produktion in Monozytensubpopulationen, sowie für den Spezifitätsnachweis der Antikörper gegen die Zytokine TNF, IL-6 und IL-1 β , wurde heparinisiertes Blut verwendet (Natrium-Heparin 10 U / ml Blut, Braun, Melsungen, Deutschland).

3.1.3 Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAk) gegen: CD14 (IgG2a, Klon 322A-1/MY4, #6603511), CD16 (IgG1, Klon 3G8, #2642), HLA-DR (IgG1, Klon Immu357, #2659) und die entsprechenden Isotypkontrollen wurden bei Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland, gekauft. CD16 (IgG1, Klon B73.1/Leu-11c, #347617), anti-IL-6 (rat IgG2a, Klon MQ2-6A3, unkonjugiert #20651A und mit Konjugation an den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) #20655A), anti-TNF (IgG1, Klon MAb11, #18645A) und deren Isotypkontrollen waren von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland. Anti-TNF (rat IgG1, Klon MP9-20A4, #RHTNFA04) und dessen zugehörige Kontrolle wurden bei Caltag via Medac, Hamburg, Deutschland, erworben. Anti-IL-1 β (IgG1, Klon 8516.311, #IC2018) und die entsprechende Isotypkontrolle kamen von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland. Für einige Experimente wurde der CD14 mAk (IgG1, Klon MEM18) von V. Horesi (Prag, Tschechien) eingesetzt.

3.1.4 Zytokine

Verwendet wurde rekombinantes humanes (rh) IL-1 von Strathmann-Biotech, Hamburg, Deutschland (#IL-1 β -10); rh-IL-6 wurde bei Peprotech, London, England gekauft (#200-06) und rhTNF wurde uns freundlicherweise von der Firma BASF-Knoll, Ludwigshafen, Deutschland überlassen.

3.1.5 Lösungen

Reagenzien zur Immunfluoreszenzanalyse:

Ammoniumchloridlösung

4,15 g Ammoniumchlorid,
500 mg Kaliumhydrogencarbonat und
18 mg Titriplex III (EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat)
in 500 ml demineralisiertes Wasser lösen und bei 2-8 °C aufbewahren.

Phosphatpuffer (PBS)

50,6 g di-Natriumphosphat-Dihydrat
12,17 g Kaliumhydrogenphosphat
21,92 g Natriumchlorid
in 5 l demineralisiertem Wasser lösen und bei Raumtemperatur (RT, 18-25 °C) aufbewahren.

Waschpuffer

195 ml LPS-freies PBS (ultrafiltriert)
5 ml fötales Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin, Deutschland)
Natriumazid (NaN₃) in einer Endkonzentration von 0,1% hinzufügen und bei 2-8 °C aufbewahren.

Fixierungslösung

a) für das abschließende Fixieren der Zellen werden 500 mg Paraformaldehyd (PFA) und b) für das intrazelluläre Anfärben 4 g PFA in 100 ml ultrafiltriertem PBS mehrere Stunden im 55 °C warmen Wasserbad gelöst und für eine Woche bei 2-8 °C aufbewahrt.

Permeabilisationslösung (Perm/Wash Solution von BD, # 2091 KZ)

Perm/Wash Solution mit demineralisiertem Wasser 1:10 verdünnen, so dass eine Endkonzentration von 0,1% Saponin und 0,01% NaN_3 in PBS gelöst entsteht.

Alle nicht andersweitig gekennzeichneten Materialien wurden bei der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

*Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)- Reagenzien:**1) Tool set und Compact ELISA kit (beide von PeliKine, Amsterdam, Niederlande)*Beschichtungspuffer (Coating buffer; im Tool set enthalten)

0.1 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer mit einem pH von 9.6; laut Anleitung des Tool sets kurz vor dem ELISA wie folgt anzusetzen: eine Kapsel in 100 ml destilliertem Wasser auflösen. Haltbar bis zu einer Woche bei 2-8 °C.

PBS-Lösung (im Tool set enthalten)

Eine Tablette in 200 ml destilliertem Wasser auflösen; bei 2-8 °C bis zu einer Woche haltbar.

Waschpuffer (im Tool set enthalten)

PBS mit 0.005% TWEEN 20; im Tool set (PeliKine) in 20facher Konzentration enthalten => 50 ml mit 950 ml destilliertem Wasser verdünnen. Dieser Puffer kann bei 2-8 °C bis zu zwei Monaten aufbewahrt werden.

TMB Substratlösung (im Tool set enthalten)

Fertige Lösung aus 3, 3', 5, 5-Tetramethylbenzidin (TMB) und Hydrogenperoxid (H_2O_2); sie soll dem Licht nicht ausgesetzt werden. Bei 2-8 °C lagern.

Stopplösung (im Tool set enthalten)

1.8 M Schwefelsäure in destilliertem Wasser gelöst. Ebenfalls bei 2-8 °C aufbewahren.

Verdünnungspuffer (Dilution buffer; im Compact ELISA kit enthalten)

Der Puffer wird 5fach konzentriert mitgeliefert und deshalb vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt.

2) *Quantikine (humaner M-CSF-ELISA Kit von R&D Systems)*

Waschpuffer

25fach konzentrierte Pufferlösung (20 ml) auf ein Endvolumen von 500 ml mit destilliertem Wasser verdünnen.

Substratlösung

Farbreagenzien A (12.5 ml stabilisiertes H₂O₂) und B (12.5 ml stabilisiertes TMB) in gleichen Volumina innerhalb 15 Minuten vor ihrer Anwendung mischen.

Stopplösung

6 ml einer einmolaren Schwefelsäure.

Verdünnungspuffer

Fertig nutzbarer Puffer aus Tierserum.

Alle Quantikine-Reagenzien können laut Herstellerangabe nach ihrer Rekonstitution bzw. nach Anbruch des Kits bei 2-8 °C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenzanalyse

3.2.1.1 Oberflächenanfärbung

3.2.1.1.1 Absolute Zellzahl-Bestimmung

Es wurden die absoluten und relativen Zellzahlen der CD14⁺⁺ und der CD14⁺CD16⁺ Monozytensubpopulationen bei den Erysipelpatienten sowie bei den offensichtlich gesunden Kontrollspendern durch Zweifarbenfluoreszenz am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, *Fluorescence-Activated Cell Sorter*, FACS) ermittelt. Zur Bestimmung der absoluten Leukozytenzellzahl wurde das CELL DYN 3000 - Gerät (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) eingesetzt.

3.2.1.1.2 Zweifarbenfluoreszenz

Durch Zugabe von 14 ml Ammoniumchloridlösung werden die Erythrozyten von 200 µl (EDTA-) Vollblut in 15 ml Polypropylenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei RT lysiert. Während dem anschließenden Waschschrift mit PBS / 2% FKS / 0,1% NaN₃ (immer drei Minuten bei 420 g zentrifugieren) werden die Zellen in Eppendorfgefäße (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) überführt und nach Absaugen des Überstandes in 45 µl des Waschpuffers aufgenommen. Nun werden 2,5 µl des mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierten anti-CD14 mAk (322A-1/MY4-FITC) und 2,5 µl anti-CD16 mAk (B73.1/Leu-11c-PE) zu den Proben hinzugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wird nach einem weiteren Waschschrift das Pellet in PBS / 0,5% Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert, und die Zellen werden innerhalb von 24 h am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) aufgenommen.

Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen ein Absorptionsmaximum von 495 nm für FITC und von 488 nm für PE und können deshalb beide durch einen Argon-Ionenlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, angeregt werden. Dabei liegt das Emissionsmaximum für FITC bei 525 nm, so dass der Farbstoff grün fluoresziert, und für PE bei 575 nm, dessen emittierte Wellenlänge ein orange-(hell)rotes Licht hervorruft. Für die Messungen zusätzlicher Antigene in der Multiparameter-Durchflusszytometrie (Dreifarbfluoreszenz), seien es nun Oberflächenmoleküle, Zytokine oder andere Proteine, können mAk auch mit R-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5) konjugiert werden.

Die Anregung von PE bei 488 nm führt zur Emission von gelbem Licht (575 nm), dessen Photonen dann das direkt benachbarte Cyanin-5 zur Emission von dunkelrotem Licht anregen (Energietransfer). Dementsprechend leuchtet die von PC5 emittierte Fluoreszenz in einem tief-roten Licht mit einer Wellenlänge von 670 nm.

In Abb. 3-1 ist der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers mit einem Argon-Laser (blauer Lichtstrahl bei 488 nm) dargestellt, der es ermöglicht, fünf Detektionsparameter zu messen: zwei Lichtdetektoren für die Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung und drei *photomultiplier tubes* (PMT), besonders empfindliche Photodetektoren, für die Detektion der von den Zellen emittierten Fluoreszenzsignale (Pharmingen, *technical protocols*).

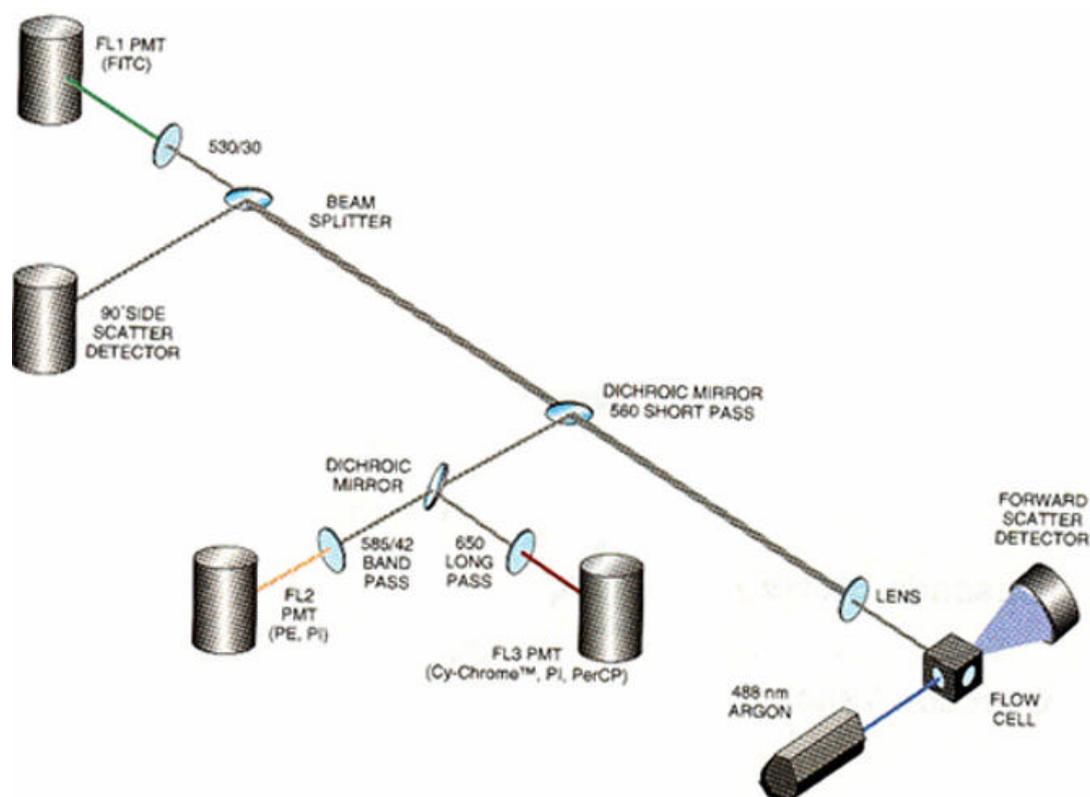


Abb. 3-1: Schematischer Aufbau eines *single laser* Durchflusszytometers mit den Angaben der verschiedenen Spiegel, Filter, Fluoreszenzfarbstoffe und deren jeweiligen Farbemissionen (Pharmingen, *technical protocols*).

3.2.1.1.3 Dreifarbenfluoreszenz

Die Zytokinproduktion der Monozyten nach mehrstündiger Stimulation *ex vivo*, ebenso wie die Koexpression des HLA-DR-Oberflächenmoleküls auf den CD14⁺CD16⁺ Zellen und klassischen CD14⁺⁺ Monozyten im Vergleich, wurde durch Mehrfarbenfluoreszenz von frischem Vollblut (WPB) bestimmt. Bei den Messungen zur CD16-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten mit gesunden Probanden wurden die angefärbten Zellen am FACScan-Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) und bei den gleichen Analysen mit Patientenblut am Epics XL-Durchflusszytometer (Epics XL, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) akquiriert.

3.2.1.2 Intrazelluläre Zytokinanalyse

3.2.1.2.1 Stimulierung der Zellen

Für die intrazelluläre Zytokinanalyse werden 600 µl heparinisiertes WPB zunächst mit 10 µg Brefeldin A (BFA, #B-7651, Sigma, München, Deutschland) pro ml WPB zur Blockade des zellulären Proteintransportes versetzt. BFA führt durch Störung des Vesikeltransports zum Golgi-Apparat zur Anhäufung von Proteinen im rauen endoplasmatischen Retikulum. Eine Probe wird unstimuliert belassen, während zu den anderen Röhren entweder 100 ng (bei den Dosismessungen zusätzlich 0,1; 1; 10 und 1000 ng) LPS (Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota*, #L-6261, Sigma) oder 100 µg LTA (Lipoteichonsäure von *Streptococcus pyogenes*, #L-3140, Sigma) pro ml WPB hinzugefügt wird. Zur Kontrolle einer möglichen LPS-Kontamination werden Kulturen mit und ohne Zugabe von 10 µg Polymyxin B (PMB, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) pro ml WPB angesetzt. Anschließend werden die Proben für die unterschiedlichen Zeiten (0; 0,5; 1; 2; 4 und 6 h) beim Zeitverlauf, für 4 h bei den Patientenmessungen und für 6 h bei den Spezifitätskontrollen und den Dosismessungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

3.2.1.2.2 Oberflächenanfärbung

Nach der Inkubation werden die Erythrozyten der Blutkulturen zunächst durch Zugabe von 14 ml Ammoniumchloridlösung bei RT lysiert. Die Leukozyten werden anschließend mit einer sättigenden Konzentration an CD14 mAk (322A-1/MY4-FITC bzw. MEM18-FITC) und an HLA-DR mAk (Immu357-PC5) für 20 Minuten auf Eis angefärbt. Dabei wurde 322A-1/MY4-FITC in den ersten Experimenten zu Dosis- und Zeitverläufen mit Blut von gesunden Probanden aus dem Institut verwendet, während MEM18-FITC in den folgenden Versuchen über die Zytokinproduktion der Monozyten von Erysipelpatienten im Vergleich zu Monozyten offensichtlich gesunder Kontrollpersonen benützt wurde.

3.2.1.2.3 Intrazelluläre Anfärbung

Um die intrazelluläre Zytokinexpression messen zu können, müssen die Zellen vor der Anfärbung fixiert und permeabilisiert werden. Die Fixation der Zellen dient zur Bewahrung ihrer zellulären Integrität während der nachfolgenden Permeabilisation der Zellmembran und der Inkubation mit dem anti-Zytokin-Antikörper.

Hierzu werden die Zellen nach der oben beschriebenen Oberflächenanfärbung und einem anschließenden Waschschritt (diesmal mit LPS-freiem PBS) mit 1 ml PBS / 4 % PFA bei RT für 20 Minuten im Dunkeln fixiert. Daraufhin wird das PFA durch zweimaliges Waschen entfernt und das Pellet in der Perm / Wash-Lösung (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Anschließend werden monoklonale Antikörper gegen TNF (10 µg / ml, MP9-20A4-PE in den ersten Experimenten zu Dosis und Zeit und MAb11-PE in den nachfolgenden Versuchen mit den Erysipelpatienten), IL-1β (5 µg / ml, 8516.311-PE) bzw. IL-6 (10 µg / ml, MQ2-6A3-PE) hinzugegeben (die in Klammern angegebenen Konzentrationsangaben stellen die jeweiligen Endkonzentrationen dar). Als Negativkontrolle wird entweder die zugehörige Isotypkontrolle verwendet oder es wird das jeweilige rekombinante humane (rh) Protein im Überschuss zum relevanten mAk hinzugegeben (s. unten). Nach einer Inkubation für 20 Minuten wird abschließend zweimalig gewaschen und die Zellen werden in PBS / 0,5 % PFA resuspendiert, um innerhalb von 24 h am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) akquiriert zu werden.

3.2.1.2.4 Spezifitätskontrolle der anti-Zytokin-Antikörper

Zur Bestimmung der Spezifität der TNF-Anfärbung wurde der relevante anti-TNF-mAk [9 µg / ml] mit zehnfachem molarem Molekülüberschuss an rhTNF [11,7 µg / ml] zehn Minuten bei RT vorinkubiert und erst anschließend zu den permeabilisierten Zellen gegeben. Ebenso wurde die Spezifität des anti-IL-1β-mAk [5 µg / ml] geprüft, wobei diesmal ein 11-facher molarer Molekülüberschuss des rhIL-1β [6,25 µg / ml] verwendet wurde. In Klammern sind die jeweiligen Endkonzentrationen angegeben.

Bei der Spezifitätsbestimmung des mAk gegen IL-6 mussten die IL-6-Rezeptoren auf allen Zellen blockiert werden, denn das rhIL-6 wird an den IL-6-Rezeptoren gebunden und verstärkt das Fluoreszenzsignal unspezifisch auf allen Leukozyten, anstatt das positive Signal zu inhibieren.

