

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

Die Bedeutung der Interaktion von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen für die postoperative Immunsuppression abdominalchirurgischer Patienten



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

vorgelegt von
Dominik Stephan Quaiser
aus
München
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin K. Angele

Mitberichterstatter: PD Dr. Viktoria Bogner-Flatz
Dr. Dirk Baumjohann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Markus Albertsmeier

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018

Gewidmet
Meinen Eltern in Dankbarkeit

Auszüge aus der Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- T-cell immunosuppression following surgery is not mediated via dysfunctional macrophages. 33rd Annual Meeting of the Shock Society. Juni 2010, Portland, Oregon, USA (ausgezeichnet mit dem „Young Investigators Travel Award“)

Wissenschaftliche Veröffentlichung

- Major Surgical Trauma differentially affects T-cells and APC
Albertsmeier M, **Quaiser D**, von Dossow-Hanfstingl V, Winter H, Faist E, Angele MK
Innate Immunity, 2015, Vol.21(1) 55-64.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	PATHOPHYSIOLOGIE DES OPERATIVEN TRAUMAS.....	7
1.2	DIE ANTWORT DES ORGANISMUS AUF ZELLULÄRER EBENE	8
1.3	FRAGESTELLUNG	12
2	HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	STUDIENDESIGN.....	14
3.2	PATIENTEN.....	14
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	14
3.2.2	Patientenkollektiv und Interventionen.....	15
3.3	EXPERIMENTELLE METHODEN	16
3.3.1	Versuchsaufbau	16
3.4	UNTERSUCHUNGSMETHODEN.....	17
3.4.1	Gewinnung von Gewebe	17
3.4.2	Zelltrennung mittels Ficoll® Lösung	17
3.4.3	Immunomagnetische Zellsortierung	19
3.4.4	Einfrieren der 24 Stunden präoperativ gewonnenen Zellen	23
3.4.5	Auftauen der 24 Stunden präoperativ gewonnenen Zellen.....	23
3.4.6	Herstellung der Zellkulturen und Stimulation	24
3.4.7	Durchflusszytometrie	25
3.4.8	Bio Plex Assay	28
3.5	STATISTIK	30
4	ERGEBNISSE.....	31
4.1	ZELLOBERFLÄCHENMARKER.....	31
4.1.1	Oberflächenmarkerexpression der T-Zellen.....	31
4.1.2	Oberflächenmarkerexpression der Antigen-präsentierenden Zellen	33
4.2	ZYTOKINSEKRETION AUS DEN CO-KULTUREN DER T-ZELLEN UND APC.....	34
4.2.1	T-Zell spezifische Zytokine.....	34

4.2.2	APC spezifische Zytokine	36
5	DISKUSSION	39
5.1	PROBLEMSTELLUNG	39
5.2	EXPERIMENTELLER VERSUCHSAUFBAU	40
5.3	ANALYSE DER T-ZELLFUNKTION	43
5.4	ANALYSE DER FUNKTION ANTIGEN-PRÄSENTIERENDER ZELLEN	45
5.5	KLINISCHE RELEVANZ.....	47
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	48
7	LITERATURVERZEICHNIS	49
8	DANKSAGUNG.....	55
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	56
10	ANHANG.....	57

1 EINLEITUNG

1.1 PATHOPHYSIOLOGIE DES OPERATIVEN TRAUMAS

Bei zahlreichen abdominellen Erkrankungen (Tumoren, chronischen Entzündungen, Ulerca, etc.) stellt die moderne Chirurgie eine wesentliche therapeutische Option dar. Große viszeralchirurgische Operationen bedingen jedoch - auch bei Verwendung einer schonenden Präparationstechnik - ein relevantes Gewebetrauma. Der hierbei entstehende direkte, mechanische Insult führt neben der Gewebe- bzw. Zellschädigung auch zu Blutverlust, Hypoxie, Verbrauchskoagulopathie und Ischämie. Diese stellen induzierende Faktoren für eine Immunabwehrreaktion dar. In diesem Fall wird die Immunreaktion durch das Ausmaß der Zellschädigung ausgelöst im Gegensatz zu Pathogenen.

In traumatisiertem Gewebe kommt es durch im Gewebe lokalisierte Immunzellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen) zu einer ersten, unspezifischen Immunreaktionen. Sessile Makrophagen, auch Phagozyten genannt, sind Teil dieser Immunreaktion. Ihre Funktion besteht darin, eindringende Mikroorganismen zu phagozytieren und zu zerstören. Außerdem sorgen sie für eine Wiederherstellung der Homöostase und sie initiieren die Gewebe- bzw. Wundheilung bzw. kontrollieren im Rahmen des chirurgischen Traumas das Ausmaß an Gewebeerletzung durch Phagozytose von nekrotischem Gewebe. Hierzu sezernieren sie große Mengen proinflammatorischer Zytokine. Diese locken initial über Chemotaxis lokale Immunzellen und andere Helferzellen (z.B. T-Zellen) an den Ort des Traumas und spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der adaptiven, spezifischen Immunantwort. Spezifische Reaktionen betreffen die zellvermittelte Immunantwort wie z.B. die Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen über eine MHC-II-abhängige Präsentation von Antigenen. Dies führt in Antigen-präsentierenden Zellen außerdem zu einer verstärkten Expression co-stimulatorischer Oberflächenrezeptoren. Für eine ausreichende T-Zellinteraktion und deren Aktivierung migrieren aktivierte APCs aus der Peripherie in sekundäre lymphatische Organe [1]. In Abhängigkeit der sezernierten Zytokine differenzieren naive T-Zellen durch die Zellinteraktion in den Th1-Subzelltyp (IL-2, IFN- γ) mit proinflammatorischer Wirkung bzw. in den Th-2 Subzelltyp (IL-4, IL-10) mit antiinflammatorischer Wirkung.

Bei entsprechendem Trauma findet jedoch auch eine systemische Sezernierung von inflammatorischen Mediatoren im Rahmen der „Akuten Phase Reaktion“ [2] über die Blutbahn statt. Ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) bildet sich aus. Diese Immunantwort beginnt ca. 30 min nach dem Trauma und ist Folge des Blutverlusts. Mit dem Ausmaß an freigesetzten proinflammatorischen Zytokinen korreliert das Auftreten von für den Organismus schädlichen

Funktionsstörungen [3]. Bei anhaltender Zytokinausschüttung können sogar anfangs nicht betroffene Organe in Mitleidenschaft gezogen werden. Auf diesem Weg kann das SIRS zu einem Multiorganversagen führen [2, 4, 5]. Kompensatorisch zum SIRS entwickelt sich jedoch im Verlauf der durch prolongierte Sekretion von Mediatoren entstandenen Hyperinflammation eine Immunsuppression, auch *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) genannt [2, 5]. Durch die der Hyperinflammation entgegenwirkende Immunsuppression kommt es zu Deaktivierungen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) mit daraus resultierender reduzierter Antigenpräsentation und Anergie der T-Zellen [6, 7]. Hieraus resultiert eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und Sepsis.

In der initialen Phase der Zell-vermittelten Immunantwort im Rahmen eines chirurgischen Traumas zeigt sich ein Abfall der T-Zell vermittelten Immunität [8, 9]. Hier ist speziell die Interaktion von Antigen-präsentierenden-Zellen und T-Zellen betroffen, welche gerade zu Beginn der Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt und nach Trauma und Hämorrhagie in ihrer Reaktion verzögert ist [10, 11]. Ferner konnte gezeigt werden, dass es 7 Tage nach chirurgischen Eingriffen zu einer Verringerung von T-Zellen wie auch Antigen-präsentierenden Zellen kommt. Dies wiederum geht einher mit einer verminderten proinflammatorischen Th1-Zytokinproduktion (IL-2, IFN- γ) und einer gesteigerten Ausschüttung von potentiell immunsuppressiven Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10) [12] und ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit assoziiert [13]. Die Folge ist ein Ungleichgewicht aus proinflammatorischer Th-1 und antiinflammatorischer Th-2 Antwort [14].

Außerdem können viszeralchirurgische Operationen, wie z.B. komplexe Leberresektionen, mit einem nicht unerheblichen Blutverlust einhergehen, ein hämorrhagischer Schock kann dann die Folge sein [15-17]. Hierbei kommt es im Körper akut zu einer lokalen als auch zu einer systemischen Anpassungsreaktionen mit Blutdruckabfall und konsekutiver Zentralisierung des Blutvolumens ausgelöst durch die Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen. Dies führt lokal zu einer Gewebeminderperfusion aufgrund der Vasokonstriktion des Kapillarbettes und der Herabsetzung der Katecholaminempfindlichkeit im betroffenen Gewebe [18, 19]. Bei Fortbestehen dieser Gewebeminderperfusion entsteht durch zunehmende Endothelleckage zusätzlich ein loko-regionäres vasogenes Ödem, was die Gewebeminderperfusion wiederum verstärkt und letztendlich die Ausbildung einer Gewebehypoxie unterstützt [18]. Es entsteht ein *Circulus vitiosus*.

1.2 DIE ANTWORT DES ORGANISMUS AUF ZELLULÄRER EBENE

Die Interaktion von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen im Rahmen einer Immunreaktion wird auch als immunologische Synapse oder supramolekularer Adhäsionskomplex (SMAC) bezeichnet [20, 21]. Für die vollständige Aktivierung eines Zelltyps bedarf es mehrerer Rezeptorverbindungen und Co-Verbindungen (CD3, CD4, CD8, CD28, CD80, CD86) [22-27]. Hierbei bindet zum einen der

T-Zellrezeptor an das durch den MHC-II Komplex der Antigen-präsentierenden Zelle präsentierte Peptid. Diese Verbindung wird je nach T-Zelltyp durch die Co-Rezeptoren CD4 (T-Helfer Zellen) oder CD 8 (exprimiert auf zytotoxischen T-Zellen) verstärkt, wobei CD 8 an MHC-I bindet. CD4 ist vor allem für die Erkennung des MHC-II Komplexes mitverantwortlich.

Aus der Verbindung von CD28 auf T-Zellen mit den auf APCs exprimierten CD80 bzw. CD86 resultiert eine Sekretion von Zytokinen wie z.B. IL-6, TNF- α oder IFN- γ [28-31]. Manche dieser co-stimulatorischen Moleküle sind konstitutiv auf den Zelloberflächen exprimiert wie z.B. CD28. Andere werden nach Aktivierung induziert (CD40). Diese Co-Rezeptoren sind in der Lage sowohl positive (CD28) als auch negative (CTLA-4) [32] Signale autokrin wie auch parakrin zu vermitteln [33].

Verschiedene Mechanismen sowohl in T-Zellen wie auch in Antigen-präsentierenden Zellen werden für eine insuffiziente Interaktion dieser Zelltypen im Rahmen einer unzureichenden Immunreaktion verantwortlich gemacht. Gerade zu Beginn einer Immunreaktion, aber auch bei deren Aufrechterhaltung spielen Antigen-präsentierende Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen eine wichtige Rolle [34]. Vor allem die MHC II Expression (Major Histocompatibility Compound) auf APCs zeigt sich gerade nach Blutverlust und Trauma erniedrigt [29, 35]. Hieraus resultiert eine geringere Antigenpräsentation [29], da allein Antigen-präsentierende Zellen die Fähigkeit besitzen über Phagozytose fremde Antigene oder Bakterien aufzunehmen, diese zu zerkleinern und anschließend mit Hilfe des MHC-II Rezeptors Antigenfragmente den T-Zellen zu präsentieren [29].

Von CD4 positiven T-Zellen werden nur Antigene erkannt, die über diesen MHC-II Rezeptor präsentiert werden [36, 37]. Wie Ayala et al. im Mausmodell aufzeigen konnten, begünstigt eine verminderte Oberflächenmarkerexpression bzw. Antigenpräsentation die Entstehung einer unzureichenden Immunantwort mit steigender Anfälligkeit für Infektionen und Sepsis [13, 38, 39]. Im Tiermodell zeigten sich die auf APCs exprimierten co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nach Trauma und Hämorrhagie nicht beeinflusst [10]. Wohl aber war die Fähigkeit der APCs IL-12 auszuschütten nach Trauma mit Blutverlust und Stimulation durch Lipopolysaccharide erniedrigt [8, 12]. Das von APCs produzierte und ausgeschüttete IL-12 spielt jedoch im Rahmen der Akuten Phase Reaktion eine zentrale Rolle. Es aktiviert die T-Zellantwort, welche wiederum die Produktion und Ausschüttung von IFN- γ und IL-2 seitens der T-Zellen bedingt.

Zusätzlich zeigt sich sowohl nach operativem Trauma wie auch bei schwerverletzten Unfallopfern die Sekretionsfähigkeit von IL-6 und TNF- α herabgesetzt [8]. Dies belegen sowohl klinische wie auch tierexperimentelle Studien [2, 3, 40-42] im Rahmen unterschiedlicher Traumata wie Verbrennungen, Frakturen von Knochen oder aber traumatisch-hämorrhagischer Schocksituationen [2, 3, 15, 41, 42]. Für eine adäquate Immunreaktion im Rahmen der frühen „Akute Phase Reaktion“ sind auch diese Botenstoffe unerlässlich [12, 43, 44]. Eine unzureichende Produktion von IL-12, bedingt durch einen

selektiven Defekt in Monozyten, besitzt einen prognostischen Stellenwert für die Entwicklung einer Sepsis und einer postoperativen Mortalität [45].

Während des Ablaufes der Immunreaktionskaskade kommt es nicht nur zu Funktionsstörungen an APCs wie z.B. einer reduzierten MHC-II Expression oder einer verminderten IL-12 Sekretion, es entwickeln sich auch Störungen der T-Zellfunktion wie klinische und auch tierexperimentelle Studien belegen konnten [3, 8, 46]. Ähnlich wie APCs weisen auch T-Zellen spezifische Oberflächencharakteristika auf, wie z.B. den T-Zell Rezeptor Komplex (TCR), bestehend aus einer α - und einer β -Kette [22, 27] sowie der T-Zellen charakterisierenden Auxiliärproteine, CD4 und CD8 und weitere co-stimulatorische Moleküle wie CD28, die für die Interaktion von T-Zellen und APCs benötigt werden [47]. In experimentellen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass T-Zellen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine reduzierte T-Zellproliferation aufweisen [3, 13], die wiederum mit einer erhöhten posttraumatischen Komplikationsrate assoziiert ist [3, 48].