Nachfolgend ein Flussdiagramm zur Vorgehensweise bei der Spezifitätsbestimmung des mAk gegen IL-6:

Blockade der IL-6-Rezeptoren durch Zugabe von rhIL-6 [12 µg / ml] und 20-minütiger

Inkubation auf Eis



Einmaliges Waschen mit PBS / 2% FKS / 0,1% NaN₃



Zellen in Waschpuffer aufnehmen, unkonjugierten mAk gegen IL-6 (20 µg / ml, MQ2-6A3-PE) hinzugeben und gleichzeitig mit einer sättigenden Konzentration an CD14 mAk und HLA-DR mAk im Dunkeln 20 Minuten auf Eis inkubieren



Einmaliges Waschen mit LPS-freiem PBS



Zellpellet in 1 ml PBS / 4% PFA resuspendieren und bei RT für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren, so dass rhIL-6 plus anti-IL-6 auf der Oberfläche der Leukozyten fixiert werden



Pelletieren und zweimaliges Waschen mit PBS / 2% FKS / 0,1% NaN₃ (wenn nötig, die nun fixierten Zellen nach erstem Waschschrift im Waschpuffer aufnehmen, so dass sie 24 h lang bei 4 °C gelagert werden können)



Vorinkubation des mAk gegen IL-6 (10 µg / ml, MQ2-6A3-PE) mit zehnfachem Überschuss an rhIL-6 [12 µg / ml] 10 Minuten im Dunkeln bei RT



Währenddessen: Permeabilisation der Zellen mit Hilfe der Perm / Wash-Lösung für 5 Minuten



Zugabe des Vorinkubats zu den permeabilisierten Zellen und 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubieren



Zweimaliges Waschen mit LPS-freiem PBS



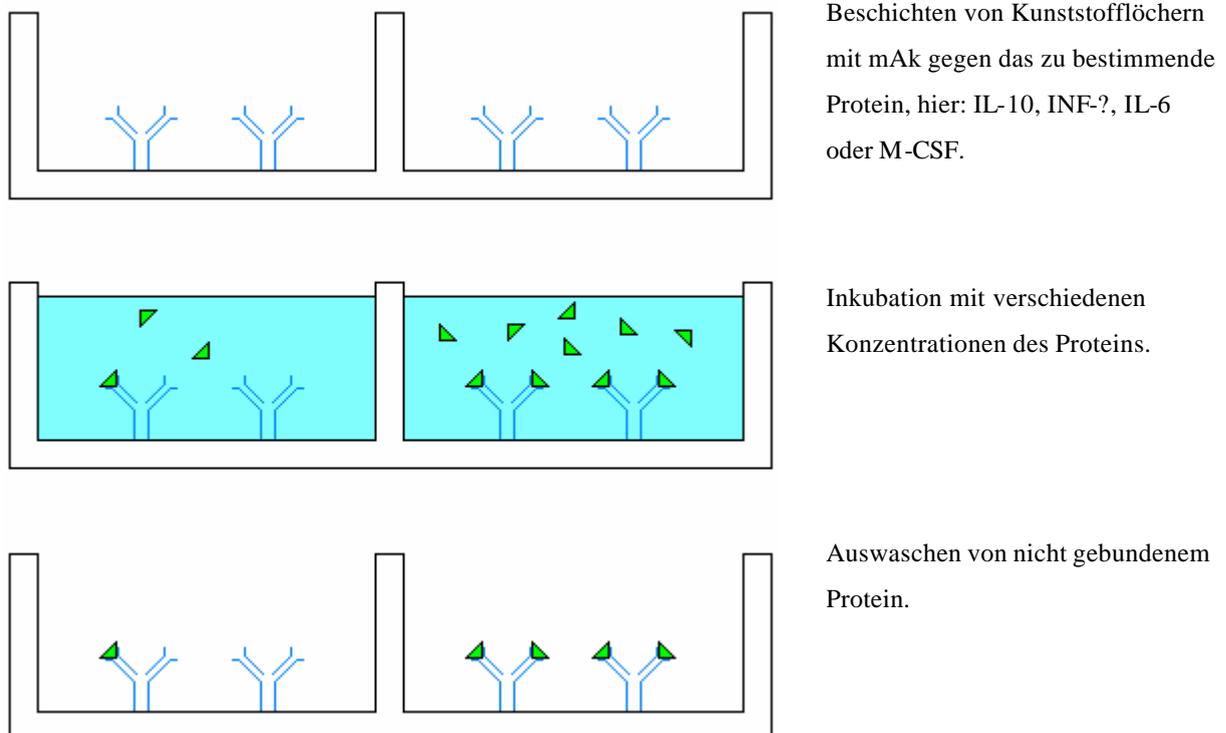
Pellet in PBS / 0,5% PFA aufnehmen und innerhalb von 24 h am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) akquirieren.

3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.2.1 Prinzip des Testes

Der Sandwich- (oder Capture-) ELISA ist eine spezifische Methode zur Zytokinbestimmung (z.B. im Serum), weil er ein Hauptproblem biologischer Zytokintests umgeht, nämlich dass verschiedene Zytokine dieselbe Zellreaktion auslösen können. Er weist die Verknüpfung zweier mAk nach, die mit verschiedenen Epitopen an einem Zytokinmolekül binden. Dabei werden unmarkierte mAk gegen das zu bestimmende Protein auf einem Kunststoffträger fixiert. Nach Hinzufügen der zu untersuchenden Flüssigkeit (Zellüberstände, Serum, Plasma) und einem anschließenden Waschschrift lässt sich das gebundene Molekül durch einen zweiten, diesmal markierten mAk nachweisen, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist (s. Abb. 3-2).

Der Test ist deshalb hochspezifisch, da Antigene, die mit einem Antikörper kreuzreagieren, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auch noch an den zweiten binden (26).



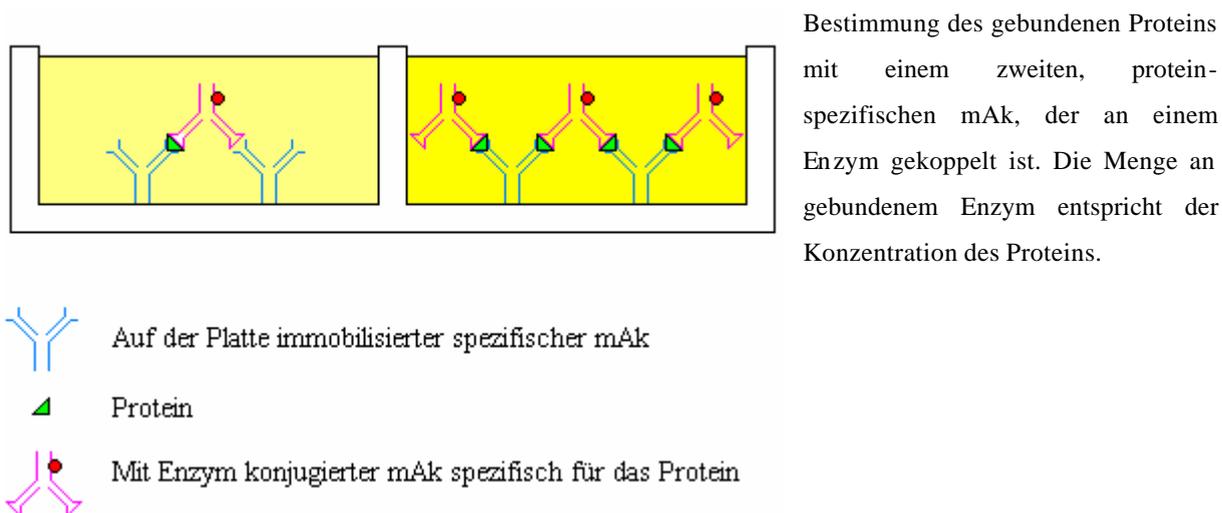


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs (modifiziert nach 26).

3.2.2.2 IL-6, IL-10 und IFN- γ -ELISA

Alle drei Zytokin-ELISA wurden bei der Firma PeliKine, Amsterdam, Niederlande, gekauft (IL-6, #M1916, Detektionsgrenze von 4,4 pg / ml; IL-10, #M1910, Detektionsgrenze 18,2 pg / ml; IFN- γ , #M1933, Detektionsgrenze 28,0 pg / ml) und besitzen dementsprechend ein ähnliches Protokoll.

Da die Mikrotiter-Platten noch nicht beschichtet sind, muss man am Vortag des eigentlichen ELISA den ersten mAk im Beschichtungspuffer verdünnt in alle 96 Kunststofflöcher (*wells*) auftragen. Die Inkubation findet dann bei RT über Nacht statt. Nach einem Waschschrift (der aus viermaligem Aspirieren des Überstandes und dreimaligem Wiederauffüllen mit 300 μ l Flüssigkeit besteht) mit PBS wird die nicht von spezifischem Antikörper bedeckte Oberfläche der Vertiefungen durch Zugabe von Serumproteinen im Überschuss abgesättigt, d.h. blockiert. Dies geschieht durch eine einstündige Inkubation bei RT mit der Blockierungslösung, in der nur Proteine enthalten sind, die weder mit dem später dazugegebenen Antigen noch mit den Antikörpern reagieren.

Während dieser einen Stunde werden der vorgegebene Zytokinstandard (der später bei der Auswertung als Referenzkurve dienen wird) und die Proben mit dem Verdünnungspuffer in Eppendorfgefäßen (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH) vorbereitet. Dabei werden die Proben soweit verdünnt, dass die Messwerte später noch innerhalb des linearen Bereichs der Referenzkurve zu liegen kommen und dadurch die zu messenden Konzentrationen berechnet werden können.

Mit dem zweiten Waschschrift (ab jetzt immer mit Waschpuffer) ist die Beschichtung der Platten abgeschlossen. Daraufhin werden in alle *wells*, außer den zwei für den Leerwert, jeweils 100 µl der vorbereiteten Standard- oder Probenverdünnungen als Doppelwerte pipettiert. Nach einstündiger Inkubation (ab hier wenn möglich immer auf einem Schüttelgerät) bei RT werden die Proben und Standards mit dem nächsten Waschschrift entfernt.

Anschließend kommt der mit dem Verdünnungspuffer vermischte biotinylierte mAk in alle Vertiefungen (bis auf die zwei für den Leerwert). Auch jetzt wird wieder für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem vierten Waschvorgang wird mit dem nächsten Inkubationsschritt das mit der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) konjugierte Streptavidin an der biotinylierten Seite des Sandwich-ELISA gebunden.

Im nächsten Waschschrift wird ungebundenes HRP-Konjugat entfernt und anschließend Substratlösung dazugegeben. Die blaue Farbreaktion des Substrats (hier TMB und H₂O₂) wird durch Schwefelsäure (Stopplösung) unterbrochen und die Absorption mit dem ELISA-Messgerät (Spectra Count, Canberra, Heidelberg, Deutschland) im gelben Farbbereich bei 450 nm gemessen. Dabei entspricht die Menge an gebildetem Farbstoff der Menge an gebundenem Ak. Durch die Absorptionsstärke der Proben im Vergleich zu der Absorptionsstärke der Standards kann die Konzentration des zu berechnenden Proteins (hier humanes IL-6, IL-10 oder IFN-γ) durch die Interpolation auf die Standardkurve bestimmt werden.

3.2.2.3 M-CSF-ELISA

Auch dieser Kit (M-CSF, R&D Systems (Quantikine), #DMC00, Detektionsgrenze 157,5 pg / ml) arbeitet mit dem Prinzip des quantitativen Sandwich-ELISA, doch gibt es einige Unterschiede zum vorherigen Protokoll.

Hier sind die Mikrotiterplatten mit dem mAk schon vorher beschichtet worden, so dass die Proben und Standards direkt in die Vertiefungen pipettiert werden können. In diesen Vertiefungen wird das M-CSF durch den immobilisierten spezifischen anti-M-CSF-mAk nach eineinhalb Stunden Inkubationszeit (für eine höhere Sensitivität am besten auf einem Schüttelgerät) bei RT gebunden.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird ein spezifisch gegen M-CSF gerichteter mAk, an dem die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist,

in die Vertiefungen hinzugegeben. Dieser Nachweisantikörper wird ebenfalls eineinhalb Stunden bei RT in den *wells* belassen. Im Anschluss an den zweiten Waschschrift (um die ungebundenen HRP-markierten mAks zu entfernen) wird die Substratlösung in alle *wells* gegeben, wo sie eine blaue Farbreaktion auslöst, die in ihrer Intensität der initial gebundenen M-CSF-Menge entspricht. Durch Schwefelsäure wird die Farbentwicklung nach 30 Minuten unterbrochen und die Farbabsorption in den jeweiligen *wells* wird in dem dafür vorgesehenen ELISA-Messgerät (Spectra Count) bei 450 nm gemessen.

3.3 Statistische Methoden

Für den Vergleich zwischen Leukozytenzahlen von Patienten und Kontrollspendern wurde der t -Test für unverbundene Stichproben herangezogen. Der Wilcoxon-Test wurde für den Vergleich der Daten der intrazellulären Zytokinexpression verwendet. Zur Beurteilung von Korrelationen wurde die polynomiale Regressionsanalyse benützt. Alle Durchschnittswerte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (61).

4 Ergebnisse

4.1 Die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl am Tag 1

Es wurden 12 Patienten (mit durchschnittlichem Alter von 57 ± 13 Jahre) mit der Diagnose einer Erysipelkrankung basierend auf dem typischen klinischen Bild dieser Hautentzündung, der erhöhten Entzündungsparameter (erhöhtes CRP und beschleunigte BKS) und Anstieg oder Abfall des Antikörpertiters gegen Streptokokken-Antigene untersucht. Über den gesamten Zeitraum der Studie hinweg wurden in der Dermatologischen Klinik der LMU-München in etwa die gleiche Anzahl an weiblichen wie an männlichen Patienten mit der Verdachtsdiagnose Erysipel aufgenommen (von 33 Patienten 17 Frauen und 16 Männer). Bemerkenswert dabei war, dass letztendlich die Geschlechterverteilung nur drei Frauen und neun Männer betrug, nachdem zwei Drittel der Patienten aufgrund fehlender serologischer Evidenz ausgeschlossen worden waren.

Es traten die Hauterscheinungen entweder im Gesicht oder an den Unterschenkeln auf, wobei neun Patienten die Läsion an einem der beiden Unterschenkel aufwiesen und bei drei der 12 Patienten die Gesichtshaut betroffen war. Von allen Patienten hatten acht zum ersten Mal ein Erysipel und vier ein Rezidiv (s. Tab. im Anhang).

Bei allen Erysipelpatienten wurden als erstes die Monozyten-Subpopulationen am Aufnahmezeitpunkt (Tag 1) durch Zweifarbenfluoreszenzanalyse untersucht und deren Zellzahlen bestimmt. Wie in der Abb. 4-1 verdeutlicht wird, hatte der Erysipelpatient (Abb. 4-1, rechtes Bild) im Vergleich zum Kontrollspender (34 Zellen / μl ; Abb. 4-1, linkes Bild), mit 182 Zellen / μl Vollblut (WPB) eine stark erhöhte Zellzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Dies war bei 11 der 12 in die Studie aufgenommenen Patienten der Fall, wobei 10 von ihnen einen Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozyten auf über 100 Zellen / μl WPB am ersten Tag ihres Krankenhausaufenthaltes hatten, was bei keinem einzigen Kontrollspender vorkam. Von den zwei verbliebenen Erysipelpatienten lag einer mit 91 Zellen / μl noch deutlich über dem Bereich zweier Standardabweichungen der Kontrollwerte (8,9 – 88,5 Zellen / μl) und nur einer befand sich mit 35 Zellen / μl innerhalb dieses Bereiches (s. Tab. 1 und Abb. 4-2).

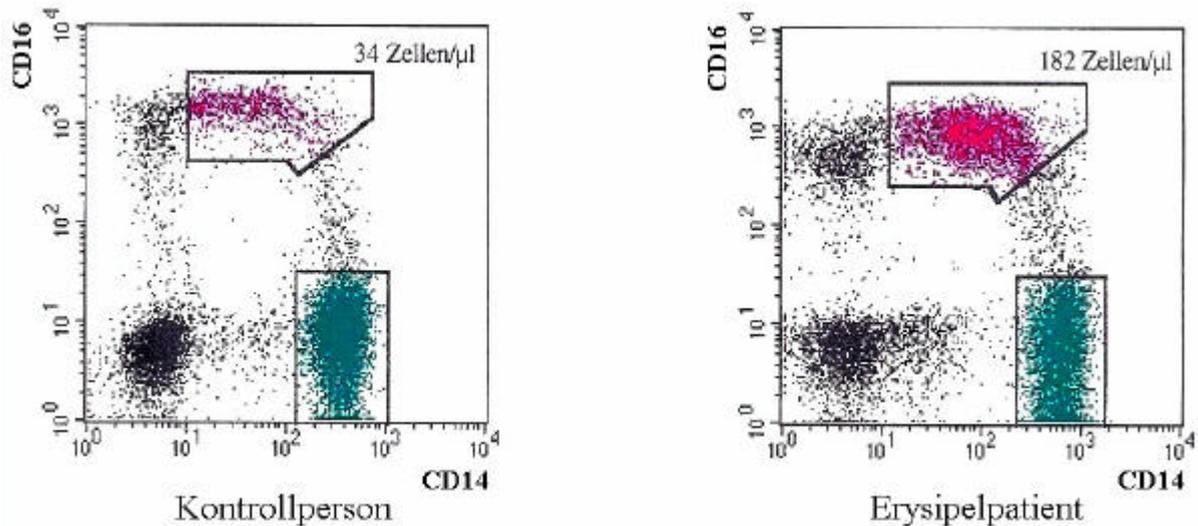


Abb. 4-1: Beispiel der Vermehrung der $CD14^+CD16^+$ Monozyten beim Erysipel. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Vollblutproben mit $CD14$ mAk und $CD16$ mAk angefärbt und die Monozytenpopulationen per FACS analysiert. Die absolute Zellzahl der $CD14^+CD16^+$ Monozyten ist jeweils in der rechten oberen Ecke der Zweifarbenpunktdiagramme gegeben.

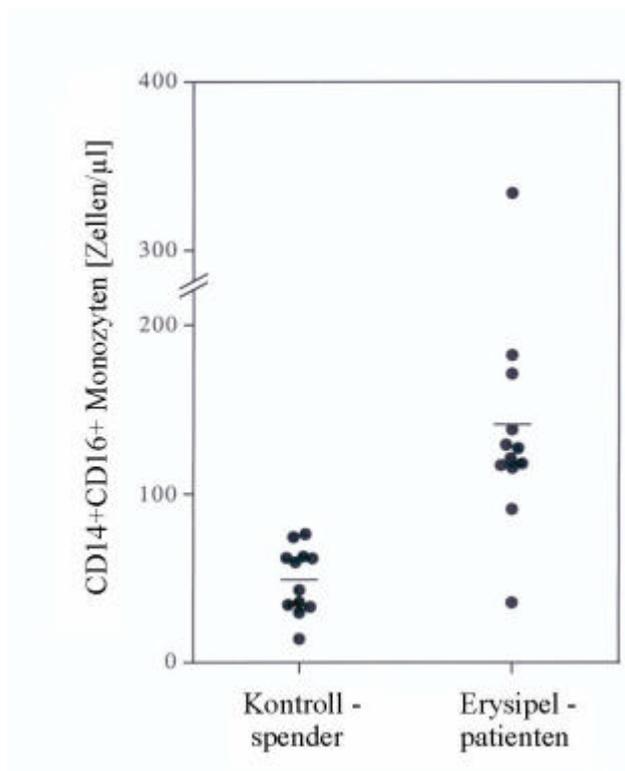


Abb. 4-2: Absolute Zellzahlen der $CD14^+CD16^+$ Monozyten bei 12 Kontrollspendern und 12 Erysipelpatienten am Aufnahmetag (Tag 1). Die $CD14^+CD16^+$ Monozyten wurden durch FACS-Analysen bestimmt. Die Striche (—) stellen die Mittelwerte dar. Der Unterschied ist mit $p < 0,05$ signifikant.

Der durchschnittliche Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl aller Patienten lag bei $140,8 \pm 73,9$ Zellen / μl , was im Vergleich zu den Werten der Kontrollpersonen signifikant höher war ($48,7 \pm 19,9$ Zellen / μl). Diese Verdreifachung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl war viel deutlicher ausgeprägt als bei den klassischen CD14⁺⁺ Monozyten, die von $284,9 \pm 95,6$ auf $480,7 \pm 197,4$ Zellen / μl (Faktor 1,7; $p < 0,05$) anstiegen. Dementsprechend war auch der relative Anteil der CD14⁺CD16⁺ Subpopulation, als Prozentsatz aller Monozyten (CD14⁺CD16⁺ plus CD14⁺⁺), im akuten Stadium der Erkrankung von $13,6 \pm 3,5$ % bei den offensichtlich gesunden Kontrollspendern auf $21,5 \pm 8$ % bei den Erysipelpatienten signifikant erhöht ($p < 0,05$, s. Tab. 1).

Tabelle 1: Absolute und relative Zellzahlen der CD14⁺⁺ und CD14⁺CD16⁺ Monozyten im Vergleich von Erysipelpatienten und Kontrollpersonen.

	Alters- durchschnitt	Geschlechter- verteilung	CD14 ⁺⁺ Monozyten		CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	
			absolute Zahl [Monozyten/ μl]	relative Zahl [% aller Monozyten]	absolute Zahl [Monozyten/ μl]	relative Zahl [% aller Monozyten]
Patienten	57	9m & 3w	$480,7 \pm 197,4$	$70,7 \pm 8,8$	$140,8 \pm 73,9$	$21,5 \pm 8$
Kontrollen	57	7m & 5w	$284,9 \pm 95,6$	$80,9 \pm 6,2$	$48,7 \pm 19,9$	$13,6 \pm 3,5$
t-Test			$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

4.2 Veränderung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahl im Verlauf

Nach Aufnahme der Patienten in die Klinik besserte sich deren Zustand durch die adäquate Antibiotika- und Lokaltherapie rapide, was sich auch in der Dynamik der relativen und absoluten CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahl widerspiegelt. Die Veränderungen der CD14⁺CD16⁺ Monozytensubpopulation im Verlauf der Erkrankung wurden über 5 Tage hinweg bei 5 der 12 Patienten gemessen. Wie in Abb. 4-3 zu sehen ist, stieg die CD14⁺CD16⁺ Zellzahl bei 4 der 5 Erysipelpatienten initial an und fiel anschließend innerhalb weniger Tage wieder in den Normbereich der gesunden Kontrollpersonen ab (Mittelwert \pm zwei Standardabweichungen). Während bei zwei dieser Erysipelpatienten die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl sofort abfiel, stieg sie bei den zwei anderen Patienten bis zum zweiten Tag noch an, bevor sie in allen 4 Fällen bis zum 5. Tag wieder auf Werte innerhalb des Normbereiches zurückging. Der Patient mit der niedrigen CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl am Anfang der Erkrankung blieb auch während des gesamten Beobachtungszeitraumes innerhalb des Normbereiches auf niedrigem Niveau.

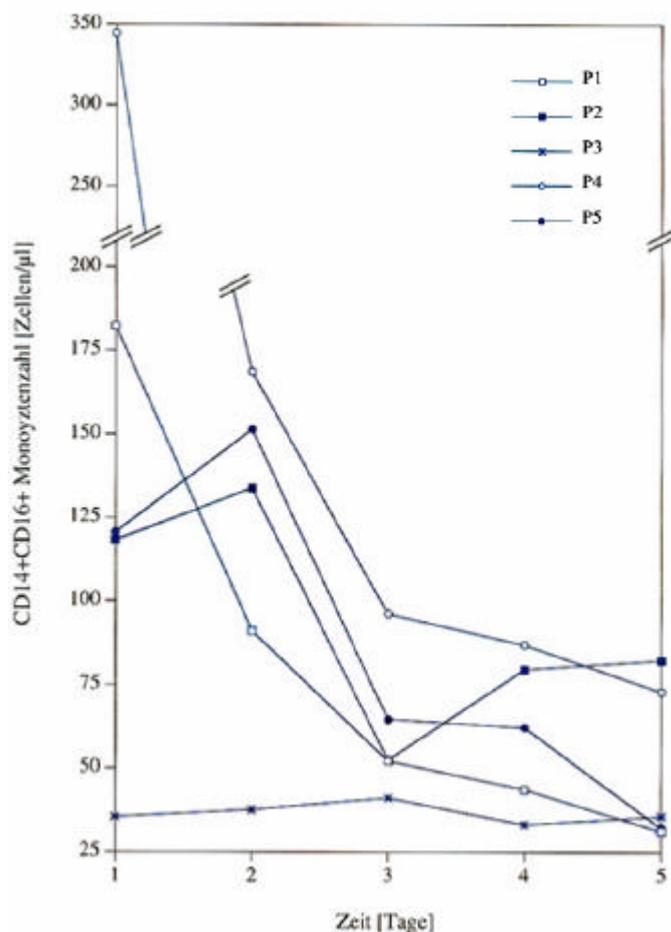


Abb. 4-3: Zellzahlverlauf der CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei Erysipelpatienten. Es sind die Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten von fünf Patienten angegeben, die über fünf Tage hinweg analysiert wurden. Zwei der Zellzahlverläufe sinken kontinuierlich ab, zwei andere steigen am zweiten Tag noch deutlich an bevor sie in den Normbereich absinken und ein Patient bleibt über den ganzen Zeitraum hinweg im Normbereich.

In Abb. 44 ist an einem der fünf Zellzahlverläufe zu sehen, wie sich die $CD14^+CD16^+$ Monozyten in der Zweifarbenfluoreszenz über fünf Tage hinweg darstellten: am Tag 1 gingen die Zellen kontinuierlich von den klassischen $CD14^{++}$ Monozyten über eine Zwischenstufe von $CD14^{++}CD16^+$ Zellen in die $CD14^+CD16^+$ Monozyten über, dabei waren die verschiedenen Zellpopulationen kaum voneinander abgrenzbar. Am 2. und 3. Tag verschoben sich die Mehrzahl der Zellen weiter in den Bereich der $CD14^+CD16^+$ Monozytenzellwolke, wobei die Zellen das CD14 immer schwächer und das CD16 immer stärker exprimierten. Schließlich sieht man am Tag 4 noch eine etwas verstärkte $CD14^+CD16^+$ Monozytenzellwolke, bevor sie sich am letzten Tag der Verlaufsuntersuchung wieder normalisiert.

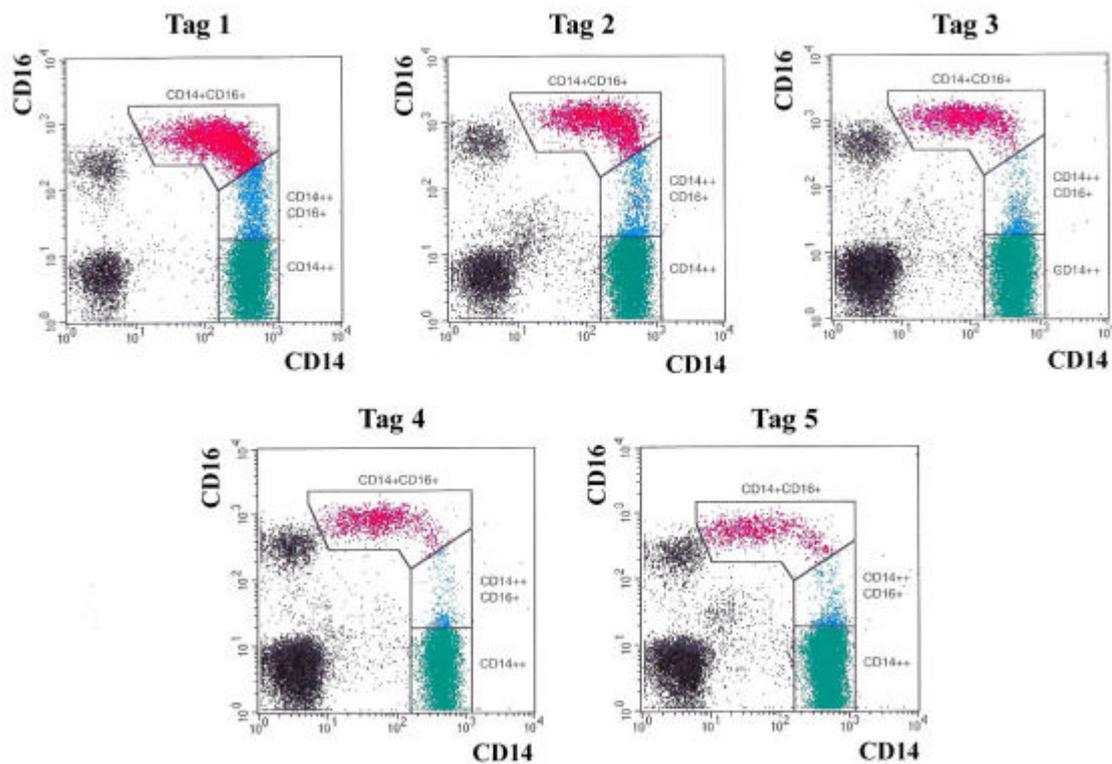


Abb. 44: $CD14^+CD16^+$ Monozyten über fünf Tage bei einem Erysipelpatienten exemplarisch im Verlauf. Dargestellt sind die für jeden einzelnen Tag zugehörigen und durch Anfärbung mit den mAk anti-CD14-FITC und anti-CD16-PE gewonnenen Zweifarbenpunktdiagramme.

4.3 Korrelationen der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahlen zu klinischen Parametern

Als nächstes wurde untersucht, ob es bei den Erysipelpatienten Zusammenhänge zwischen erhöhten CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahlen und klinischen Erscheinungen ihrer Erkrankung gab. Dabei wurden klinisch wichtige Entzündungsparameter wie die BKS, das CRP und Fieber berücksichtigt.

4.3.1 Korrelation zur Blutkörperchengeschwindigkeit (BKS)

Außer bei den zwei Patienten, bei denen die BKS nicht bestimmt wurde, hatten alle Erysipelpatienten sowohl in der ersten als auch in der zweiten Stunde eine beschleunigte Absenkung ihrer Blutkörperchen. Dabei gab es aber keine Korrelation zwischen einer erhöhten BKS und der jeweiligen CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahl des Patienten (s. Tab. im Anhang und Tab. 2).

Tabelle 2: Korrelationen erhöhter CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahlen zu wichtigen klinischen Entzündungsparametern.

	BKS 1.Stunde [mm]	CRP [mg / dl]	Temperatur [°C]
Patientendurchschnittswert ± Standardabweichung	54,6 ± 19,4	9,6 ± 9,3	37,2 ± 0,9
Polynomiale Regression in Bezug auf die CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, Korrelations-Koeffizient	0,5	0,7	0,7
Test für die Prädiktion	$p > 0,05$	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$

*Eine Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Zellen korrelierte nur mit dem CRP und der Temperatur signifikant.

4.3.2 Korrelation zum C-reaktiven Protein (CRP)

Auch das C-reaktive Protein war bei Erkrankungsbeginn bei allen 12 Erysipelpatienten deutlich über dem Normbereich von 0 - 0,5 mg / dl. Diesmal ging aber eine deutlichere Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl beim gleichen Patienten mit einer stärkeren Erhöhung des CRP einher, d.h. beide Parameter korrelierten signifikant ($p < 0,05$) miteinander (s. Tab. im Anhang und Tab. 2).

4.3.3 Korrelation zur Temperatur

Die Körpertemperatur war nur bei vier von allen 12 Erysipelpatienten über 37,0 °C erhöht, aber auch dieser Parameter korrelierte signifikant ($p < 0,05$) mit der Zahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten beim jeweiligen Patienten (s. Tab. im Anhang und Tab. 2).

4.4 Korrelationen der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahlen zu Serumzytokinspiegel

Um zu analysieren, welche Mediatoren an der verstärkten Produktion bzw. Differenzierung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten beteiligt sein könnten, wurden von allen 12 Patienten am ersten Tag ihres Krankenhausaufenthaltes Serumproben abgenommen, bei -80 °C eingefroren und später mittels ELISA-Technik auf folgende Zytokine hin untersucht: IFN- γ , IL-10, IL-6 und M-CSF.

4.4.1 Korrelation zu Interferon-gamma (IFN-g) und Interleukin-10 (IL-10)

Es konnte, wie in Tab. 3 angegeben, weder IFN- γ noch IL-10 im Serum der Erysipelpatienten am Tag 1 gemessen werden (Nachweisgrenze 28,0 pg / ml für IFN- γ und 18,2 pg / ml für IL-10).

Tabelle 3: Vergleich der Serumzytokinwerte von M-CSF, IL-6, IL-10 und IFN- γ zwischen Erysipelpatienten und Kontrollspender. Nach dem Wiederauftauen des eingefrorenen Serum wurden ELISA-Kits für die vier verschiedenen Zytokine gemäß den Herstellerprotokollen durchgeführt. Korrelationen erhöhter CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahlen zu den Zytokinen M-CSF, IL-6, IL-10 und IFN- γ gab es keine.

	M-CSF [pg / ml]	IL-6 [pg / ml]	IL-10 [pg / ml]	IFN- γ [pg / ml]
Patientendurchschnittswert \pm Standardabweichung	652,4 \pm 318,9	65,5 \pm 134,9	< 18,2	< 28,0
Kontrollendurchschnittswert \pm Standardabweichung	354,9 \pm 134,9	5,2 \pm 2,6	20,5 \pm 7,6 ¹⁾	< 28,0
Polynomiale Regression in Bezug auf die CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, Korrelations-Koeffizient	0,2	0,3	TNA ²⁾	TNA ²⁾
Vgl. Patienten zu Kontrollen, t-Test	$p < 0,05$	$p = 0,08$		

¹⁾ Ein Kontrollspender lag mit 43,4 pg / ml über der Nachweisgrenze.

²⁾ Test nicht ausgeführt.

4.4.2 Korrelation zu Interleukin (IL-6)

Das Zytokin IL-6 war im Serum von neun der 12 Erysipelkranken mit einem Durchschnittswert von 65,5 pg / ml über den Normbereich der Kontrollgruppe ($5,2 \pm 2,6$ pg / ml) erhöht, während er bei den drei restlichen Patienten den Kontrollwerten entsprach. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen war aufgrund der hohen Streuung der Werte (Standardabweichung von $\pm 134,9$) nicht signifikant ($p = 0,08$). Auch in Bezug auf die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl korrelierte die Zytokinproduktion von IL-6 ($p > 0,05$; s. Tab. 3) nicht, obwohl tendenziell Patienten mit hohen CD14⁺CD16⁺ Monozytenzahlen auch hohe IL-6-Konzentrationen bzw. mit niedrigen Zellzahlen auch niedrige Zytokinkonzentrationen aufwiesen (s. Tab. im Anhang).

4.4.3 Korrelation zum Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF)

Im Gegensatz zu den anderen Zytokinen konnte bei der Bestimmung des M-CSF im Serum der Patienten mit einer durchschnittlichen Konzentration von $652,4 \pm 318,9$ pg / ml ein deutlicher und im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg festgestellt werden (s. Tab. 3). Trotzdem gab es auch hier keine signifikante Korrelation zwischen der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl und M-CSF (s. Tab. 3 und Tab. im Anhang). In Abb. 4.5 ist der Verlauf der M-CSF-Serumkonzentration über fünf Tage bei den fünf Patienten dargestellt, bei denen auch die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl über diesen Zeitraum hinweg beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.3).

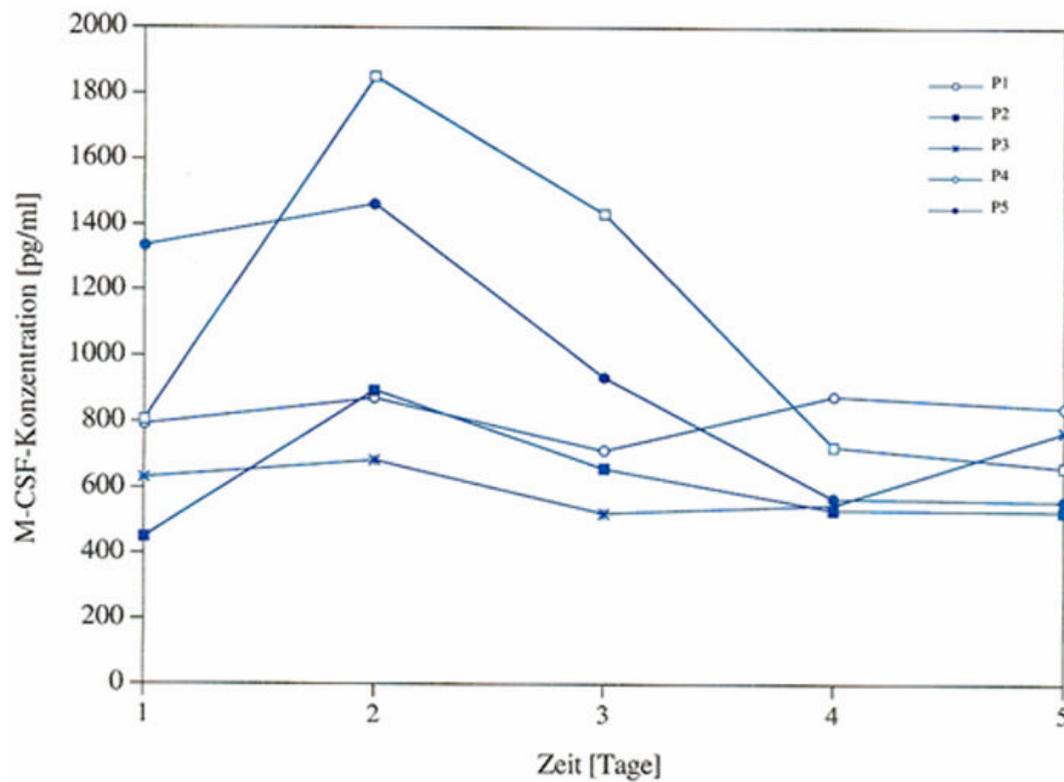


Abb. 4-5: M-CSF-Serumkonzentrationen bei Erysipelpatienten. Es sind die Konzentrationen von M-CSF der fünf Patienten angegeben, bei denen auch die Monozytenzellzahl über fünf Tage hinweg analysiert wurde. Die M-CSF-Konzentrationen wurden mittels ELISA-Technik aus (bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingefrorenem Serum ermittelt. Alle fünf Patienten zeigen einen erhöhten Zytokinpiegel auf, der auch am fünften Tag noch nicht in den Normbereich abgefallen ist.

Dabei wird sichtbar, dass bei allen fünf Patienten die Konzentration des M-CSF im Serum am zweiten Tag noch ansteigt, um dann bis zum fünften Tag wieder auf Werte noch oberhalb des Normbereichs der Kontrollgruppe ($> 489,8\text{ pg / ml}$) abzufallen.

4.5 Produktion der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 durch Monozytenpopulationen bei gesunden Probanden

Als nächstes wurde die immunologische Antwort der Monozyten bei offensichtlich gesunden Probanden nach einer *ex vivo* Stimulation untersucht. Dafür wurden Vollblutproben mit LPS [100 ng / ml], bei den Dosismessungen in den jeweiligen Konzentrationen, oder mit LTA [100 μ g / ml] und PB [10 μ g / ml] für mehrere Stunden (s. 3.2.1.2.1) in Anwesenheit von BFA [10 μ g / ml] stimuliert und anschließend mit Oberflächenmarkern und intrazellulären fluoreszierenden Antikörpern angefärbt.

4.5.1 Problematik der Stimulation

Bei allen Experimenten (auch später bei den Patientenmessungen) wurden die Zellen mit CD14- und HLA-DR-Antikörpern angefärbt, da bei mehrstündiger Stimulation der Monozyten das CD16-Antigen von der Zelloberfläche verschwindet und demzufolge nicht mehr zur Identifizierung der Monozytensubpopulationen hergenommen werden kann. Unter den gleichen Stimulationsbedingungen bleibt das HLA-DR-Antigen auf den schwach CD14-positiven Zellen erhalten (38).

Um aufzuzeigen, dass diese CD14⁺DR⁺⁺ Zellen mit den CD14⁺CD16⁺ Monozyten identisch sind, wurden Dreifarbenfluoreszenzanalysen durchgeführt. Im Zweifarbenpunktdiagramm (*Dot-Plot*-Analyse mit 2 Farbparametern) für die Antigene CD14 und HLA-DR können verschiedene Zellpopulationen klar identifiziert werden: zum einen die DR-positiven Lymphozyten, die von beiden Antigenen nur HLA-DR exprimieren, dann eine Zellpopulation, die CD14 stark und HLA-DR schwach koexprimiert (CD14⁺⁺DR⁺ klassische Monozyten) und schließlich Zellen mit dem Phänotyp CD14⁺DR⁺⁺ (Abb. 4-6, jeweils Mitte). Nach Eingrenzung durch Setzen eines Aufnahme Fensters (*gaten*) im Zweifarbenpunktdiagramm und Analyse dieser CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten auf das Vorhandensein von CD16 an ihrer Oberfläche, konnte bei der Mehrzahl dieser Monozyten das CD16-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 4-6, jeweils oberes Histogramm).