Trauma, Operationen und Hämorrhagie führen zu einem signifikanten Rückgang der Lymphozytenzahl [49-51]. Auch eine reduzierte T-Zellproliferation bei verminderter MHC-II Expression und eingeschränkter APC-T-Zellinteraktion bzw. Co-Stimulation trägt im Verlauf der Immunreaktion zur Verschiebung der Immunantwort von einer proinflammatorischen Th1-Zytokinproduktion (IL-2, IFN- γ) zu einer von Th2-Zellen vermittelten Sekretion potentiell antiinflammatorischer, immunsuppressiver Zytokine (IL-4, IL-10) [9, 12]. Hierdurch wird auch die Expression der Arginase-1 der aus abgeleiteten myeloiden Suppressorzellen (MDSC) verstärkt. Dies führt zu einem Argininmangel welcher wiederum die T-Zellfunktion beeinträchtigt [9, 52, 53].

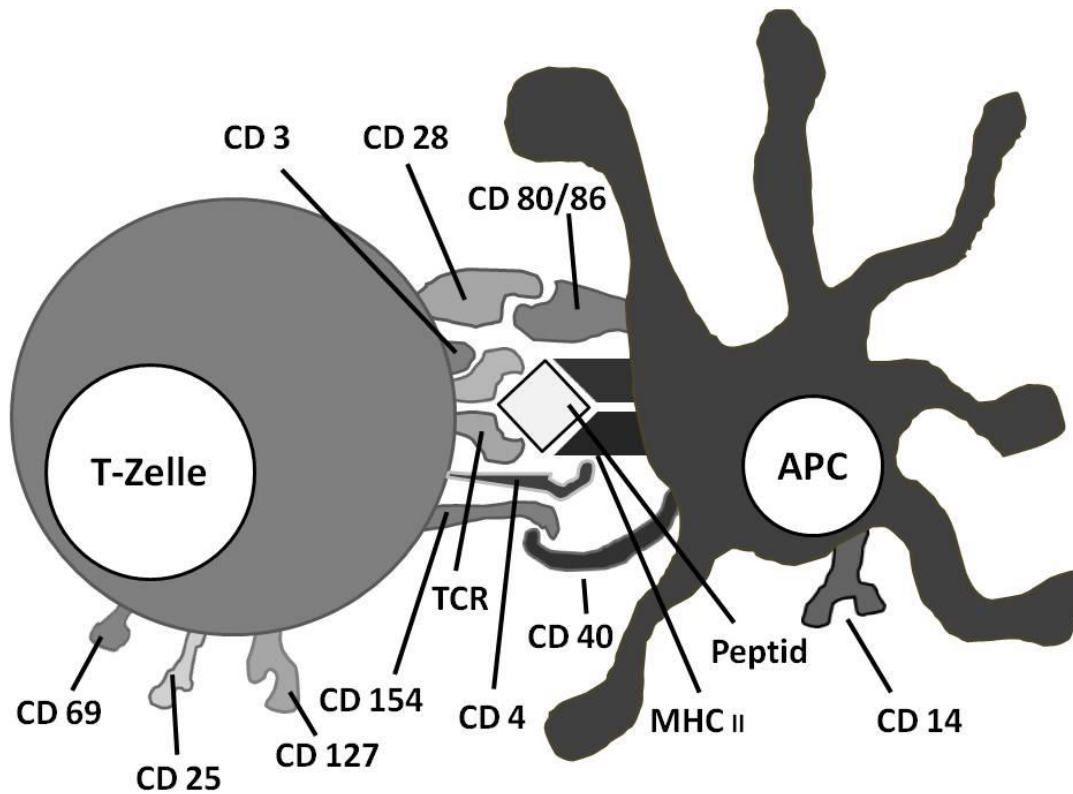


Abbildung 1.1 Interaktion von T-Zellen und Antigen präsentierenden Zellen: Die immunologische Synapse

Tabelle 1.1 Übersicht der Rezeptorfunktionen

Rezeptor	Funktion
TCR	Bindet das von MHC-II auf APC präsentierte Peptid
CD3	Co-Rezeptor des TCR
CD4	Die Interaktion verstärkender T-Zell Co-Rezeptor.
CD8	T-Zell Co-Rezeptor, welcher an das MHC-I Molekül bindet
CD14	LPS-bindendes Oberflächenprotein auf Monozyten
CD16	Niedrig affiner IgG-Rezeptor auf APCs
CD25	α-Kette des IL-2 Rezeptors
CD28	CD80- und CD86-Ligand auf T-Zellen
CD40	Co-Rezeptor auf APC
CD69	Früher Aktivitätsmarker auf T-Zellen
CD80	Co-stimulatorischer Rezeptor für die T-Zellaktivierung
CD86	Co-stimulatorischer Rezeptor für die T-Zellaktivierung
CD127	IL-7 Rezeptor exprimiert auf regulatorischen T-Zellen
CD154	APC stimulierender CD40-Ligand auf aktivierten T-Zellen
MHC II	Präsentiert gebundene Peptide auf der Zelloberfläche

1.3 FRAGESTELLUNG

Die genauen Mechanismen, die zur Störung der Immunantwort nach großen chirurgischen Eingriffen führen, bleiben noch weitgehend unverstanden. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass eine veränderte Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen einen wichtigen Mechanismus darstellen könnte. Hierbei spielen die Präsentation wie auch das Erkennen von Antigenen eine zentrale Rolle. Auch die Rolle der veränderten zellspezifischen Zytokinsekretion ist noch nicht bis ins Detail verstanden.

Daher versucht die folgende Arbeit Klarheit zu schaffen, welche der oben genannten Immunzellen in der Akutphase nach viszeralchirurgischen Operationen, die Fehlanpassung der Immunreaktion initiiert. Ferner soll hierbei der zugrundeliegende zellspezifische Mechanismus untersucht werden.

2 HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Es wird angenommen, dass APC und T-Zellen postoperativ zahlenmäßig verändert sind und eine veränderte Expression Ihrer Oberflächenmarker aufweisen. Zu dieser Frage werden aus dem Blut viszeralchirurgischer Patienten die entsprechenden Zellen isoliert und anhand Ihrer Oberflächenmarker charakterisiert. Ferner wird angenommen, dass sich diese Zellen postoperativ in veränderter Weise gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen. Hierzu wird die Zytokinsekretion isolierter APC und T-Zellen in Co-Kulturen mit dem jeweils anderen Zelltyp prä- und postoperativ gemessen.

Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll darauf geschlossen werden, welche Immunzellen primär für die Entwicklung und den Unterhalt der postoperativen Immunsuppression verantwortlich sind. Diese Ergebnisse können dazu beitragen den pathophysiologischen Mechanismus einer durch viszeralchirurgischen Operationen mit Trauma und Blutverlust ausgelösten Immunsuppression zu erklären.

Langfristig bestünde die Möglichkeit mittels pharmakologischer Therapien die postoperative Immunfunktion zu rekonstituieren und den durch diese zellulären Funktionsstörungen bedingten postoperativen Komplikationen im Vorfeld vorzubeugen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 STUDIENDESIGN

In dieser Studie kam ein prospektives klinisch-experimentelles Modell zur Anwendung, bei welchem konsekutive *in vitro* Messungen an isolierten T-Helferzellen und APC aus Patientenproben nach abdominal-chirurgischen Eingriffen erfolgte. Das zustimmende Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Durchführung dieser Studie lag vor (Projekt-Nr. 326-08).