Im gezeigten Beispiel eines gesunden Probanden (Abb. 4-6, linkes oberes Histogramm) waren 94 % der CD14⁺DR⁺⁺ Zellen CD16 positiv mit einem Durchschnitt von $93,1 \pm 2,6$ % bei insgesamt fünf Versuchen. Unter den CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten (Abb. 4-6, linkes unteres Histogramm) waren hingegen nur 2,8 % der Zellen CD16 positiv (Mittelwert von fünf Versuchen: $2,1 \pm 0,5$ %). Auch bei den Monozyten der Erysipelpatienten konnte dies

nachgewiesen werden: wie in Abb. 4-6 (rechtes oberes und unteres Histogramm) aufgezeigt wird, waren in diesem Beispiel von den $CD14^+DR^{++}$ Monozyten 95,4 % für das CD16-Antigen positiv, während von den $CD14^{++}DR^+$ Zellen nur 3,2 % für CD16 positiv waren. Im Durchschnitt von sechs Versuchen waren die $CD14^+DR^{++}$ Monozyten mit $90,2 \pm 4,1$ % und die $CD14^{++}DR^+$ Monozyten mit nur $8,6 \pm 2,5$ % für das CD16-Antigen positiv. Demzufolge kann man sagen, dass die $CD14^+DR^{++}$ Monozyten weitgehend identisch mit den $CD14^+CD16^+$ Monozyten sind und deshalb auch als $CD14^+CD16^+DR^{++}$ Monozyten bezeichnet werden können.

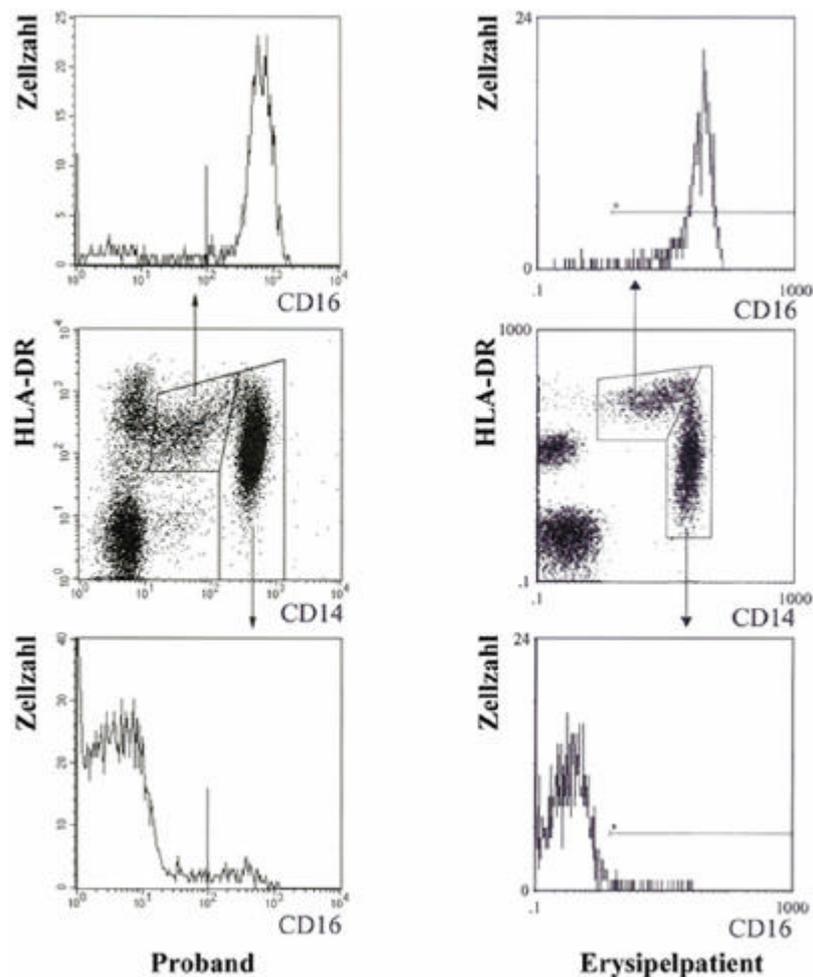


Abb. 4-6: Dreifarbenfluoreszenzanalyse der Monozytensubpopulationen bei gesunden Probanden und bei Erysipelpatienten. Vollblut (WPB) wurde mit mAk gegen CD14, CD16 und DR angefärbt. Bei beiden ist die Mehrheit der $CD14^+DR^{++}$ Monozyten positiv für CD16. Diese $CD14^+DR^{++}$ Monozyten wurden wie in den beiden mittleren Bildern gezeigt eingegrenzt und auf ihre CD16-Expression hin untersucht (jeweils oberes Ein-Farbparameter-Histogramm). Im Beispiel des Probanden waren 93,7 % der $CD14^+DR^{++}$ Monozyten für CD16 positiv, beim Erysipelpatienten waren es 95,4 %. Die CD16-Expression der $CD14^{++}DR^+$ Monozyten betrug beim Probanden 2,8 % und beim Erysipelpatienten 3,2 % (untere Histogramme, Eingrenzung der Zellen analog wie bei den $CD14^+DR^{++}$ Monozyten in beiden mittleren Bildern aufgezeigt).

4.5.2 Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)

Zur Austestung der Antikörperspezifität gegen die drei Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6, ebenso zur Untersuchung der Immunantwort der Monozytenpopulationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration des immunologischen Stimulans, sowie zur Analyse der Zytokinproduktion der Monozytensubpopulationen bei fünf gesunden Probanden, wurde das Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien, zur Stimulation der Zellen eingesetzt (s. auch 2.2.1).

4.5.2.1 Tumornekrosefaktor (TNF)

4.5.2.1.1 TNF-Spezifität der Färbung

Als erstes wurde die Frage, ob der verwendete Antikörper tatsächlich mit dem in der Zelle vorhandenen TNF eine Bindung eingeht, mit Hilfe einer im Protokoll eingefügten zehnmütigen Vorinkubation des relevanten anti-TNF-mAk mit dem rekombinanten humanen (rh) TNF überprüft (s. 3.2.1.2.4). Durch den zehnfachen molaren Molekülüberschuss an rekombinatem Protein werden die freien F_{ab}-Enden der Antikörper abgesättigt, so dass sie nach Zugabe zu den permeabilisierten Monozyten nicht mehr an das intrazelluläre TNF binden. Diese Spezifitätskontrolle des anti-Zytokin-mAk wurde mit der normalen Anfärbung und der zum mAk zugehörigen Isotypkontrolle anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten verglichen.

Im Histogramm der Abb. 4-7 sind nach Eingrenzung der klassischen CD14⁺⁺DR⁺ Monozytenpopulation im Zweifarbenpunktdiagramm die drei Kurven dargestellt, die den drei Anfärbungen entsprechen: von rechts ausgehend als erstes die positive TNF-Anfärbung mit dem Median der Fluoreszenzintensität von 37,2 Kanälen (Mittelwert aus drei Versuchen 53,4 \pm 31,7), dann die Spezifitätskontrolle mit 5,5 Kanälen (Mittelwert 7,6 \pm 4) und schließlich die Isotypkontrolle mit 2,8 Kanälen (Mittelwert 6,7 \pm 3,4).

Dabei wird sowohl bildhaft durch die Kurven wie auch durch die Mittelwerte aus den drei Versuchen deutlich, dass die Spezifitätskontrolle mit rhTNF eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität aufweist als die Isotypkontrolle. Da die Inhibition mit rhTNF die adäquatere Negativkontrolle darstellt, ist dieses Verfahren, wenn möglich, vorzuziehen.

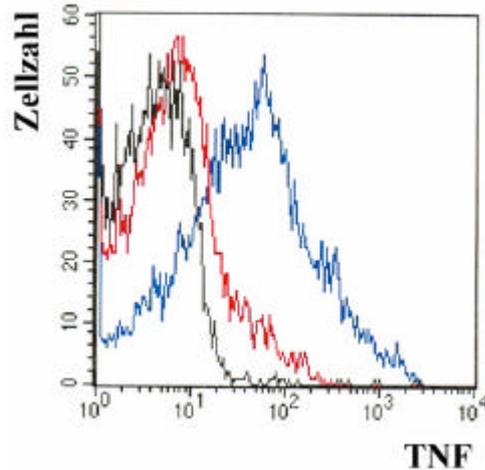


Abb. 47: Überprüfung des anti-TNF-mAk mit Inhibition des TNF-Signals durch Zugabe von rhTNF in zehnfachem molaren Molekülüberschuss nach Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB für sechs Stunden. Es wurden jeweils im Zweifarbenpunktdiagramm die klassischen $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten eingegrenzt und auf ihre TNF-Produktion hin analysiert. Die rechte Kurve ist die normale TNF-Abfärbung (in blau), während die beiden linken Kurven die Spezifitäts (in rot)- und Isotypkontrolle (in schwarz) darstellen.

4.5.2.1.2 TNF-Produktion der $CD14^{+}CD16^{+}$ vs. $CD14^{++}$ Monozyten bei fünf gesunden Probanden

In Abb. 4-8 ein typisches Beispiel aus fünf Versuchen für die TNF-Produktion der beiden Monozytensubpopulationen nach sechsständiger Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB dargestellt. Die jeweils rechten Kurven in den Ein-Farbparameter-Histogrammen (Abb. 4-8, oberes und unteres Histogramm) stellen das positive Signal für die Anfärbung der Zellen mit anti-TNF-Ak dar. Dabei repräsentieren die beiden linken Kurven der zwei Histogramme die Signalintensität der Negativkontrollen, welche in diesem Fall durch die Zugabe der Isotypkontrolle (rat IgG1-mAk) erhalten wurde.

Beide Histogramme zeigen eine deutliche TNF-Expression der zwei Monozytenpopulationen auf, die aber bei den $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten mit Abstand stärker ausgeprägt ist.

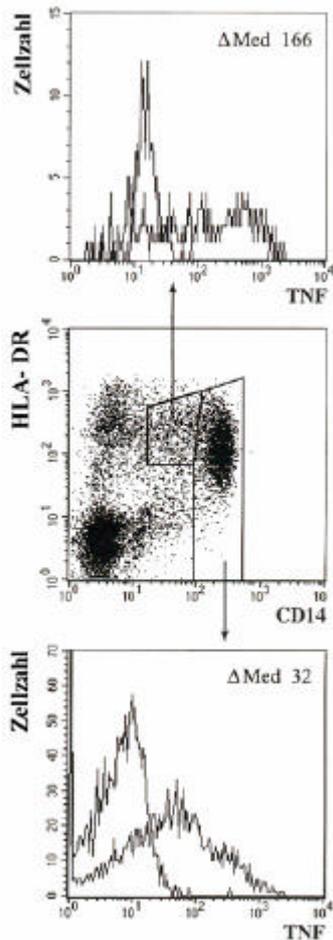


Abb. 4-8: Die TNF-Expression in Monozytensubpopulationen, ein Beispiel aus fünf Versuchen. WPB wurde mit 100 ng LPS pro ml für sechs Stunden in Anwesenheit von BFA stimuliert und anschließend wurden die Zellen mit mAk gegen CD14, DR und TNF angefärbt (mittleres Bild). Gezeigt wird die anti-TNF-Anfärbung (rechte Kurve) neben der Isotypkontrolle (linke Kurve) für die CD14⁺⁺ Zellen (unteres Bild) im Vergleich zu den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten (oberes Bild). Der spezifische Median der Fluoreszenzintensität ist jeweils im oberen rechten Eck beider Histogramme angegeben.

Bei fünf Probanden betrug der Mittelwert der Mediane der Fluoreszenzintensität $37 \pm 16,8$ Kanäle für die klassischen CD14⁺⁺ Monozyten, während die TNF-Expression in den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten einen Durchschnitt der Mediane der Fluoreszenzintensität von $125,4 \pm 55,1$ Kanälen ergab ($p < 0,05$, s. Abb. 4-9).

Das bedeutet, dass das Signal für intrazellulär vorhandenes TNF in diesen Zellen ca. dreimal höher war.

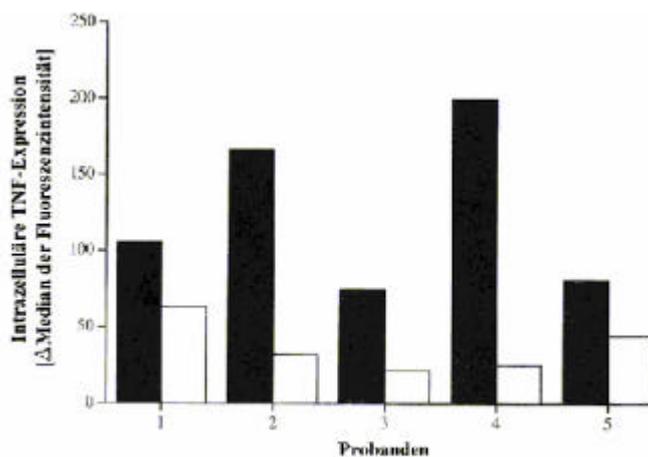


Abb. 4-9: TNF-Produktion der Monozytenpopulationen bei fünf gesunden Probanden. Versuchsansatz wie unter Abb. 4-8 beschrieben. Die schwarzen Balken repräsentieren die TNF-Produktion der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten, die weißen Balken diejenige der CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten. Bei allen Probanden findet eine höhere TNF-Expression in den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten als in den klassischen Monozyten statt.

4.5.2.1.3 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Zytokinproduktion

Um besser einschätzen zu können, nach wie vielen Stunden und bei welcher LPS-Konzentration die Zellen eine optimal messbare Menge an Zytokin produzieren, wurden Zeitverläufe und LPS-Dosistitrationen der TNF-Produktion durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden später bei den Patientenversuchen mitberücksichtigt.

Bei Messung der TNF-Expression durch Monozytensubpopulationen über die Zeit hinweg wurde schon nach einer halben Stunde ein schwaches TNF-Signal bei den $CD14^+DR^{++}$ Monozyten gesehen (mit einem Mittelwert von 12,2 Kanälen in drei Versuchen). Die TNF-Expression und somit auch -Produktion innerhalb der Zellen stieg mit der Dauer der Inkubation an und erreichte nach sechs Stunden einen Mittelwert von 525,8 Kanälen. Bei diesem Versuch war die Negativkontrolle die dem mAk entsprechende Isotypkontrolle.

Obwohl die $CD14^+DR^{++}$ Monozyten an allen Messpunkten des Zeitverlaufs ein stärkeres Immunfluoreszenzsignal für TNF aufwiesen als die klassischen $CD14^{++}DR^+$ Monozyten, war dieser Unterschied nur zu den Zeitpunkten von vier und sechs Stunden signifikant (s. Abb. 4-10).

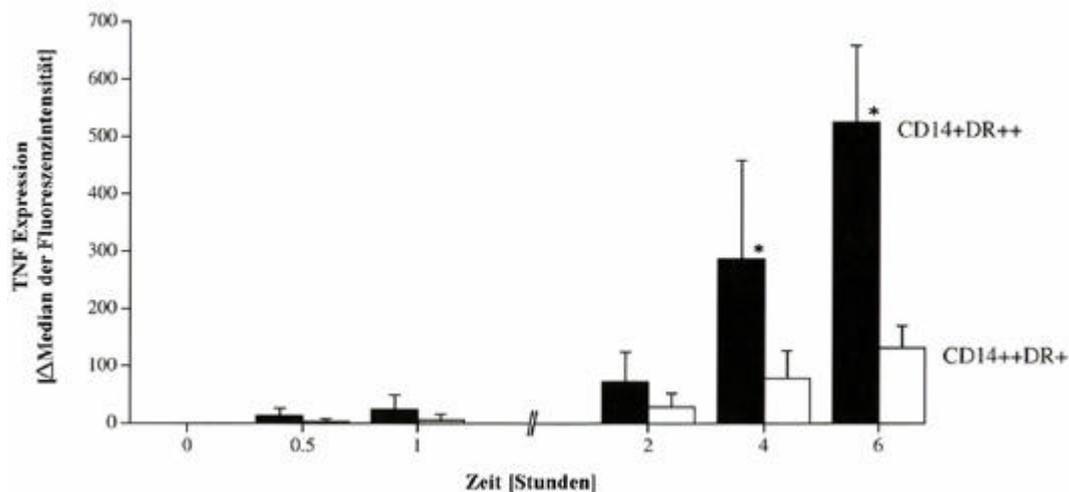


Abb. 4-10: Zeitverlauf der TNF-Produktion bei beiden Monozytensubpopulationen. WPB wurde mit 100 ng LPS pro ml in Anwesenheit von BFA stimuliert. Die Zellen wurden mit CD14, DR und TNF nach den angegebenen Inkubationszeiten angefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der TNF-Expression bei drei gesunden Probanden für die $CD14^+DR^{++}$ Monozyten (schwarze Balken), sowie für die $CD14^{++}DR^+$ Monozyten (weiße Balken). Die TNF-Expression der $CD14^+DR^{++}$ Monozyten im Vergleich zu derjenigen der $CD14^{++}DR^+$ Monozyten war zu den Zeitpunkten vier und sechs Stunden signifikant (*, $p < 0,05$).

Da die CD14⁺DR⁺⁺ Zellen im Vergleich zu den klassischen Monozyten eine geringere Dichte des CD14 LPS-Rezeptors an ihrer Oberfläche tragen, könnte man davon ausgehen, dass sie bei den Dosisanalysen eine geringere Sensitivität zu LPS aufweisen. Trotz dieser Überlegung exprimierten diese Zellen, ähnlich wie die klassischen CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten, messbares TNF schon ab einer Dosis von 1 ng LPS pro ml WPB, wie es in der Abb. 4-11 zu sehen ist. Bei dieser Dosis produzierten die CD14⁺DR⁺⁺ Zellen einen durchschnittlichen Median der Fluoreszenzintensität von 17,1 Kanälen, wobei die TNF-Expression bei 100 ng / ml auf 260,5 Kanäle anstieg und bei der höchsten Dosis von 1000 ng / ml 364,8 Kanäle erreichte. In diesem Experiment wurden die Negativkontrollen durch die Zugabe von 10-fachem molarem Molekülüberschuss an rhTNF zum anti-TNF-Ak (s. auch 4.5.2.1.1) bestimmt.

Zu beachten ist, dass bei jeder der sechs LPS-Dosismengen die TNF-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten im Vergleich zu derjenigen der klassischen Monozyten wieder deutlich höher war (Abb. 4-11). Demzufolge, wenn man die beiden Monozytenpopulationen miteinander vergleicht, reagieren die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten schon auf die gleiche geringe LPS-Dosis wie die klassischen Monozyten mit der Produktion an Zytokin. Dabei ist die Zytokinantwort der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten sogar deutlich stärker ausgeprägt, obwohl diese Zellen im Vergleich mit den CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten den CD14-LPS-Rezeptor an ihrer Oberfläche nur gering exprimieren.