3.2 PATIENTEN

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum von Mai 2009 bis Oktober 2009 einem großen abdominalchirurgischen Eingriff wie einer Leberteilresektion, Pankreasresektion oder Magenteilresektion unterziehen mussten. Es wurden 14 Patienten, davon 7 Frauen und 7 Männer eingeschlossen, die keines der Ausschlusskriterien erfüllten (Tabelle 3.1). Vor der ersten Blutabnahme wurden alle Teilnehmer über die Studie aufgeklärt und das Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie eingeholt.

Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren:

- Alter < 18 Jahre und > 70 Jahre
- BMI < 20
- Chronische oder akute Entzündungskrankheit (z.B. chronische/akute Pankreatitis oder Hepatitis)
- Einnahme von Immunsuppressiva < 8 Wochen vor Beginn der Studie
- Chemotherapie < 6 Monate vor Beginn der Studie
- Leberzirrhose
- Schwangerschaft
- Fehlende Einverständniserklärung

3.2.2 Patientenkollektiv und Interventionen

Tabelle 3.1

Studienteilnehmer:	14
Männer	7
Frauen	7
Durchschnittsalter:	54 Jahre
Operationen:	
Leberresektionen (ausgedehnt)	10
Gastrektomie	1
Pankreasresektionen	3

3.3 EXPERIMENTELLE METHODEN

3.3.1 Versuchsaufbau

Für die Bestimmung der Leukozytenfunktionen wurden aus den prä- und postoperativ gewonnenen Blutproben der Patienten zunächst mit Hilfe der Fluoreszenzzytodensitometrie (FACS) die Oberflächenmarkerexpression der einzelnen Zellen untersucht. Daraufhin wurden die, nach Zentrifugation gewonnenen, *peripheral blood mononuclear cells (PBMC)* mit Hilfe von magnetischen zellspezifischen Antikörpern in CD3+ T-Zellen wie auch CD14+ APC isoliert. Die 24 Stunden vor der Operation gewonnenen Zellproben wurden anschließend bei -80°C kryokonserviert. Nach Separation der unmittelbar vor-, bzw. nach der Operation gewonnenen und isolierten T-Zellen bzw. APCs wurden mit Hilfe der am Vortag konservierten Zellen Zell-Co-Kulturen gebildet. Diese wurden für 24 Stunden mit Lipopolysacchariden stimuliert, ehe die gewonnenen Kultur-Überstände mittels Enzym-Immuno-Assays auf verschiedene, ausgewählte Zytokinkonzentrationen analysiert wurden. (Abbildung 3.1).

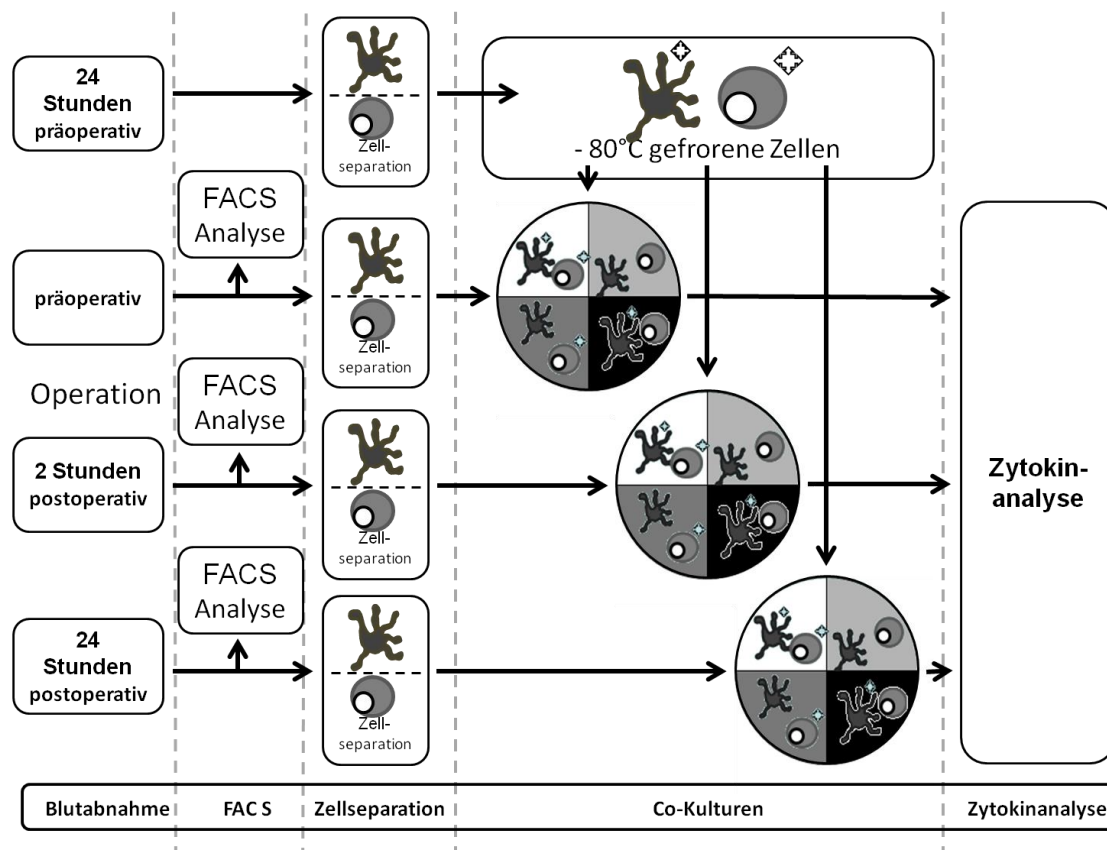


Abbildung 3.1 Versuchsaufbau

3.4 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Einzelne in dieser Arbeit verwendete Untersuchungsmethoden wurden auch in einer nachfolgenden, bereits publizierten Arbeit beschrieben und verwendet [54].

3.4.1 Gewinnung von Gewebe

Aus dem durch die Blutabnahme gewonnenen Vollblut sollen im Verlauf die für die Co-Kulturen benötigten T-Zellen bzw. Antigen-präsentierenden Zellen isoliert werden.

3.4.1.1 Blutabnahme

Die für die Versuche benötigten Blutproben wurden 24 Stunden präoperativ, durch Punktion der V. cubitalis und unmittelbar präoperativ über den im Rahmen der Narkoseeinleitung gelegten zentralvenösen oder arteriellen Katheter entnommen. Für die weiteren Blutabnahmen 2 Stunden und 24 Stunden postoperativ wurden dieselben zentralvenösen Zugänge verwendet. Das jeweils entnommene Blutvolumen von 36 ml (4 x 9 ml) wurde mittels in der klinischen Routine eingesetzten Blutentnahmeröhrchen gewonnen. Das hier gewonnene Vollblut wurde im Anschluss mittels Ficoll-Lösung in Erythrozyten, Granulozyten und PBMCs getrennt.

3.4.2 Zelltrennung mittels Ficoll® Lösung

3.4.2.1 Prinzip

Periphere mononukleare Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Ficoll-Hypaque ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte (1,07 g/L) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen aufgrund ihrer höheren Dichte die sog. Ficolltrennschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten (geringere Dichte) sich in der Interphase (schließt an die Ficolltrennschicht an) ansammeln (Abb.3.1).

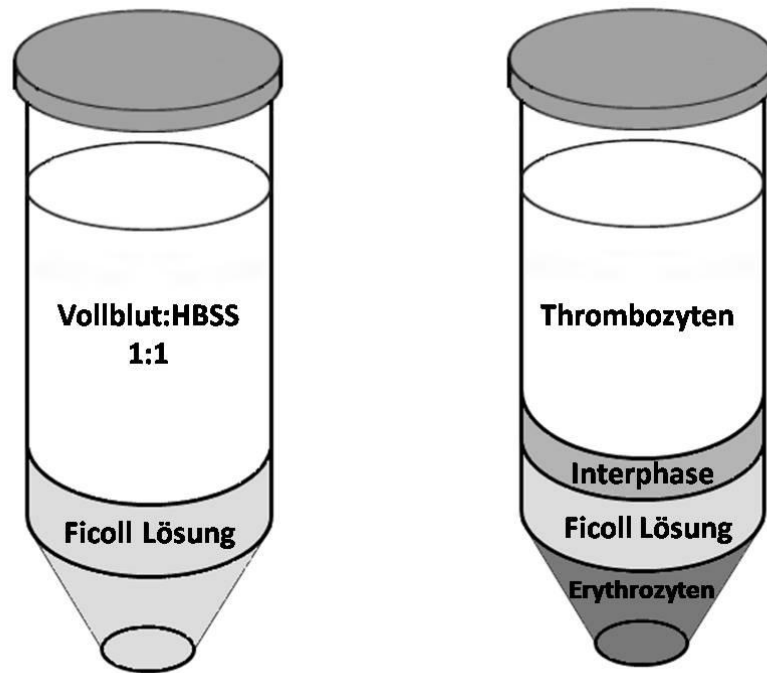


Abbildung 3.2 Isolierung von mononuklearen Zellen aus dem Vollblut, Phasentrennung vor und nach Zentrifugation.

3.4.2.2 Durchführung

Hierzu wurde das Patientenvollblut im Verhältnis 1:1 mit HBSS-Lösung verdünnt, das verdünnte Vollblut auf ein Kissen aus 20 ml Ficoll-Hypaque in ein 50 ml Falcon Tube geschichtet und 25 min bei 900 g ohne Bremse zentrifugiert.

Die durch die Zentrifugation entstandene Interphase (Buffy Coat: enthält die Leukozyten und antigenpräsentierenden Zellen) wurde mittels einer 10 ml Spritze und eines Venenkatheters, der als Aufsatz diente, abgenommen und in einem sterilen 50 ml Falcon Tube mit HBSS-Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt und erneut 5 min bei 400 g zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen wurden in HBSS-Lösung (10 ml, bzw. 20 ml je nach Abnahmezeitpunkt) resuspendiert, gezählt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C auf Eis gelagert.

Circa 2×10^6 PBMCs wurden für die später durchgeführte Durchflusszytometrie separat aliquotiert und bis zur Analyse auf Eis gekühlt gelagert.

3.4.3 Immunomagnetische Zellsortierung

Nachdem das Vollblut der Patienten durch die Ficolltrennung aufgetrennt wurde und die Erythrozyten wie auch die toten Zellen entfernt wurden, erfolgte die Isolierung der Antigen-präsentierenden Zellen (CD14+) wie auch der T-Zellen (CD3+). Diese Aufreinigung erfolgte durch ein Zellseparationssystem für magnetische Zellisolation (MACS®) (Abb. 3.2) der Firma Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Deutschland.

3.4.3.1 Prinzip

Diese MACS® Technik basiert auf der Verwendung von sog. Microbeads – supermagnetischen Kleinstpartikeln (ca. 50 nm), an die monoklonale Antikörper konjugiert wurden (Abb.3.2). Die Antikörper sind hochspezifisch für charakteristische Oberflächenantigene (CD, Cluster of Differentiation), die die verschiedenen Zellpopulationen durch deren Expression differenzierbar machen [55].

Die hier verwendeten monoklonalen Antikörper waren gegen CD14 für die Antigen-präsentierenden Zellen sowie CD3 für die Fraktion der T-Zellen gerichtet, welche in zwei voneinander getrennten Separationsvorgängen getrennt wurden.

Diese Art der Zellisolierung nennt man Positiv-Isolierung, da die für das Experiment benötigten Zellen von den nicht benötigten Zellen selektiv über ihre Oberflächenrezeptoren aus dem PBMC Zellpool herausgefiltert werden. Die mit den monoklonalen magnetischen Antikörpern bestückten Zellen durchlaufen eine spezielle Säule (MACS®-Column), die von einem starken äußeren Magnetfeld umgeben ist, welches so ausschließlich die mit Antikörpern markierten Zellen am Durchfließen hindert. Die nicht mit Antikörpern bestückten Zellen fließen ungehindert durch die Säule und werden in einem separaten Zellkulturröhrchen aufgefangen.

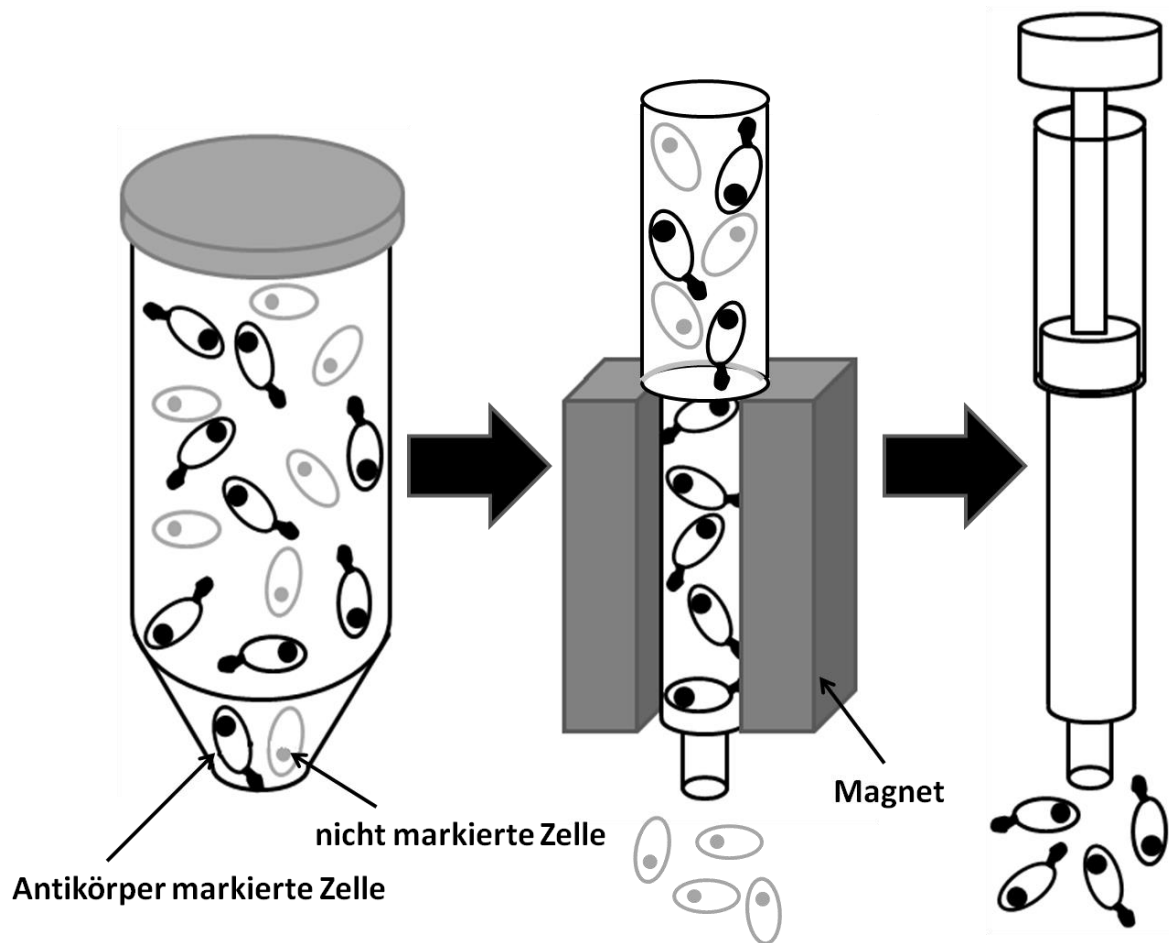


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der MACS® Zellseparation. Die mit Antikörper bestückten Zellen werden durch das Magnetfeld am Durchfließen zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen ungehindert durch die MACS® Säule in das Zellkultur Röhrchen gelangen.