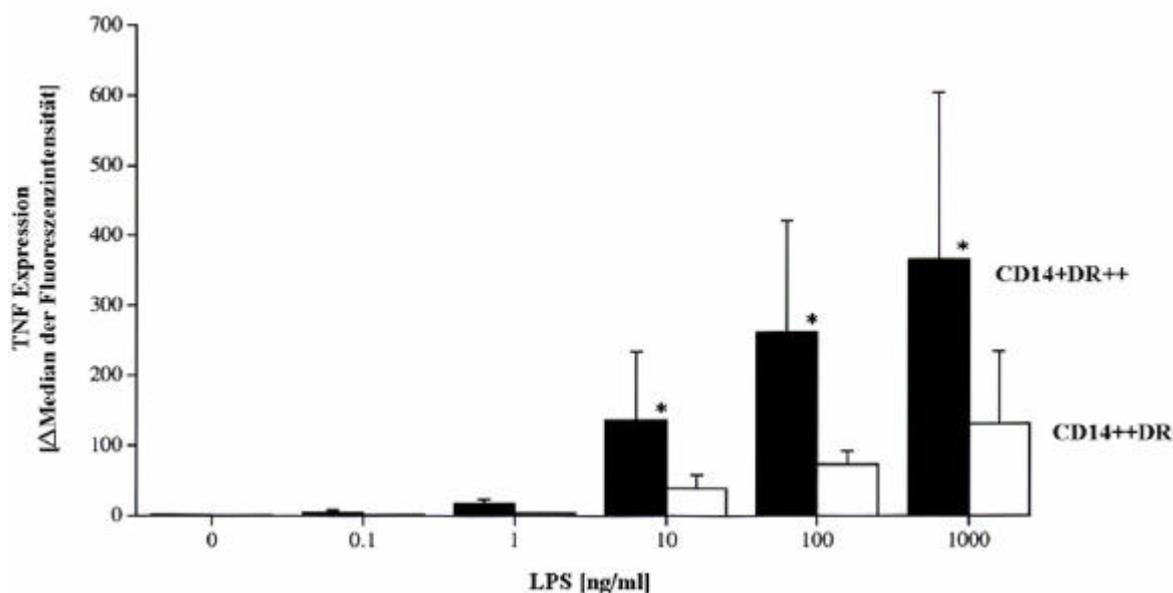


Abb. 4-11: Untersuchung der TNF-Produktion in Abhängigkeit von der LPS-Dosis während der sechsständigen Inkubationszeit in beiden Monozytensubpopulationen. WPB wurde mit verschiedenen LPS-Konzentrationen in Anwesenheit von BFA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit mAk gegen CD14, DR und TNF

angefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der TNF-Expression bei drei gesunden Probanden für die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten (schwarze Balken), sowie für die CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten (weiße Balken). Auch hier war die TNF-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten verglichen mit derjenigen der CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten signifikant höher bei den LPS-Konzentrationen von 10 bis 1000 ng / ml (*, $p < 0,05$).

4.5.2.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

4.5.2.2.1 IL-1 β -Spezifität der Färbung

Auch hier wurde als erstes die Spezifität des Antikörpers untersucht, mit der dieser tatsächlich an dem intrazellulär vorhandenen IL-1 β bindet. Dabei wurde wieder nach sechsständiger Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB die normale IL-1 β -Anfärbung mit der Spezifitätskontrolle sowie der Isotypkontrolle verglichen (s. auch 3.2.1.2.4).

In der Abb. 4-7 ist ein Beispiel aus drei Versuchen gezeigt. Es sind wieder die drei Kurven zu sehen, die sich nach Eingrenzung der klassischen CD14⁺⁺DR⁺ Monozytenpopulation im Zweifarbenpunktdiagramm schließlich im Ein-Farbparameter-Histogramm darstellen: von rechts ausgehend als erstes die positive IL-1 β -Anfärbung mit dem Median der Fluoreszenzintensität von 889,7 Kanälen (Mittelwert $767,9 \pm 123,1$), dann die Spezifitätskontrolle mit 12,3 Kanälen (Mittelwert $9,6 \pm 5,2$) und schließlich die Isotypkontrolle mit 12,5 Kanälen (Mittelwert $10 \pm 2,9$).

Diesmal ist in der Abbildung 4-12 noch deutlicher zu sehen, dass die Spezifitätskontrolle der Isotypkontrolle entspricht, da sich die beiden Kurven vollkommen überschneiden, und somit können beide als gleichwertige Negativkontrollen eingesetzt werden.

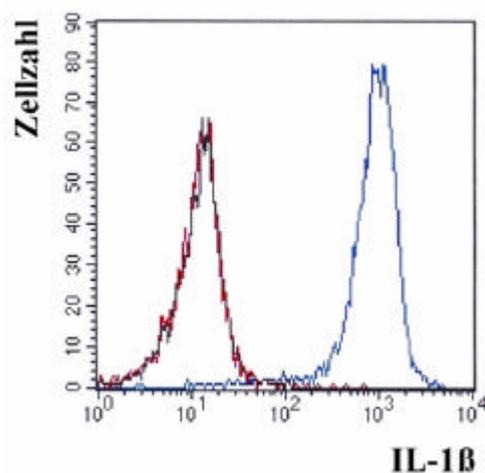


Abb. 4-12: Überprüfung des anti-IL-1 β -mAk mit Inhibition des IL-1 β -Signals durch Zugabe von rhIL-1 β in 11-fachem molaren Molekülüberschuss nach Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB für sechs Stunden. Es

wurden jeweils im Zweifarbenpunktdiagramm die klassischen $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten eingegrenzt und auf ihre IL-1 β -Produktion hin analysiert. Die rechte Kurve ist das normale Signal der IL-1 β -Anfärbung, während die beiden linken Kurven die Spezifitäts- und Isotypkontrolle darstellen, die sich hier übereinander projizieren.

4.5.2.2.2 IL-1 β -Produktion der $CD14^{+}CD16^{+}$ vs. $CD14^{++}$ Monozyten bei fünf gesunden Probanden

Weiterhin wurden die beiden Monozytensubpopulationen auf die Produktion von IL-1 β nach sechsständiger Stimulation mit LPS 100 ng pro ml WPB untersucht. Hier wurde wiederum die reguläre Isotypkontrolle (mouse IgG1-mAk) als Negativkontrolle eingesetzt. Dabei waren die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf offensichtlich gesunden Blutspendern für den Median der Fluoreszenzintensität $281,2 \pm 22,4$ Kanäle für die $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten und $204,8 \pm 51,9$ Kanäle für die $CD14^{+}DR^{++}$ Zellen (um 1,4-fach vermindert). In Abb. 4-13 kann man sehen, dass bei allen fünf Probanden die $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten mehr IL-1 β exprimieren als die $CD14^{+}CD16^{+}DR^{++}$ Monozyten. Dieser Unterschied der höheren IL-1 β -Produktion durch die klassischen Monozyten war im t-Test mit $p < 0,05$ signifikant.

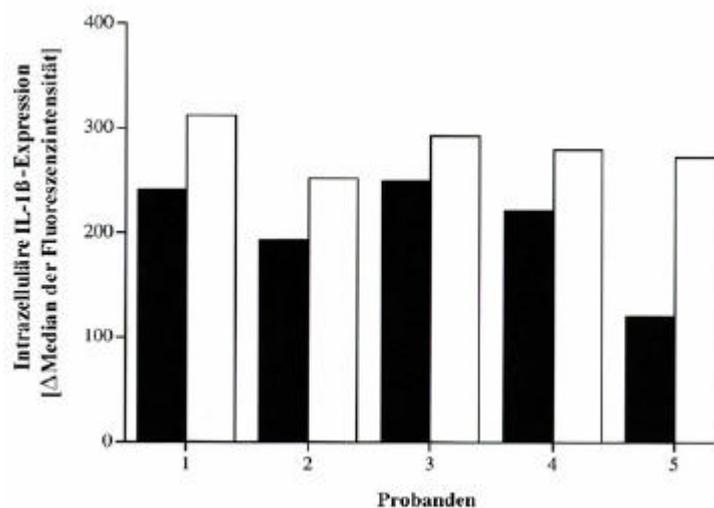


Abb. 4-13: IL-1 β -Produktion der Monozytensubpopulationen bei fünf gesunden Probanden. WPB wurde mit 100 ng LPS pro ml für sechs Stunden in Anwesenheit von BFA stimuliert und anschließend wurden die Zellen mit mAk gegen CD14, DR und IL-1 β angefärbt. Die schwarzen Balken repräsentieren die IL-1 β -Produktion der $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten, die weißen Balken diejenige der $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten. Bei allen Probanden findet eine höhere IL-1 β -Expression in den klassischen Monozyten als in den $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten statt.

4.5.2.3 Interleukin-6 (IL-6)

4.5.2.3.1 IL-6-Spezifität der Färbung

Diesmal erwies sich die Überprüfung der Spezifität des monoklonalen IL-6-Ak als problematisch, da das im zehnfachen molaren Molekülüberschuss zu den Zellen hinzugegebene rhIL-6 nicht nur die freien F_{ab}-Enden der IL-6-mAk absättigte, sondern auch mit den IL-6-Oberflächenrezeptoren aller Leukozyten eine Bindung einging. So wurde das Fluoreszenzsignal der Monozyten nur leicht inhibiert und das der Lymphozyten, die unter den Versuchsbedingungen kein IL-6 produzieren, unspezifisch verstärkt.

In Abb. 4-14 sind diese Gegebenheiten anhand eines Versuchs mit vierstündiger LPS-Stimulation [100 ng / ml] gut nachzuvollziehen: im linken Bild (IL-6-Anfärbung) sieht man zum einen die normale IL-6-Produktion der CD14⁺⁺ und CD14⁺ Monozyten und außerdem in der linken unteren Ecke die nichtproduzierenden Zellen (hauptsächlich Lymphozyten), eine für IL-6 negative Zellwolke.

Das nächste Bild (4-14, mittleres Diagramm) zeigt die vermeintliche IL-6-Expression der Zellen nach Zugabe von rhIL-6 zum relevanten mAk für die eigentliche Spezifitätskontrolle des letzteren. Normalerweise ist kein positives Fluoreszenzsignal mehr vorhanden, wenn der anti-Zytokin-Ak zusammen mit dem jeweiligen rekombinanten humanen Protein im Überschuss zu den permeabilisierten Zellen hinzugegeben wird (s. 4.5.2.1.1 und 4.5.2.2.1). In diesem Fall aber ist, wie oben schon erwähnt, das Fluoreszenzsignal der Monozyten nur leicht inhibiert und dasjenige der Lymphozyten, die eigentlich in der IL-6-Anfärbung für das Zytokin negativ waren (und damit keine Zytokinexpression nach Stimulation mit LPS aufweisen), unspezifisch erhöht.

Schließlich ist durch die im Folgenden beschriebene Kombination der Nachweis der Antikörperspezifität doch möglich, da in diesem Fall das positive Fluoreszenzsignal tatsächlich inhibiert wird (Abb. 4 14, rechtes Diagramm). Dabei ist eine Erweiterung des Anfärbeprotokolls nötig, und zwar durch:

1. der Absättigung der Oberflächenrezeptoren durch die Zugabe von rhIL-6 und anschließend von unkonjugiertem mAk und
2. der 10-minütigen Vorinkubation des monoklonalen IL-6-Ak mit dem rhIL-6 in 10-fachem Molekülüberschuss vor der Zugabe zu den permeabilisierten Zellen (s. auch 3.2.1.2.4).

Bei den nachfolgenden drei Experimenten mit ebenfalls vierstündiger Stimulation mit 100 ng LPS / ml WPB zum Spezifitätsnachweis des mAk konnte das Signal vollkommen inhibiert

werden, was im rechten Bild der Abb. 4-14 gut sichtbar ist. Dieses Zweifarbenpunktdiagramm stellt dabei ein Beispiel aus drei Versuchen dar.

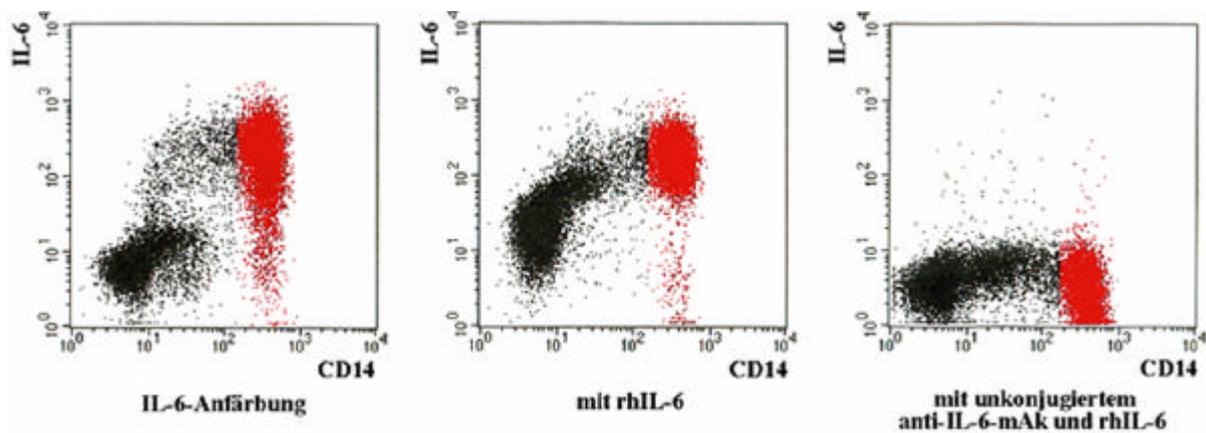


Abb. 4-14: Überprüfung des anti-IL-6-mAk mit Inhibition des IL-6-Signals (linkes Bild) durch Zugabe von unkonjugiertem anti-IL-6-mAk zusammen mit rhIL-6 in zehnfachem molaren Molekülüberschuss nach Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB für sechs Stunden (rechtes Bild). Das mittlere Zweifarbenpunktdiagramm zeigt das unspezifisch auf allen Zellen verstärkte IL-6-Signal, das bei alleiniger Zugabe von rhIL-6 entsteht.

Das nach Eingrenzung der klassischen CD14⁺⁺ Monozyten in der Dot-Plot-Analyse von Abb. 4-14, rechtes Bild, zugehörige Ein-Farbparameter-Histogramm ist in der nächsten Abbildung (Abb. 4-15) dargestellt. Hier ist die vollkommene Inhibition des IL-6-Fluoreszenzsignal folgendermaßen zu sehen: die beiden linken Kurven, die zum einen die Spezifitätskontrolle und zum anderen die Isotypkontrolle repräsentieren, überdecken sich fast vollständig (Mediane der Fluoreszenzintensität 2,7 und 2,6 Kanäle). Dabei exprimieren die CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten das Zytokin IL-6 durch die vierstündige Stimulation mit LPS mit einem Median der Fluoreszenzintensität von 192 Kanälen, was anhand der rechten Kurve zu sehen ist. Die Durchschnittswerte der Mediane der Fluoreszenzintensität und ihre zugehörigen Standardabweichungen der drei Versuche betragen für die IL-6-Anfärbung $175,3 \pm 98,3$ Kanäle, für die Spezifitätskontrollen $2,6 \pm 0,1$ Kanäle und für die Isotypkontrolle $2,9 \pm 0,3$ Kanäle.

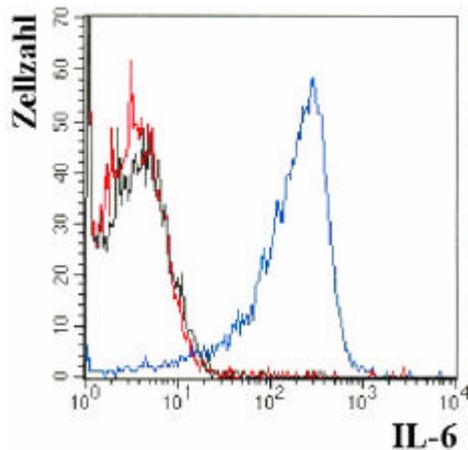


Abb. 415: Überprüfung des anti-IL-6-mAk wie unter Abb. 4-14 beschrieben. Es wurden jeweils im Zweifarbenpunktdiagramm die klassischen $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten eingegrenzt und auf ihre IL-6-Produktion hin analysiert. Die rechte Kurve ist das normale Signal der IL-6-Anfärbung, während die beiden linken Kurven die Spezifitäts- und Isotypkontrolle darstellen, die sich hier übereinander projizieren. Dies ist einer aus drei Versuchen.

4.5.2.3.2 IL-6 -Produktion der $CD14^{+}CD16^{+}$ vs. $CD14^{++}$ Monozyten bei fünf gesunden Probanden

Als nächstes wurde die IL-6-Produktion der beiden Monozytenpopulationen bei fünf offensichtlich gesunden Probanden analysiert. Dafür wurde deren Vollblut für sechs Stunden mit 100 ng LPS pro ml WPB stimuliert und anschließend gemäß dem Protokoll für IL-6 angefärbt.

Wie in Abb. 4-16 gezeigt, exprimierten bei drei Probanden die $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten mehr IL-6, während es bei den zwei restlichen Probanden genau umgekehrt war. Der Mittelwert der Mediane der Fluoreszenzintensität aller fünf Anfärbungen betrug für die $CD14^{++}DR^{+}$ Population $112,6 \pm 59,5$ Kanäle und für die $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten $113,1 \pm 36,9$ Kanäle. Aus diesen Werten sowie aus Abb. 4-16 geht hervor, dass es keinen signifikanten Unterschied in der IL-6-Produktion zwischen beiden Monozytenpopulationen gab.

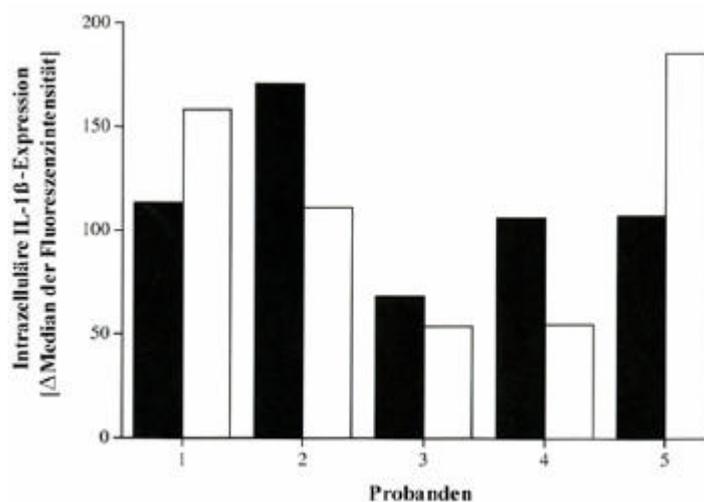


Abb. 4-16: IL-6-Produktion der Monozytensubpopulationen bei fünf gesunden Probanden. WPB wurde mit 100 ng LPS pro ml für sechs Stunden in Anwesenheit von BFA stimuliert und anschließend wurden die Zellen mit

mAk gegen CD14, DR und IL-6 angefärbt. Die schwarzen Balken repräsentieren die IL-6-Produktion der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten, die weißen Balken diejenige der CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten. Bei drei Probanden findet eine höhere IL-6-Expression in den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten als in den klassischen Monozyten statt, während es bei den zwei restlichen Probanden genau umgekehrt ist.

Um die Zytokinproduktion von TNF, IL-1 β und IL-6 bei fünf offensichtlich gesunden Probanden nach sechsständiger Stimulation mit 100 ng LPS pro ml WPB besser vergleichen zu können, gibt die Abb. 4-17 eine Zusammenfassung aller Daten, bei der die klassischen Monozyten und die proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten jeweils miteinander verglichen werden.