3.4.3.2 Durchführung

Die im vorangegangenen Schritt gewonnenen PBMCs wurden nun abzentrifugiert (300 g, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen und das Zentrifugat im dafür vorgesehenen MACS-Puffer (80 µl Puffer / 10×10^6 Zellen) resuspendiert. Nach Zugabe des CD14-Antikörpers (20 µl Antikörper-Lösung / 10×10^6 Zellen) wurden die Zellen für 15 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension gewaschen, wobei 3-5 ml MACS®-Pufferlösung zugegeben und nochmals abzentrifugiert (300 g, 10 min, Raumtemperatur) wurde. Nun wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer abermals resuspendiert und in eine MACS Separations Column überführt.

Die Trennsäule war zuvor in einem magnetischen Feld (MACS Cell Separator) platziert und mit 500 µl MACS-Puffer vorgespült worden. Ein Zellkulturrohrchen wurde zum Auffangen der nicht markierten Zellen unter der Säule platziert. Nach vollständigem Durchlaufen der Zellsuspension durch die MACS Separations Column wurde die Säule weitere 3-mal mit je 500 µl MACS-Puffer gespült. Erst jetzt wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD14-positiven Zellen konnten mittels eines weiteren Spülvorgangs (1 ml MACS-Puffer) und der Verwendung eines passenden Spritzenstempels aus der Säule ausgewaschen und in einem separaten Röhrchen aufgefangen werden. Die so gewonnenen Monozyten wurden abzentrifugiert (300 g, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen sowie die Zellen in Zellmedium resuspendiert und gezählt. Die Zellzahl wurde auf 1×10^6 /ml eingestellt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Diese Arbeitsschritte wurden analog zur Gewinnung der CD3-positiven Zellpopulation verwendet. Dabei wurde die zuvor negativ-selektierte Zellpopulation mit dem entsprechenden Antikörper gegen CD3 inkubiert und das Separationsverfahren wie beschrieben durchgeführt. Die gewonnenen PBMCs wurden nach einer Zentrifugation (5 min bei 400 g) je nach Anzahl in 80 µl MACS® Puffer und 20 µl CD3 Microbeads® pro 10^7 Zellen (Angaben des Herstellers) resuspendiert und bei 4-8°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 3-5 ml MACS®-Pufferlösung verdünnt um die überflüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen und bei 300 g 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl MACS®-Puffer resuspendiert und auf die mit ebenfalls 500 µl vorgespülte MACS® MS-Column gegeben. Die Säule wurde zur Zellisolation in der magnetischen Vorrichtung (MACS Cell Separator) platziert. Alle durch Antikörper magnetisch markierten Zellen wurden aufgrund des starken Magnetfeldes, welches auf die Säule wirkte, am Durchlaufen gehindert. Alle nichtmarkierten Zellen passierten die Säule ungehindert und wurden in einem 15 ml Zentrifugiergefäß aufgefangen und gesammelt. Nach dreimaligem Durchspülen mit 500 µl MACS® Puffer konnte die MACS®-Column aus der Vorrichtung genommen werden und die durch das Magnetfeld festgehaltenen Zellen konnten durch Auspressen der Säule mit 1 ml Puffer-Lösung und des mitgelieferten Stempels in einem weiteren 15 ml Zentrifugiergefäß gesammelt werden.

Für die Qualitätssicherung dieser Isolation wurden sowohl aus der Zellfraktion in der Säule, wie auch aus der Zellfraktion, die durchgeflossen war, 2×10^5 Zellen für die FACS®-Analyse (siehe unten) aliquotiert.

Die gewonnenen Zellen wurden 5 min bei 400 g zentrifugiert und anschließend in 1 ml Zellmedium (RPMI1640 – GlutaMAX-1 und 10% FCS) resuspendiert und ausgezählt und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gestellt.

Mit Hilfe dieser Methode konnte ein Reinheitsgrad der gewonnenen markierten Zellen von über 95% erzielt werden, welcher in den anschließend überprüfenden Durchflusszytometriemessungen belegt wurde (Abb. 3.3).

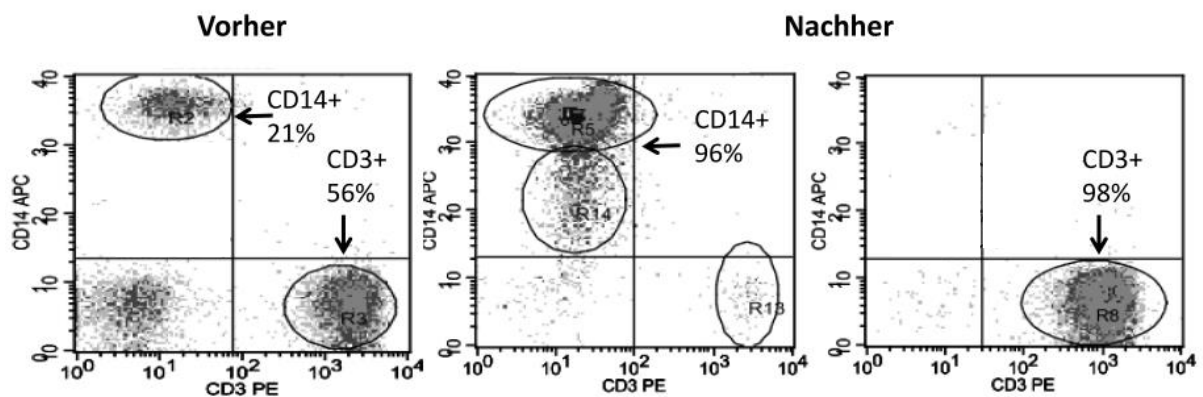


Abbildung 3.4 X-Achse CD3 Marker für T-Zellen, Y-Achse CD14 Marker für Antigenpräsentierende Zellen vor (a) und (b) nach der MACS®-Zellseparation mit CD3 Beads.

3.4.4 Einfrieren der 24 Stunden präoperativ gewonnenen Zellen

Die für den Folgetag benötigten Zelltypen wurden vorübergehend, bis zu deren Gebrauch, bei -80°C im Gefrierschrank kryokonserviert.

3.4.4.1 Prinzip

Mit Hilfe der Kryokonservierung werden einzelne Zellen in einem speziellen Medium in einen festen Aggregatzustand versetzt, um sie unbegrenzt in flüssigem Stickstoff bei -196°C zu lagern oder wie in diesem Fall für 24 Stunden bei -80°C aufzubewahren. Bei diesem Verfahren werden die Zellen durch Zugabe einer Einfrierlösung sehr schnell gefroren, so dass intrazellulär lediglich kleine Eiskristalle entstehen, welche die Zellmembranen nicht zerstören und die vitalen Zellen letztendlich in einen Festkörper überführen. Dabei werden zusätzlich alle intrazellulären Stoffwechselfvorgänge vorübergehend gestoppt.

3.4.4.2 Durchführung

Die T-Zellen wie auch die dendritischen Zellen wurden separat, nachdem ihre Zellzahl bestimmt wurde, in einem Gefriermedium (70% RPMI 1640 GlutaMAX-1, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und sofort in einer dafür vorgesehenen Gefrierbox bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.4.5 Auftauen der 24 Stunden präoperativ gewonnenen Zellen

3.4.5.1 Prinzip

Werden eingefrorene Zellen für weitere Experimente benötigt, werden diese beim Auftauen wieder aus ihrem festen in den flüssigen Aggregatzustand versetzt, wobei sie ihre Zellvitalität zurückerlangen und die physiologischen Stoffwechselprozesse wieder aktiviert werden.

3.4.5.2 Durchführung

Die gefrorenen Zellen wurden in einem 20°C warmen Wasserbad langsam aufgetaut und unmittelbar danach in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, bei 400 U/min für 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der toxische Mediumüberstand wurde anschließend verworfen. Dieser Waschvorgang erfolgte 2-mal, bevor der jeweilige Zelltyp gezählt und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert wurde und bis zur Entstehung der Zellkulturen auf Eis gelagert wurde.

3.4.6 Herstellung der Zellkulturen und Stimulation

Die Co-Kulturen aus CD3 positiven T-Zellen und CD14 positiven dendritischen Zellen wurden zu den Blutabnahmen 2 Stunden präoperativ, 2 Stunden postoperativ und 24 Stunden postoperativ, nach Isolierung der Zellfraktionen erstellt. Dies erfolgte immer im Verhältnis 1:1 (T-Zellen : APC).

3.4.6.1 Prinzip

Die durch Isolation gewonnenen Zellreihen wurden in eine Konzentration von $1,04 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht. 500.000 Zellen jeder Zellreihe wurden im Anschluss in ein mit anti-CD3 vorpräparierten Napf einer 48 Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Die vollständige Stimulation erfolgte durch weiteres Hinzufügen von anti-CD28 und Lipopolysacchariden (LPS) in einer Konzentration von 20 $\mu\text{l/ml}$. Die so entstandenen Co-Kulturen wurden jetzt für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 co-inkubiert, bevor der Zellüberstand gewonnen wurde und bei -80°C für die weitere Zytokinbestimmung mittels BioPlex-Messung aufbewahrt wurde.

3.4.6.2 Durchführung

In eine 48 Loch Mikrotiterplatte wurde mindestens 4 Stunden vor Zusammensetzung der Co-Kulturen 250 μl Anti-CD3-Antikörper (10 $\mu\text{l/g}$) vorgelegt, damit die Anti-CD3-Antikörper am Boden der Platte adhären konnten. Unmittelbar vor dem Zusammenbringen der isolierten Zelltypen in die Co-Kultur wurden die überständigen, nicht adhären Anti-CD3 Antikörper 3-mal mit 300 μl HBSS ausgewaschen und es wurden 20 μl LPS und 20 μl anti-CD28-Antikörper dazu pipettiert. Die isolierten Zellfraktionen wurden mit Medium in eine Konzentration von $1,04 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und in den folgenden Kombinationen in jeweils 500 μl Volumen zusammen gegeben (Abb.3.4). Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und zur weiteren Verwendung zu je 300 μl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

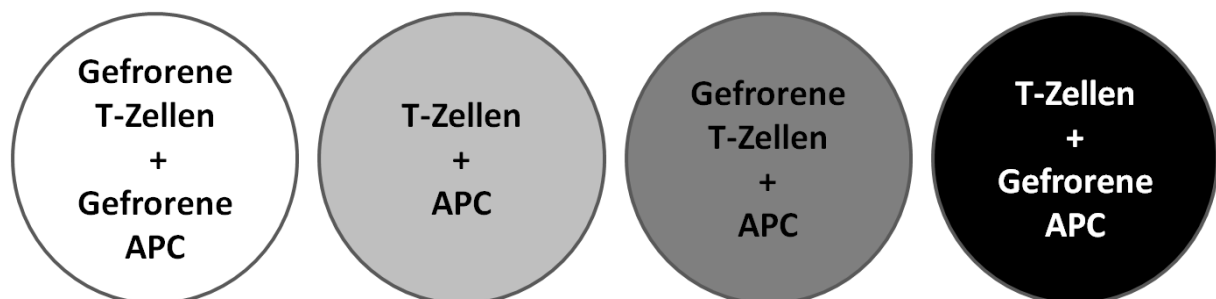


Abbildung 3.5 Kombinationen der Zellkulturen: Gruppe 1: gefrorene T-Zelle + gefrorene APC; Gruppe 2: ungefrorene T-Zelle + ungefrorene APC; Gruppe 3: gefrorene T-Zelle + ungefrorene APC und Gruppe 4: ungefrorene T-Zelle + gefrorene APC.

3.4.7 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der spezifischen Oberflächenantigenexpression erfolgte für die Zellen der einzelnen Patienten mittels Durchflusszytometrie (im Folgenden FACS-Analyse genannt).

3.4.7.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein lasergestütztes Messverfahren zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Zellmorphologie sowie, nach spezifischer Färbung, der Bestimmung intra- und extrazellulärer Proteinexpression. Dabei wird die Fluoreszenzemission der einzelnen Zellen und der mittels Antikörpern kovalent gebundener Farbstoffe nach der Bestrahlung mit einem Laser gemessen und ausgewertet. Die in Suspension befindlichen Zellen werden mittels einer Kapillare in den Messbereich angesaugt. Durch die hohe Beschleunigung werden Zellagglutinationen aufgelöst. Dies gewährleistet, dass die Zellen einzeln und nacheinander im Messbereich ankommen und ausgewertet werden können. Im Messbereich werden die Zellen mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Die Lichtemission der Zelle erfolgt dabei zum größten Teil nach vorne und wird als Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) bezeichnet. Diese Streuung dient der Beurteilung der Größe der Zelle. Ein anderer Anteil wird als Seitstrahllicht (SSC = Side Scatter) bezeichnet und wird im rechten Winkel zum eintreffenden Laserstrahl aufgefangen. Da diese Streuung insbesondere durch die Membranstruktur und die Granulation der Zelle beeinflusst wird, lässt sich hieraus die morphologische Struktur der Zelle bestimmen. Da es nur wenige Zellen gibt, die natürlicherweise imstande sind farbiges Licht zu emittieren, wird sich die Fluoreszenzaktivität verschiedener Farbstoffe zu Nutze gemacht. Diese Farbstoffe werden, konjugiert an monoklonale Antikörper, vor der Analyse auf die Zelloberfläche aufgebracht. Über ein System aus Spiegeln und Filtern werden die Emissionen zu Detektoren geleitet, die die Signale aufnehmen und zur weiteren Analyse an einen Computer weiterleiten (Abb.3.6).

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die monoklonalen Antikörper und die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, die bei der FACS-Analyse verwendet wurden (Tabelle 3.2 und 3.3).