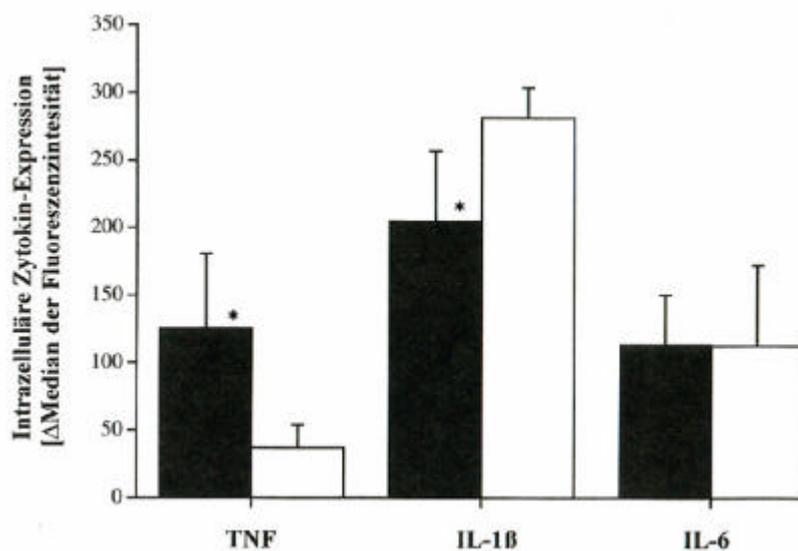


Abb. 4-17: Zytokin-Produktion der Monozytensubpopulationen bei fünf gesunden Probanden. Angegeben sind die Mediane der Fluoreszenzintensität der drei Zytokine jeweils mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen. Die schwarzen Balken repräsentieren die Zytokin-Produktion der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten, die weißen Balken diejenige der CD14⁺⁺DR⁺ Monozyten.

*Verglichen mit den klassischen Monozyten war die Produktion von TNF bei den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten signifikant um den Faktor 3,4 höher, von IL-1 β um den Faktor 1,4 etwas niedriger (jeweils $p < 0,05$).

4.5.3 Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA)

Um den Gegebenheiten *in vivo* bei den Analysen der Patientenmonozyten besser zu entsprechen, wurden die Stimulationsversuche mit einem Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien durchgeführt, da der am häufigsten vorkommende Erreger des Erysipels, *Streptococcus pyogenes* (der Gruppe A), zu den grampositiven Bakterien gehört (s. 2.1.5 der Einleitung). Somit besitzt *Streptococcus pyogenes* kein LPS in seinem Zellwandaufbau (4, 30). Dafür aber trägt dieses Bakterium andere Besonderheiten als Bestandteile seiner Zellwand, u.a. Fimbrien, die als spezielle Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken eine Adhärenz an Schleimhautepithelzellen des Wirtes vermitteln. Diese Fimbrien setzen sich aus einem M-Protein und einem Glykolipid, der Lipoteichonsäure (LTA), zusammen, sind in der zytoplasmatischen Membran verankert und durchdringen somit die gesamte Bakterienwand (4, 39, 40). Nach antibiotischer Behandlung wird durch Zellwandzerfall die LTA frei und ist als lösliche Komponente nachweisbar (31, 40).

In der Literatur wurde schon mehrfach die Stimulierbarkeit der Monozyten durch LTA beschrieben (30, 31, 39). In den folgenden Versuchen wurde daher LTA für die Stimulation der Monozytensubpopulationen eingesetzt.

4.5.3.1 Ausschluss einer LPS-Kontamination in der LTA-Präparation

Zuerst einmal musste eine Stimulierung der Zellen durch LPS-Kontamination ausgeschlossen und die Vergleichbarkeit der LPS- mit der LTA-Stimulation nachgewiesen werden.

In einem Versuch mit vier offensichtlich gesunden Probanden konnte die vollständige Neutralisation von 100 ng LPS pro ml WPB durch 10 µg Polymyxin B (PB) pro ml WPB nach vierstündiger Inkubation aufgezeigt werden.

Obwohl die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten signifikant mehr TNF produzieren als die klassischen Monozyten (s. Tab. 4 und auch 4.5.2.1.2 und 4.5.2.1.3), konnte PB das LPS-induzierte TNF-Signal auch bei diesen Zellen vollkommen inhibieren. Alle Mittelwerte mit ihren zugehörigen Standardabweichungen beider Monozytensubpopulationen sind in Tab. 4 angegeben.

Tabelle 4: TNF-Produktion der beiden Monozytensubpopulationen nach verschiedenen Stimulationsmethoden mit 4 Stunden Inkubationszeit bei $n = 4$ Probanden (Mittelwerte und Standardabweichungen). Es ist jeweils die spezifische Fluoreszenzintensität in Kanälen nach 1. nur BFA- (keine Stimulation), 2. LTA-, 3. LTA- und PB-, 4. LPS- und 5. LPS- und PB-Zugabe angegeben.

	BFA [10µg/ml]	LTA [100µg/ml]	LTA [100µg/ml] & PB [10µg/ml]	LPS [100ng/ml]	LPS [100ng/ml] & PB [10µg/ml]
CD14 ⁺⁺ DR ⁺	-1,6 ± 1,5	223,9 ± 118,6	195,0 ± 143,3	81,7 ± 64,4	0,2 ± 1,0
CD14 ⁺ DR ⁺⁺	-0,7 ± 1,0	555,8 ± 252,4	657,5 ± 471,6	329,8 ± 203,9	2,4 ± 1,5
t-Test		$p < 0,05^*$	$p = 0,05^*$	$p < 0,05^*$	

*Der Unterschied der TNF-Produktion beider Monozytenpopulationen ist bei den Stimulationen mit LTA und LPS mit $p < 0,05$ signifikant. Bei der Stimulation mit LTA und PB ist die Standardabweichung aufgrund der Streuung der Ergebnisse zu groß und deshalb mit $p = 0,05$ nicht signifikant.

4.5.3.2 Vergleich zur Stimulation mit LPS

Im gleichen Versuchsansatz wie unter 4.5.3.1 beschrieben wurde die Kontamination von LPS bei alleiniger Zugabe von LTA [100 µg / ml] im Vergleich zur Stimulation mit LPS [100 ng / ml] und derjenigen mit LTA [100 µg / ml] und PB [10 µg / ml] überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von PB zur Neutralisierung des LPS keinen Effekt auf die durch LTA induzierte TNF-Produktion hatte. Wenn man die Mittelwerte der 4 Probanden miteinander vergleicht, so sieht man eine TNF-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten mit einem Median der Fluoreszenzintensität von 329,8 Kanälen bei der Stimulation durch LPS. Dieses Signal wird durch Zugabe von PB auf < 3 Kanäle reduziert. Das durch LTA induzierte Signal (555,8 Kanäle) wird hingegen durch PB nicht gesenkt (657,5 Kanäle), sondern weist sogar eine höhere TNF-Produktion der Zellen auf (s. Tab. 4).

Beachtenswert ist wiederum der Unterschied der TNF-Produktion zwischen beiden Monozytensubpopulationen, der nach Stimulation mit LPS vergleichbar zur derjenigen mit LTA ist, d.h. auch bei LTA-Stimulation produzieren die CD14⁺DR⁺⁺ Zellen dreimal mehr TNF als die klassischen Monozyten (s. Tab. 4). Diese Ergebnisse belegen, dass 1. eine Stimulierung der Zellen durch LPS-Kontamination ausgeschlossen werden kann und 2. beide Stimulationsarten miteinander vergleichbar sind.

4.6 Intrazelluläre Zytokinproduktion bei Erysipelpatienten mit hohen CD14⁺CD16⁺ Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern

Als nächstes wurde die immunologische Antwort der bei Patienten mit vermehrten CD14⁺CD16⁺ Monozyten nach einer *ex vivo* Stimulation untersucht. Dafür wurden Vollblutproben bei den Untersuchungen mit Patientenmaterial mit LTA [100 µg / ml] und PB [10 µg / ml] für vier Stunden - jeweils in Anwesenheit von BFA [10 µg / ml] - stimuliert und anschließend mit Oberflächenmarkern und intrazellulären fluoreszierenden Antikörpern gegen die jeweiligen Zytokine angefärbt.

4.6.1 Vergleich der intrazellulären Produktion von Interleukin-6

Mit Hilfe der CD14-DR-Oberflächenanfärbung zur Identifizierung der CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten wurde als nächstes die Produktion von IL-6 dieser Zellen bei drei Erysipelpatienten im Vergleich zu drei offensichtlich gesunden Kontrollspendern untersucht. Dabei fällt auf, wie in Tab. 5 angegeben, dass die Mittelwerte der Patienten für beide Monozytensubpopulationen tendenziell niedriger sind als die der Kontrollpersonen. Dieser Unterschied ist allerdings gering und deshalb auch nicht signifikant.

Tabelle 5: IL-1β- und IL-6-Produktion der beiden Monozytenpopulationen bei Erysipelpatienten im Vergleich zu Kontrollspendern. WPB wurde mit LTA [100 µg / ml] – in Anwesenheit von BFA und PB – stimuliert und die intrazellulären Zytokine mit direkt konjugierten anti-Zytokin-mAk nach vier Stunden gemessen. Es ist jeweils der Median der Fluoreszenzintensität in Kanälen angegeben.

	IL-1β		IL-6	
	CD14 ⁺ DR ⁺⁺	CD14 ⁺⁺ DR ⁺	CD14 ⁺ DR ⁺⁺	CD14 ⁺⁺ DR ⁺
Erysipelpatienten (n = 3)	263,7 ± 129,0*	499,5 ± 317,7	75,7 ± 45,6	85,3 ± 82,4
Kontrollpersonen (n = 3)	533,6 ± 66,1*	597,2 ± 130,8	115,9 ± 65,2	146,2 ± 91,9

*Der Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ist $p = 0,08$ (nicht signifikant).

4.6.2 Vergleich der intrazellulären Produktion von Interleukin-1 β

Betrachtet man nun die Produktion an IL-1 β nach vierstündiger Stimulation mit 100 μ g LTA pro ml WPB (in Anwesenheit von BFA und PB) bei drei Patienten, so konnte eine selektive Verminderung der Produktion dieses Zytokins durch CD14⁺DR⁺⁺Monozyten festgestellt werden, während dies bei den gesunden Kontrollpersonen nicht der Fall war.

Das Beispiel aus drei Versuchen in Abb. 4-18, rechtes Histogramm, zeigt mit einem Median der Fluoreszenzintensität von 159,3 Kanälen eine 3,7-fach verminderte Zytokinexpression der CD14⁺DR⁺⁺Monozyten im Vergleich zu denen des Kontrollspenders (Abb. 4-18, linkes Histogramm), die ein Signal von 586,2 Kanälen aufweisen.

Die in Tab. 5 zusammengefassten Daten zeigen mit einem Mittelwert der Mediane der Fluoreszenzintensität von $263,7 \pm 129,0$ Kanälen für die CD14⁺DR⁺⁺ Patientenmonozyten zu $533,6 \pm 66,1$ Kanälen bei den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten der Kontrollspender eine ca. zweifach erniedrigte IL-1 β -Produktion dieser Zellen, während die klassischen Monozyten der Patienten eine ähnliche Menge an IL-1 β wie diejenigen der Kontrollpersonen produzieren.

Obwohl der Unterschied der IL-1 β -Produktion bei den CD14⁺DR⁺⁺ Zellen deutlich war, konnte im t-Test keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,08$).

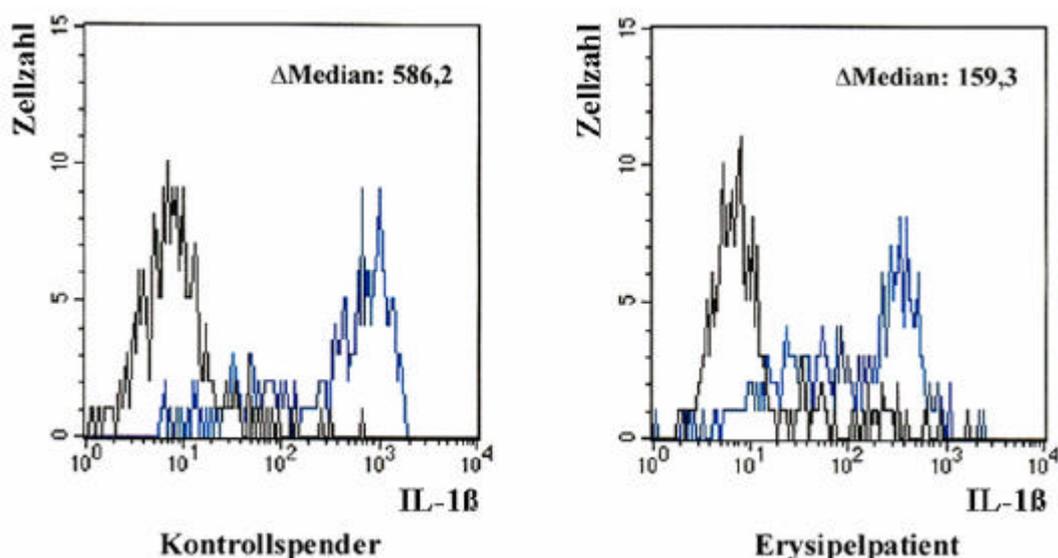


Abb. 4-18: IL-1 β -Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten bei einem Kontrollspender und einem Erysipelpatienten (ein Beispiel aus drei Versuchen). WPB wurde mit LTA in Anwesenheit von BFA für vier Stunden stimuliert und anschließend mit den mAk gegen CD14, DR und IL-1 β angefärbt. Nach Eingrenzung der CD14⁺DR⁺⁺Monozyten im Zweifarbenpunktdiagramm sind die jeweils zugehörigen Histogramme dargestellt. In der rechten oberen Ecke sind die Mediane der Fluoreszenzintensität des spezifischen Anfärbesignals angegeben. Die Negativkontrollen (linke Kurven) sind in diesem Fall mit Isotypkontrollen durchgeführt worden.

4.6.3 Vergleich der intrazellulären Produktion von Tumornekrosefaktor

Das gleiche Phänomen wie bei IL-1 β , d.h. der selektiv verminderten Zytokinproduktion der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten, konnte bei der TNF-Expression nach LTA-Stimulation ebenfalls beobachtet werden. Nach Inkubation mit 100 μ g LTA pro ml WPB und anschließender Identifizierung der proinflammatorischen Monozyten in der CD14-DR-Oberflächenanfärbung konnte eine starke TNF-Produktion der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten (401,2 Kanäle) beim Kontrollspender aufgezeigt werden, während dieselben, allerdings zahlenmäßig vermehrten (s. 4.1 und 4.2) Zellen des Erysipelpatienten mit einem Signal von 170 Kanälen 2,4-fach weniger TNF produzierten (s. Abb. 4-19).

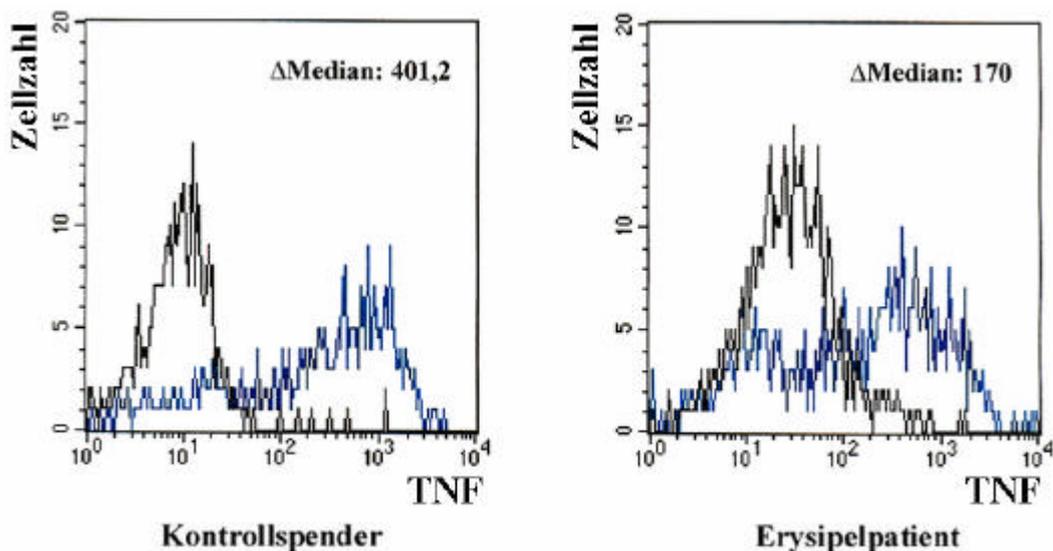


Abb. 4-19: TNF-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten bei einem Kontrollspender und einem Erysipelpatienten. WPB wurde mit LTA in Anwesenheit von BFA für vier Stunden stimuliert und anschließend mit den mAk gegen CD14, DR und TNF angefärbt. Nach Eingrenzung der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten im Zweifarbenpunktdiagramm sind die jeweils zugehörigen Histogramme dargestellt. In der rechten oberen Ecke sind die Mediane der Fluoreszenzintensität des spezifischen Anfärbesignals angegeben. Die Negativkontrollen (linke Kurven) sind in diesem Fall mit einem zehnfachen molaren Molekülüberschuss an rhTNF durchgeführt worden. Gezeigt ist einer aus fünf Versuchen.

Im Durchschnitt war die LTA-induzierte TNF-Produktion bei fünf Erysipelpatienten ($205,7 \pm 87,5$ Kanäle) mit erhöhter $CD14^{+}DR^{++}$ Monozytenzellzahl im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ($465,6 \pm 284,6$ Kanäle) um den Faktor 2 reduziert ($p < 0,05$). Gleichzeitig blieb die TNF-Produktion der $CD14^{++}DR^{+}$ Monozyten bei Patienten ($279,2 \pm 165,7$ Kanäle) und Kontrollen ($320,4 \pm 328,9$ Kanäle) auf gleichem Niveau. Diese Gegebenheiten sind in Abb. 4-20 dargestellt, wobei die beiden linken Balken unstimulierte Zellen repräsentieren, die keinerlei TNF-Expression aufweisen.

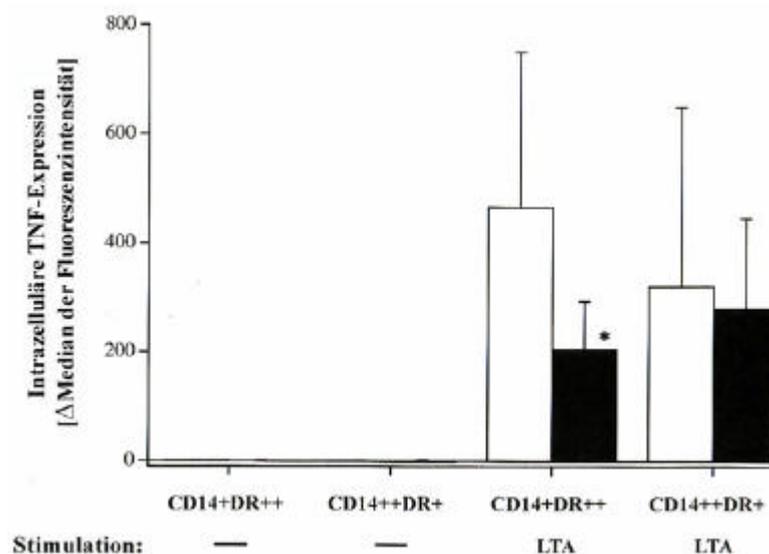


Abb. 4-20: TNF-Expression von Monozytensubpopulationen bei Kontrollspendern und Erysipelpatienten. Dargestellt sind die Ergebnisse für die spezifische anti-TNF-Anfärbung der $CD14^{+}DR^{++}$ proinflammatorischen Monozyten und der $CD14^{++}DR^{+}$ klassischen Monozyten mit und ohne Stimulation mit LTA bei fünf Patienten (schwarze Balken) und bei fünf Kontrollpersonen (weiße Balken).

* $p < 0,05$ beim Vergleich zwischen Kontroll- und Patientengruppe.

Zusammengefasst lassen sich aus den Daten zwei Ergebnisse definieren:

1. Die LTA-induzierte TNF-Expression ist selektiv nur in den $CD14^{+}DR^{++}$ Monozyten reduziert.
2. Diese verringerte Immunantwort nach *ex vivo* LTA-Stimulation ist nur bei der TNF- und der IL-1 β -Produktion, nicht aber bei der IL-6-Produktion zu sehen.

5 Diskussion

Vor einigen Jahren wurde im humanen peripheren Blut eine neue Monozytenpopulation entdeckt, die durch Expression des CD16-Antigens und einer geringen Dichte an CD14 an ihrer Oberfläche charakterisiert ist (44, 68). Diese Zellen, als CD14⁺CD16⁺ Monozyten definiert, produzieren große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, z.B. an TNF, und gleichzeitig fast nicht messbare Mengen an IL-10. Durch die Abwesenheit des stark anti-entzündlich wirkenden IL-10 können diese CD14⁺CD16⁺ Monozyten als proinflammatorische Monozyten bezeichnet werden (21, 71).

Mit diesem Konzept vereinbar ist auch die starke Abnahme der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl durch anti-entzündliche Glukokortikoidtherapie (19). Im Gegensatz dazu steigen diese Zellen während schwerer systemischer Infektionskrankheiten, wie z.B. bei Sepsis, bei akuten und chronischen Geschehen unter Hämodialyse-Behandlung, sowie nach schweren chirurgischen Eingriffen im Rahmen einer generalisierten Entzündungsreaktion an, um nur einige Beispiele zu nennen (siehe auch 2.4 der Einleitung, 43, 50).

Die Liste der in der Literatur schon häufig beschriebenen Zunahme der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl bei systemischen Geschehen, seien sie nun infektiöser (bakteriell oder viral), inflammatorischer, kanzerogener, allergischer oder sogar metabolischer Genese, ist inzwischen lang geworden (18, 20, 42, 48, 49, 51, 59). Die Fragestellung meiner Doktorarbeit war nun herauszufinden, ob die CD14⁺CD16⁺ Monozyten auch bei einer lokalisierten Entzündung, wie es beim Erysipel der Fall ist, ansteigen und welche Mengen an Zytokinen sie während dieser Erkrankung produzieren.

Um den Unterschied der Zytokinproduktion zwischen CD14⁺CD16⁺ Monozyten der Patienten und denen gesunder Kontrollspender optimal herauszuarbeiten, wurden der Zeitverlauf, die Dosisabhängigkeit exemplarisch anhand der TNF-Produktion, sowie die Produktion der jeweiligen Zytokine bei einer größeren Anzahl gesunder Probanden in den Vorversuchen analysiert. Selbstverständlich musste zuvor die Spezifität des jeweiligen anti-Zytokin-mAk überprüft werden, die sich beim mAk gegen IL-6 durch die unbeabsichtigte Anfärbung der Rezeptoren als schwieriger herausstellte, aber schließlich doch noch nachzuweisen war (siehe 3.2.1.2.4 und 4.5.2.3.1).

Diese Studie demonstriert erstmalig bei einer lokalisierten Entzündung einen ausgeprägten Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl bei 11 von 12 Patienten. Der einzige Patient

ohne diesen Anstieg zeigte durch erhöhtes CRP trotzdem eine Entzündungsreaktion, wobei das Erysipel in diesem Falle ein Rezidiv war. Interessanterweise zeigten alle vier restlichen Patienten mit Rezidiverysipel eine weniger ausgeprägte Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl (siehe Tab. im Anhang).

Andererseits gab es unter den 12 Patienten einen mit einer extrem hohen Anzahl an CD14⁺CD16⁺ Monozyten (344,5 Zellen / μ l Vollblut), der gleichzeitig mit 39,4°C den stärksten Temperaturanstieg aufwies. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Stärke der CD14⁺CD16⁺ Monozytenvermehrung der Stärke der Immunantwort entspricht und sie deshalb gut widerspiegelt. In diesem Sinne wurde eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der proinflammatorischen Monozyten und der Körpertemperatur sowie auch in Bezug auf das CRP gefunden (siehe 4.3.2 und 4.3.3).

Dies soll nicht heißen, dass das CRP bei der Induktion der CD14⁺CD16⁺ Monozyten impliziert ist. In diesem komplexen Prozess spielt wahrscheinlich der M-CSF eine größere Rolle. Diese Aussage basiert auf den Ergebnissen dreier Studien, die eine Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozyten in Tierversuchen und bei Patienten nach M-CSF-Infusion feststellen konnten (39, 40, 52, 64). Zusätzlich hierzu fanden Saionji et al. (50) eine signifikante Korrelation zwischen M-CSF-Spiegeln und der Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei Hämodialysepatienten.

In der hier vorgestellten Arbeit war diese Korrelation nicht signifikant, was auf die geringe Patientenanzahl zurückgeführt werden kann und es ist anzunehmen, dass bei Untersuchung einer größeren Kohorte von Patienten diese Korrelation signifikant werden könnte. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass sich die Infektion am Aufnahmetag im Krankenhaus, d.h. am Tag 1 der Studie, schon seit zwei bis vier Tagen langsam entwickelt hatte. Demzufolge müsste die Analyse des M-CSF zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung durchgeführt werden, um einen Zusammenhang zwischen Ursache und Wirkung herauszufinden.

Als nächstes sollte die Zytokinexpression der bei den Patienten vermehrten proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺ Monozyten untersucht werden, da Monozyten eine Vielzahl an Zytokinen (z.B. TNF, IL-1 und IL-6) produzieren, welche die Immunantwort und Entzündungsreaktion regulieren.

In den letzten Jahren wurden die zur Produktion dieser Zytokine durch Monozyten notwendigen Signalwege, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren durch eine große Anzahl von Studien analysiert, wobei diese Studien aber immer mit ein- oder sogar mehrfach

aufgereinigten Zellen durchgeführt wurden. Dabei können aber diese Prozeduren der Monozytenisolierung diese Zellen partiell aktivieren oder eine Veränderung ihrer Oberfläche induzieren, wie es im Falle des L-selectins in der Literatur schon beispielhaft beschrieben ist: während der Standardmethode der Dichtegradientenzentrifugation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) findet eine signifikante Herunterregulierung der Oberflächenexpression an L-selectin statt (57).

Im Gegensatz dazu kann die direkte Analyse der Monozyten aus frisch entnommenem Vollblut diese Probleme umgehen. Deshalb wurde bei dieser Arbeit eine Methode angewandt, bei der nach Stimulation des Vollbluts die Monozyten durch mAk gegen Oberflächenantigene identifiziert und ihre Zytokinproduktion durch intrazelluläre Immunfluoreszenzanfärbung gemessen wurde. Die direkte Zugabe von Stimuli und Transportinhibitoren (BFA) zum frisch entnommenen Vollblut erlaubt eine unverfälschte Aussage über die Zytokinexpression der Monozyten, da keinerlei Zellmanipulationen dafür nötig sind.

Dennoch gab es bei dieser Methode ein Problem: durch *ex vivo* Stimulation, sei sie nun mit LPS oder LTA durchgeführt, kommt es zu einer Herunterregulierung des CD16-Antigens an der Zelloberfläche der CD14⁺CD16⁺ Monozyten, so dass letztere durch CD16 nicht mehr definiert werden können. Demzufolge wurden die Zellen durch die Kombination der Oberflächenmarker CD14 und HLA-DR identifiziert, da die CD14⁺CD16⁺ Monozyten auch durch eine hohe Dichte an HLA-DR an ihrer Zelloberfläche charakterisiert sind und die Expression dieses Moleküls durch Stimulation nicht verändert wird (5).

In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten konnte aufgezeigt werden, dass vor der WPB-Stimulation von fünf gesunden Probanden im Durchschnitt 93 % der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten das CD16-Antigen an ihrer Oberfläche tragen. Ein ähnlicher Prozentanteil konnte für die zahlenmäßig vermehrten proinflammatorischen Monozyten der Erysipelpatienten nachgewiesen werden (siehe 4.5.1).

In einer früheren Studie, bei der die Isolierung von Monozyten vor der Stimulation derselben durchgeführt wurde, konnten vergleichbare Mengen an TNF-mRNA und TNF-Protein in beiden Monozytenpopulationen nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden (21).

Im Gegensatz hierzu belegen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse mit der Methode der sofortigen Stimulation und anschließenden Anfärbung einen, verglichen mit den klassischen Monozyten, dreifach höheren Spiegel an LPS-induziertem TNF-Protein in den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten. Dieser erbrachte Nachweis größerer Mengen an TNF-Protein in den

CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten kann durch die Vorteile der ausgewählten Methode, d.h. durch die Vermeidung von verfälschenden Signalen durch die Isolierung der Zellen, und durch die größere Präzision der Durchflusszytometer-Methode erklärt werden.

In den Experimenten zum Zeitverlauf der Zytokinproduktion konnte eine sehr schnelle Induktion des TNF-Proteins schon nach einer halben Stunde LPS-Stimulation aufgezeigt werden, wobei dies am deutlichsten bei den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten zu sehen war. Das Maximum der Zytokinproduktion wurde in diesen Analysen nach sechs Stunden erreicht. Nach vier Stunden war die TNF-Expression ebenfalls schon sehr deutlich. Deshalb wurde aus praktischen Gründen bei den Analysen mit Patientenmaterial die vierstündige Stimulation eingesetzt.

Bei Untersuchung der Abhängigkeit der TNF-Produktion von der LPS-Stimulationsdosis bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden kam heraus, dass die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten schon bei der geringen Dosis von 1 ng LPS / ml Vollblut eine ausgeprägte TNF-Expression aufwiesen, während die CD14⁺⁺DR⁺ Zellen noch im Bereich der Negativkontrolle lagen (siehe Abb. 4-11 unter 4.5.2.1.3).

Die etwas stärkere IL-1 β -Produktion der klassischen Monozyten und die mengenmäßig gleiche Produktion beider Monozytenpopulationen von IL-6 deuten darauf hin, dass die CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten spezifisch nur TNF in einem höheren Maße produzieren. Die Mechanismen, die zu dieser selektiv erhöhten TNF-Produktion führen, sind bisher nicht geklärt.

Das von gesunden Probanden in Ruhe entnommene Vollblut repräsentiert nicht alle in der Blutbahn vorhandenen Leukozyten, da dabei nur Zellen aus dem sogenannten zentralen Pool abgenommen werden. Ein sehr großer Teil zusätzlicher Zellen befindet sich im marginalen Pool, der die gesamten, locker am Endothel anliegenden Leukozyten einschließt.

In einer früheren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die CD14⁺CD16⁺ Monozyten im marginalen Pool mengenmäßig dreifach stärker vertreten sind als im zentralen Pool, d.h. die Mehrheit der CD14⁺CD16⁺ Monozyten liegt dem Endothel an (56). Rechnet man nun den marginalen und den zentralen Pool zusammen, dann machen die CD14⁺CD16⁺ Zellen 30 % aller sich intravaskulär befindlichen Monozyten aus. Bei Einschweben von Bakterien oder deren Produkten in die Blutbahn werden alle Monozyten stimuliert, auch diejenigen im marginalen Pool. Demzufolge haben die proinflammatorischen Monozyten *in vivo* eine

weitaus größere Bedeutung als es die Ergebnisse des aus dem zentralen Pool gewonnenen Blutes vermuten lassen.

Die signifikant höhere TNF-Expression der CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten konnte auch in den Versuchen zum Vergleich der LPS- mit der LTA-Stimulation beobachtet werden.

Dabei ist die höhere TNF-Expression beider Monozytenpopulationen bei der LTA-Stimulation im Vergleich zur LPS-Stimulation unter anderem auf die 1000fach höhere Zugabe der LTA zurückzuführen (LPS-Endkonzentration von 100 ng / ml zu einer LTA-Endkonzentration von 100 µg / ml), wobei damit auch die geringere Potenz der LTA zur Zytokininduktion deutlich wird.

Außerdem erfolgt die Induktion verschiedenster Zytokine, darunter auch von TNF, durch sehr ähnliche Signalwege. Beide Stimulationsfaktoren benützen den CD14-Rezeptor (11, 35, 71), wobei LPS die Zellen über den *Toll-like receptor* (TLR) 4 (31, 37, 47, 54) aktiviert, während weitere Zellwandkomponenten grampositiver Bakterien, wie z.B. LTA und Peptidoglykan, über CD14 und TLR2 agieren (11, 31, 32, 60, 66).

Frühere Studien über die *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 ließen vermuten, dass LPS die Zellen über diese beiden Korezeptoren aktivieren könnte (32, 39, 65). In der Studie von Hirschfeld *et al.* wird die durch LPS induzierte und über TLR2 vermittelte Zellaktivierung durch die Wiederaufreinigung kommerziell erworbener LPS-Reagenzien unterbunden (24). Spätere Ergebnisse weisen darauf hin, dass LPS über CD14 und ausschließlich TLR4 agiert (31).

Das in der hier vorgestellten Arbeit verwendeten LPS wurde nicht wiederaufgereinigt, so dass vermutlich aufgrund verunreinigender Lipoproteine auch eine partielle Zellaktivierung über TLR2 stattfinden konnte.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie (5) konnten wir in Immunfluoreszenzanalysen ein zweifach stärkeres Signal für TLR2 auf den CD14⁺CD16⁺ Zellen im Vergleich zu den klassischen Monozyten nachweisen. Geht man davon aus, dass die Dichte des Korezeptors TLR2 an der Zelloberfläche für die Stärke der Aktivierung der Monozyten entscheidend ist, dann könnte die höhere TLR2-Dichte auf den CD14⁺CD16⁺ Monozyten die stärkere Antwort dieser Zellen auf LTA erklären.

Nachdem die CD14⁺CD16⁺ Zellen im Vergleich zu klassischen Monozyten eine höhere TLR2-Expression an ihrer Oberfläche aufweisen und die Bindung von Zellwandbestandteilen grampositiver Bakterien an diesem Rezeptor eine ausgeprägte Immunantwort hervorruft (siehe oben), spielen die CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten vermutlich eine entscheidende Rolle bei Infektionen mit grampositiven Erregern.

Umso interessanter waren die Ergebnisse zur Zytokinproduktion der proinflammatorischen Monozyten bei Erysipelpatienten, da diese Erkrankung hauptsächlich durch grampositive β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe A hervorgerufen wird.

Betrachtet man die TNF-Produktion dieser Monozyten, so zeigen die Ergebnisse eine deutliche Verminderung an intrazellulär vorhandenem Protein in den CD14⁺DR⁺⁺ Monozyten der Erysipelpatienten im Vergleich zu denen gesunder Kontrollspender auf (siehe Abb. 4-20). Diese Herunterregulierung der Zytokin-Expression war nicht nur auf TNF beschränkt, sondern konnte auch anhand der Produktion von IL-1 β gezeigt werden (siehe Abb. 4-18 und Tab. 5). Im Gegensatz hierzu war keine Verminderung der IL-6-Produktion zu sehen.

Eine ähnliche Herunterregulierung der Zytokinexpression ist schon früher bei Patienten mit schwerer Sepsis aufgezeigt worden (17, 36, 41). Diese Herunterregulierung, auch als Toleranz bezeichnet, wird durch vorherige *in vivo* Aktivierung von Zellen durch Bakterien und deren Produkten induziert. Dieser Mechanismus dient vermutlich dazu, den Wirt vor den fatalen Folgen einer überschießenden Zytokinproduktion und dem daraus resultierenden verstärkten lokalen Gewebeschaden zu schützen (70).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass diese Toleranz spezifisch ist, da sie für TNF und IL-1 β , aber nicht für IL-6 nachweisbar ist und nur in den CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten und nicht in den CD14⁺⁺ Zellen auftritt. Dabei wäre es von großem Interesse, in zukünftigen Studien noch andere pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-12 zu analysieren, welches mit der Immunantwort von Th1-Zellen assoziiert ist.

Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die in den CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten nachweisbar erniedrigten Zytokinspiegel von TNF und IL-1 β auf eine vorherige *in vivo* Aktivierung dieser Zellen durch *Streptococcus pyogenes* und dessen Produkte, unter anderem auch LTA, zurückzuführen sind.

Der zur Toleranz nötige Mechanismus könnte die Blockade von *Mitogen-Activated Protein* (MAP)-Kinasen (15) und von *Nuclear Factor* (NF)- κ B einschließen (30).

Andererseits könnte eine Hochregulierung von p50 Homodimeren stattfinden, welche an Promotoren binden, ohne sie zu aktivieren. Dieses verhindert dann den Zugang des p50p65 NF- κ B und blockiert dadurch die Genexpression (22, 27, 33, 69).

Welcher Mechanismus auch immer in den Monozyten der Erysipelpatienten vorhanden sein mag, dieser Mechanismus scheint selektiv zu agieren, da er nur in den CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ proinflammatorischen Monozyten in Kraft tritt.

Dieser selektive Toleranzmechanismus ist in der Literatur noch nie beschrieben worden, obgleich man davon ausgehen kann, dass dieses Phänomen im Vergleich zur globalen Toleranz, die bei schweren systemischen Krankheiten wie Sepsis vorkommt, häufiger aufzufinden ist. Da die CD14⁺CD16⁺ Monozyten mit ihren proinflammatorischen Eigenschaften großen Schaden anrichten können, ist die Toleranzinduktion in diesen Zellen zum Schutze des Wirtes umso wichtiger.

Während aufgezeigt werden konnte, dass die Toleranz nach LTA-Stimulation verglichen zu den klassischen Monozyten spezifisch nur in den proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten vorkommt, bleibt noch unklar, ob auch andere Zellen wie z.B. Granulozyten von Erysipelpatienten ebenfalls eine gewisse Toleranz erwerben.

Wie bereits erwähnt, befindet sich der Großteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten im marginalen Pool. Diese Zellen können durch verschiedene Faktoren mobilisiert werden, unter anderem durch Katecholamine (56).

Die bei den Erysipelpatienten verzeichnete Zunahme der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl kann zum Teil mit der Mobilisation aus dem marginalen Pool erklärt werden, aber wahrscheinlicher ist eine durch Zytokine gesteuerte Differenzierung aus klassischen Monozyten für den deutlichen Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Zellzahl verantwortlich. Diese Vermutung wird durch die fünftägige Verlaufsbeobachtung unterstützt (siehe Abb. 4-4), die eine allmähliche Entwicklung von CD14 hoch- zu CD14 niedrigexprimierenden Zellen zeigt. Trotzdem bleibt die wichtige Frage offen, ob eine zytokininduzierte Differenzierung von CD14⁺⁺ Monozyten zu den reiferen CD14⁺CD16⁺ Monozyten führt und damit ihre Gesamtzahl erhöht, oder ob die Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl im zentralen Pool nur eine relative Vermehrung ist und eine auf Kosten des marginalen Pool verstärkte Mobilisierung dieser Zellen widerspiegelt.

Diese Frage kann vermutlich nur durch weitere Mobilisationsstudien von Patienten mit lokalisierten Entzündungen, die wie beim Erysipel eine Zellzahlvermehrung bei Blutabnahme in Ruhe aufzeigen, beantwortet werden.

Dabei stellt sich als nächstes die Frage, ob die CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahlvermehrung spezifisch nur beim Erysipel vorkommt oder auch bei anderen lokalisierten Entzündungen mit Gruppe A Streptokokken, wie z.B. bei Tonsillitis, nachzuweisen ist.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit eine ausgeprägte Vermehrung der CD14⁺CD16⁺ Monozytenzellzahl bei einer lokalisierten Hautentzündung aufgezeigt werden. Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Entzündungsreaktion mit einer zunehmenden Differenzierung mononukleärer Phagozyten zum CD14⁺CD16⁺-Phänotyp assoziiert ist und deshalb auch als Indikator für den Krankheitsverlauf zuverlässiger als die Monozytengesamtzahl ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten bei gesunden Probanden dreimal soviel TNF produzieren wie die klassischen Monozyten. Diese proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten, die bei den Erysipelpatienten eine signifikant geringere Zytokinproduktion aufweisen als bei den Kontrollspendern, scheinen in der Immunabwehr grampositiver Bakterien eine wichtige Rolle zu spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alkan ML, Beachy EH. 1978. **Excretion of lipoteichoic acid by group A Streptococci. Influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral mucosal cells.** J. Clin. Invest. 61:671-7.
2. Allard P, Stücker M, von Kobyletzki G, el Gammal S, Altmeyer P. 1999. **Zyklische intravenöse Antibiose als effizientes Therapiekonzept des chronisch-rezidivierenden Erysipels (Cyclical intravenous antibiosis as an effective therapy concept in chronic recurrent erysipelas).** Hautarzt. 50(1):34-8.
3. Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. 2000. **CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived *in vitro* from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics.** Eur. J. Immunol. 30:1872-83.
4. Bazzoni F, Beutler B. 1996. **The tumor necrosis factor ligand and receptor families.** New Engl. J. Med. 334(26):1717-25.
5. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. 2002. **The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF.** J. Immunol. 168:3536-42.
6. Bisno AL, Stevens DL. 1996. **Streptococcal infections of skin and soft tissue.** N. Engl. J. Med. 334(4):240-5.
7. Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle-Rowson G. 1997 **Cytokine production precedes the expansion of CD14⁺CD16⁺ Monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia.** Shock. 8(1):73-5.
8. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. 1996. **Dermatologie und Venerologie.** Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio. S. 199-202.

9. Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HWL. 1996. **Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages.** J. Inflamm. 46:78-85.
10. Chartier C, Grosshans E. 1996. **Erysipelas: an update.** Int. J. Dermatol. 35(11):779-81.
11. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. 1996. **Lipoteichoic acid preparations of Gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway.** Infect. Immun. 64(6):1906-12.
12. Delves PJ, Roitt IM. 2000. **The immune system.** N. Engl. J. Med. 343(1): 37-49.
13. Descamps V. 1998. **Physiopathologie des dermo-hypodermes infectieuses (Physiopathology of infectious dermatitis).** Ann. Dermatol. Venereol. 125(11):839-44.
14. Dinarello CA. 1999. **Cytokines as endogenous pyrogens.** J. Infect. Dis. 179(Suppl.2):S294-304.
15. Durando MM, Meier KE, Cook JA. 1998. **Endotoxin activation of mitogen-activated protein kinase in THP-1 cells; diminished activation following endotoxin desensitization.** J. Leukoc. Biol. 64:259-64.
16. Eriksson B, Jorup-Rönström C, Karkkonen K, Sjöblom AC, Holm SE. 1996. **Erysipelas: clinical and bacteriologic spectrum and serological aspects.** Clin. Infect. Dis. 23(5):1091-8.
17. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. 1995. **Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients.** Blood. 85:1341-7.

18. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HWL. 1993. **The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients.** Blood. 82(10):3170-6.
19. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL. 1998. **Selective depletion of CD14⁺CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy.** Clin. Exp. Immunol. 112:501-6.
20. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock HWL. 1998. **Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes in critically ill cardiac surgery patients.** Inflammation. 22(4):367-78.
21. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HWL. 1996. **Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis.** Blood. 87(1):373-7.
22. Fujihara M, Wakamoto S, Ito T, Muroi M, Suzuki T, Ikeda H, Ikebuchi K. 2000. **Lipopolysaccharide-triggered desensitization of TNF- α mRNA expression involves lack of phosphorylation of I β Ba in a murine macrophage-like cell line, P388D1.** J. Leukoc. Biol. 68:267-76.
23. Hahn, Falke, Klein. 1991. **Medizinische Mikrobiologie.** Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio. S. 270ff.
24. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. 2000. **Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2.** J. Immunol. 165:618-22.
25. Hübl W, Wolfbauer G, Andert S, Thum G, Streicher J, Hübner C, Lapin A, Bayer PM. 1997. **Toward a new reference method for the leukocyte five-part differential.** Cytometry 30:72-84.

26. Janeway CA, Travers P. 1997. **Immunologie**. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford. S. 61-2.
27. Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HWL. 1999. **NF- κ B1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression**. Infect. Immun. 67:1553-9.
28. Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. 2000. **CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation in Kawasaki disease**. Clin. Exp. Immunol. 121:566-70.
29. Kirschnig CJ, Wesche H, Ayres TM, Rothe M. 1998. **Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide**. J. Exp. Med. 188:2091-7.
30. Kohler NG, Joly A. 1997. **The involvement of an LPS inducible κ B kinase in endotoxin tolerance**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 232:602-7.
31. Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. 2001. **The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection**. Curr. Opin. Immunol. 13:104-8.
32. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. 1999. **Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products**. J. Biol. Chem. 274:33419-25.
33. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. 2000. **TNF- α gene expression in macrophages: regulation by NF- κ B is independent of c-Jun of C/EBP β** . J. Immunol. 164:4277-85.
34. Louie L, Simor AE, Louie M, McGeer A, Low DE. 1998. **Diagnosis of group A streptococcal necrotizing fasciitis by using PCR to amplify the streptococcal pyrogenic exotoxin B gene**. J. Clin. Microbiol. 36(6):1769-71.

35. Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, Calabrese C, Peluso G. 1998. **Role of monocyte / macrophage population in immune response.** *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 53(1):92-6.
36. McCall CE, Grosso-Wilmoth LM, LaRue K, Guzman RN, Cousart SL. 1993. **Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 β gene in blood neutrophils of humans with sepsis syndrome.** *J. Clin. Invest.* 91:853-61.
37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. **A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature.* 399:394-7.
38. Mizel SB. 1989. **The interleukins.** *FASEB J.* 3(12):2379-88.
39. Munn DH, Bree AG, Beall AC, Kaviani MD, Sabio H, Schaub RG, Alpaugh RK, Weiner LM, Goldman SJ. 1996. **Recombinant human macrophage colony-stimulating factor in nonhuman primates: selective expansion of a CD16⁺ monocyte subset with phenotypic similarity to primate natural killer cells.** *Blood.* 88:1215-24.
40. Munn DH, Garnick MB, Cheung NKV. 1990. **Effects of parenteral recombinant human macrophage colony-stimulating factor on monocyte number, phenotype, and antitumor cytotoxicity in nonhuman primates.** *Blood.* 75:2042-8.
41. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. 1991. **Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis.** *J. Clin. Invest.* 88:1747-54.
42. Nockher WA, Bergmann L, Scherberich JE. 1994. **Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients.** *Clin. Exp. Immunol.* 98:369-74.

43. Nockher WA, Scherberich JE. 1998. **Expanded CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis.** Infect. Immun. 66(6):2782-90.
44. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL. 1989. **Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.** Blood. 74(7):2527-34.
45. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. 1984. **Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.** Nature. 312(5996):724-9.
46. Petit A. 1996. **Erysipèle. Données récentes et questions d'actualité (Erysipelas. Recent data and current concept).** Ann. Dermatol. Venereol. 123(9):585-93.
47. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli, Layton B, Beutler B. 1998. **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene.** Science. 282:2085-8.
48. Rivier A, Pene J, Rabesandratana H, Chanez P, Bousquet J, Campbell AM. 1995. **Blood monocytes of untreated asthmatics exhibit some features of tissue macrophages.** Clin. Exp. Immunol. 100:314-8.
49. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W, Schmitz G. 1996. **Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Cell Biol. 16:1437-47.
50. Saionji K, Ohsaka A. 2001. **Expansion of CD16⁺ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor.** Acta Hematol. 105:21-6.

51. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH. 1995. **CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor.** Blood. 85:2910-7.
52. Schmid I, Baldwin GC, Jacobs EL, Isacescu V, Neagos N, Giorgi JV, Glaspy JA. 1995. **Alterations in phenotype and cell-surface antigen expression levels of human monocytes: differential response to *in vivo* administration of rhM-CSF or rhGM-CSF.** Cytometry. 22:103-10.
53. Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H. 2000. **Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement.** Immunol. Today. 21(3):110-3.
54. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. **MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.** J. Exp. Med. 189(11):1777-82.
55. Smolle J, Kahofer P, Pfaffenthaler E, Kerl H. 2000. **Risikofaktoren für das Auftreten von lokalen Komplikationen beim Erysipel (Risk factors for local complications in erysipelas).** Hautarzt. 51(1):14-8.
56. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack Matthias, Ziegler-Heitbrock HWL. 2000. **Selective mobilisation of CD14⁺CD16⁺ monocytes by exercise.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 279:C578-86.
57. Stibenz D, Bühner C. 1994. **Down-regulation of L-selectin surface expression by various leukocyte isolation procedures.** Scand. J. Immunol. 39:59-63.
58. Tarsi-Tsuk D, Levy R. 1990. **Stimulation of the respiratory burst in peripheral blood monocytes by lipoteichoic acid.** J. Immunol. 144(7):2665-70.
59. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N. 1995. **CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection.** Eur. J. Immunol. 25:3418-24.

60. Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL. 2000. **Activation of Toll-Like Receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10.** J. Immunol. 163:3804-10.
61. Trampisch HJ, Windeler J, Ehle B, Lange S. 1997. **Medizinische Statistik.** Springer-Verlag. S. 65ff, S. 76ff, S. 212ff, S.238ff.
62. Van Snick J. 1990. **Interleukin-6: an overview.** Annu. Rev. Immunol. 8:253-78.
63. Wang JE, Jorgensen PF, Almlöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. 2000. **Peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model.** Infect. Immun. 68(7):3965-70.
64. Weiner LM, Li W, Holmes M, Catalano RB, Dohnansky M, Padavic K, Alpaugh RK. 1994. **Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects.** Cancer Res. 54:4084-90.
65. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. 1998. **Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.** Nature. 395:284-8.
66. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. 1999. **Cutting edge: Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2.** J. Immunol. 163:1-5.
67. Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A. 1993. **The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages.** Eur. J. Immunol. 23:2053-8.

68. Ziegler-Heitbrock HWL, Passlick B, Flieger D. 1988. **The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood.** Hybridoma. 7(6):521-7.
69. Ziegler-Heitbrock HWL, Wedel A, Schraut W, Ströbel M, Wendelgast P, Sternsdorf T, Bäuerle PA, Haas JG, Riethmüller G. 1994. **Tolerance to Lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor κ B with predominance of p50 homodimers.** J. Leukoc. Biol. 269:17001-4.
70. Ziegler-Heitbrock HWL. 1995. **Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide.** J. Inflamm. 45:13-26.
71. Ziegler-Heitbrock HWL. 1996. **Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺CD16⁺ subpopulation.** Immunol. Today. 17(9):424-8.

7 Abkürzungen

ACTH	A drenocortico t ropes H ormon
ADNase B	A ntideoxyribonuklease B
Ag	A ntigen
Ak	A ntikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (A ntigen P resenting C ell)
ASL	A ntistreptolysin
BFA	B refeldin A
BKS	B luträgerchensenkungs geschwindigkeit
CD	C luster of D ifferentiation
CRP	C -reaktives P rotein
CSF	Koloniestimulierender Faktor (C olony- S timulating F actor)
DMSO	D imethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure (E thylene d iamine t etraacetic A cid)
ELISA	E nzyme-linked I mmunosorbent A ssay
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orter
FITC	F luorescein- I sothiocyant
FKS	F ötale K älberserum
FSC	F orward S catter
GM-CSF	G ranulocyte- M acrophage- C olony- S timulating F actor
HLA	H umanes L eukozyten A ntigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (H orse r adish- P eroxidase)
ICAM	I ntercellular A dhesion M olecule
IFN	I nterferon
Ig	I mmunglobulin
IE	I nternationale E inheiten
i.m.	i ntra m uskulär
IL	I nterleukin
i.v.	i ntra v enös
kD	k ilo D alton
LPS	L ipopolysaccharid
LTA	L ipoteichonsäure (L ipoteichoic A cid)

MAP	Mitogen-Activated Protein
mAk	monoklonaler Antikörper
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Ribonucleinacid)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natürliche Killerzelle
PB	Polymyxin B
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate-Buffered Saline)
PC5	R-Phycoerythrin-Cyanin 5
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
p.o.	per os
rh	rekombinantes humanes
R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur (18-25 °C)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
STSS	Streptococcal Toxic Shock Syndrome
SSC	Side Scatter
TC	TriColor
TCR	T Cell antigen Receptor
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNA	Test nicht ausgeführt
TNF	Tumornekrosefaktor
WPB	Vollblut (Whole Peripheral Blood)

8 Anhang

Daten der Erysipelpatienten und Kontrollspender

Patient	Alter [Jahren]	Ge- schlecht	BKS 1h/2h [mm]	Temp. [°C]	CRP [mg/dl]	ASL- / ADNaseB-Titer	Betroffene Hautstelle	IL-6 [pg/ml]	M-CSF [pg/ml]	CD14+CD16+ [Zellen/ μ l]	Weitere Diagnosen / Erkrankungen
P1	65	m	72/81	36,6	14,5	Abfall ^{a)} (ADNaseB)	US ^{c)}	12,9	807,1	182	Keine
P2	60	m	40/60	36,8	2,7	Anstieg ^{a)} (ADNaseB)	US	9,3	450,4	118	Kontaktsensibilisierung
P3	71	w	TNA	36,8	3,7	Abfall (ASL)	US, Rez ^{d)}	5,1	631,5	35	Ulcera crurum, Kontaktsensibilisierung, Claforanunverträglichkeit
P4	71	m	78/80	39,4	29,7	Anstieg (ASL)	US	96,6	793,3	345	Adipositas, Intertrigo, Chronisch-venöse Insuffizienz II.° mit Stauungsekzem, Tinea pedum
P5	64	m	50/60	37,8	26,9	Anstieg (ASL)	US	24,8	1337,9	121	Adipositas, Z.n. tiefer Venenthrombose mit post- thrombotischem Syndrom & Kniegelenksprothese
P6	65	m	70/80	37,4	3,7	Anstieg (ASL)	US, Rez	8,7	210,8	116	Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Polyvalente Kontaktsensibilisierungen
P7	31	m	52/60	36,6	4,8	> 1000 (ADNaseB)	US, Rez	4,8	276,8	91	Adipositas, Fußekzem, Polyvalente Kontaktsensibilisierungen
P8	56	m	TNA	37,2	6,2	Abfall (ASL)	Gesicht	16,1	385,2	129	Keine
P9	59	w	50/80	36,6	8,9	Anstieg (ADNaseB)	Gesicht	10,3	962,8	117	Follikulitis li US, Dysplastischer Naevuszellnaevus am linken Oberarm lateral
P10	64	m	34/65	36,2	3,2	> 1000 (ASL)	US, Rez	114,9	707,5	127	Pediculosis corporis
P11	44	m	78/90	38,4	6,0	> 1000 (ADNaseB)	US, Rez	477,1	800	171	Lymphangitis des linken Beines, Ulcera cruri, sta- tische Veneninsuffizienz, Kontaktsensibilisierungen
P12	37	w	22/43	36,5	5,4	Anstieg (ASL)	Gesicht	5,4	465,2	138	Verrucae plantares
	57+/-13 ^{b)}	3w/9m		37,2 +/-0,9 ^{b)}	9,6 +/-9,3 ^{b)}			65,5 +/-134,9 ^{b)}	652,4 +/-318,9 ^{b)}	140,8+/-73,9 ^{b)}	
Kontrollspender											
	57+/-7,1 ^{b)}	5w/7m								48,7+/-19,9 ^{b)}	

a) Über dreifachem Anstieg oder Abfall des Titers innerhalb von drei Monaten.

b) Mittelwert +/- Standardabweichung

c) US = Unterschenkel

d) Rez = Rezidiverysipel

Danksagung

Für die Aufgabenstellung, die Anleitung und Beratung zur richtigen Vorgehensweise bei den Experimenten und für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Ziegler-Heitbrock vielmals danken.

Außerdem ein großer Dank an Professor Dr. Riethmüller, der die Anfertigung der Arbeit im Institut für Immunologie unterstützt hat, und an Herrn Priv. Doz. Dr. Prinz, der die Zusammenarbeit mit der Dermatologischen Klinik an der Thalkirchenerstraße ermöglicht hat. Danken möchte ich ebenso Frau Frankenberger, die mir die ELISA-Methodik beigebracht hat und mir bei Fragen und Problemen zur Seite stand, sowie Herrn Belge für die Vorbereitung, Betreuung und häufige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche am FACS-Analyser.

Frau Multhaupt, Frau Orthgieß und Frau Urban gilt mein herzlicher Dank für die Bestimmung der ASL- und ADNaseB-Titer.

Herrn Laborde danke ich für die moralische Unterstützung, Einleitung bei diversen Computerprogrammen und Hilfestellung bei der Formatierung und Bildbearbeitung dieser Doktorarbeit.

Ferner möchte ich mich bei allen Bekannten und Mitarbeitern, die sich als Probanden und Kontrollpersonen im Laufe dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben, ganz besonders bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie in München, sowie denjenigen vom GSF-Forschungszentrum in Gauting danke ich für ihre gute Kooperation und für die aufmunternden Mittags- und Kaffeepausen.

Schließlich geht mein ganz besonderer Dank an meine Freunde und an meine Familie für ihre bereitwillige psychische und tatkräftige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Alexia Jacqueline Horelt

24. August 1976 Geboren in München als erstes Kind von Gerhard Horelt und Jacqueline Corlieu, verheiratete Horelt.

II. Schulausbildung

08/1982-07/1986 Besuch der Grundschule in München.

08/1986-07/1995 Besuch des Willi-Graf-Gymnasiums in München.

06/1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit der Note «Sehr Gut».

III. Medizinstudium

10/1995-05/2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, dabei:

09/1997 Ärztliche Vorprüfung (Note: «Gut»).

08/1998 Erstes Staatsexamen (Note: «Gut»).

10/1998 Erster Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens (Step 1 of USMLE) bestanden.

04/2001 Zweites Staatsexamen (Note: «Gut»).

05/2002 Drittes Staatsexamen (Note: «Gut»).

01/1999-10/2001 Promotionsarbeit am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter der Leitung von Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock.

IV. Facharztausbildung

09 und 10/2002 Beschäftigung als «Faisant fonction d'interne (FFI)» auf der Kinderstation von Prof. Chevallier im Universitätskrankenhaus «Ambroise Paré» der V. Universität von Paris.

11/2002-04/2003 Beschäftigung als FFI auf der pädiatrischen Notaufnahme der Abteilung von Prof. Garnier im «Hôpital Nord» der Universität Aix-Marseille II.

seit 05/2003 Beschäftigung als FFI auf der polyvalenten Kinderintensivstation von Dr. Lagier, Abteilung von Prof. Martin, im «Hôpital Nord» der Universität Aix-Marseille II.

Erklärung

Ich versichere, meine Doktorarbeit selbständig angefertigt und keine Hilfsmittel oder Quellen benutzt zu haben, die nicht angegeben sind.