Tabelle 3.2

Fluoreszenzfarbstoff	Synonym	Emissionsmaximum(Farbe)
Fluorescein Isothiocyanat	FITC	520 nm (grün)
Phycoerythrin	PE	575 nm (gelb-grün)
Peridinin Chlolophyll Protein	PerCP Cy 5.5	695 nm (orange-rot)
Allophycocyanin	APC	660 nm (orange)

Tabelle 3.3

Antikörper	Klon	Farbstoff	Hersteller	Isotyp
FcR Block human			Miltenyi Biotec	
IgG1	IS5-21F5	FITC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
IgG1	IS5-21F5	PE	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
IgG2a	S43.10	PE	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2a
IgG1	X40	PerCp Cy 5.5	BD Bioscience	Mouse IgG1
IgG1	IS5-21F5	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
IgG2a	S43.10	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2a
CD3	BW264/56	PE	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2a
CD4	M-T466	FITC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
CD8	RPA-T8	PerCP Cy 5.5	eBioscience	Mouse IgG1 κ
CD14	TüK4	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2a
CD16	VEP13	FITC	Miltenyi Biotec	Mouse IgM
CD25	4E3	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2b
CD28	15E8	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
CD40	5C3	FITC	BD Pharmingen	Mouse IgG1 κ
CD69	FN50	APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1
CD80	L307.4	PE	BD Pharmingen	Mouse IgG1 κ
CD86	2331(FUN-1)	FITC	BD Pharmingen	Mouse IgG1
CD127	eBioRDR5	PerCP Cy 5.5	eBioscience	Mouse IgG1
CD154	TRAP1	FITC	BD Pharmingen	Mouse IgG1 κ
HLA-DR	G46-6	PE	BD Pharmingen	Mouse IgG2a κ

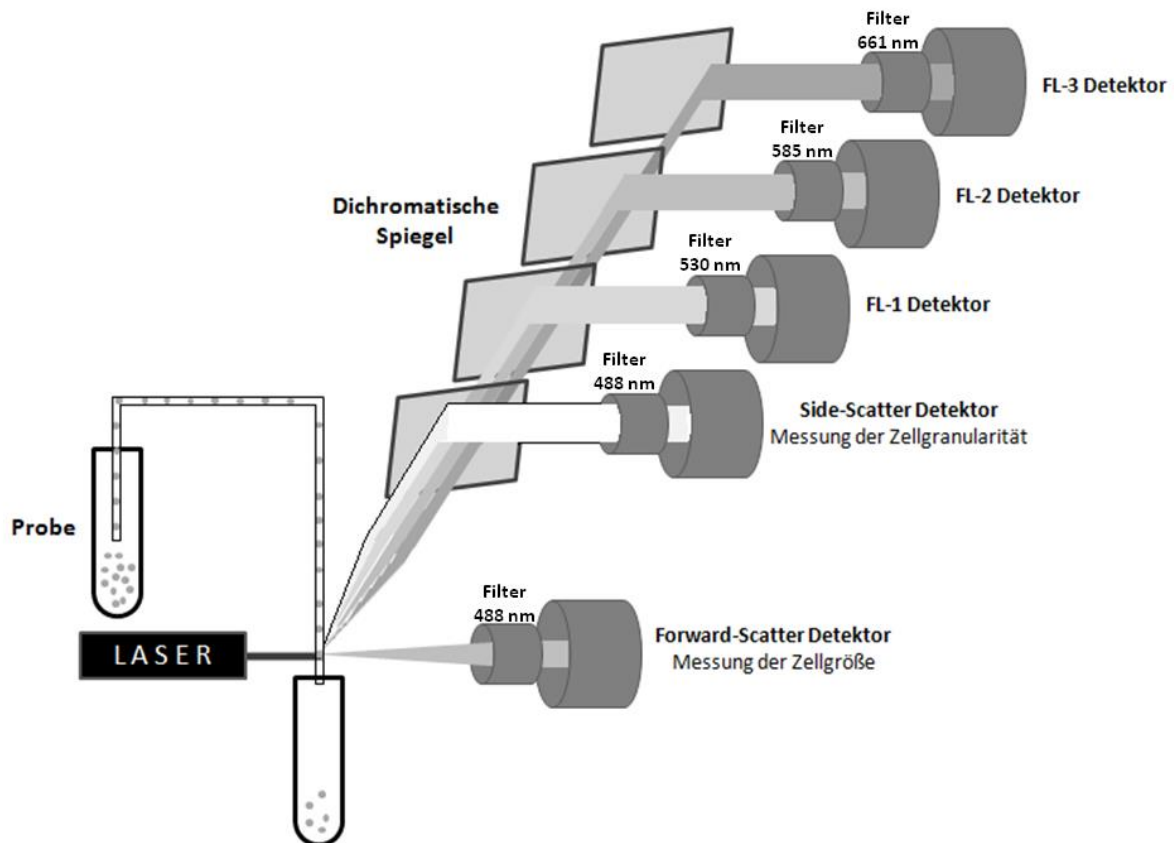


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung.

3.4.7.2 Durchführung

Die isolierten PBMCs wurden nun für die flowzytometrische Bestimmung ihrer Antigen-Expression vorbereitet. Zunächst wurde die Zellpopulation mit einem humanen Fc-Rezeptor-Blocker behandelt. Dazu wurden 10 μl Antikörperlösung (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) in 90 μl FACS-Puffer gelöst und der Zellsuspension zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 10 Minuten inkubiert. Der Block dieses Rezeptors sollte eine unspezifische Bindung später zugegebener Antikörper auf der Zelloberfläche von Monozyten verhindern. Die Zellsuspension wurde dann durch Zugabe von Hank's buffered salt solution (HBSS) auf 250.000 Zellen/ml eingestellt.

Je 1 ml der Zellsuspension wurde auf entsprechende Polystyrolreagenzgefäße verteilt, mit je 3 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 700 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch ein weiteres Mal unter Verwendung von 4 ml FACS-Puffer wiederholt, um HBSS vor dem Messvorgang vollständig zu entfernen.

Durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern, konjugiert mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen, erfolgte die für die Flowzytometrie zentrale Färbung der Zellen (Übersicht siehe Tab. 3.2). Dazu wurden die Zellen mit je 3 μl der Farbstofflösung versetzt und für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch einen weiteren Waschvorgang entfernt. Nach einer weiteren Zugabe von 300 μl FACS-Puffer waren die Zellen bereit zur Messung.

Die Messung wurde unmittelbar im Anschluss an die Färbung mit Hilfe des FACS Calibur (Beckton and Dickinson, Bedford, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über Coulter EPICS XL (Beckman Coulter Inc., CA, USA).

3.4.8 Bio Plex Assay

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der durch die Zellkulturen gewonnenen Mediumüberstände und eines Multi Plex Assays (Bio Plex Assay) der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., München, Deutschland) im Anschluss an die 24-stündige Zellkultur.

3.4.8.1 Prinzip

Der hier verwendete Bio Plex Assay ist in der Lage aus nur einer Probe bis zu 100 verschiedene vorher festgelegte Zytokine zu bestimmen. Die hierbei verwendeten mikroskopisch kleinen Beads (Polystyrolsphären) werden durch die "Sandwich Methode" analog dem ELISA-Assay an die jeweiligen Zytokine gebunden. Der Bio Plex Assay ermöglicht die Bestimmung von mehreren verschiedenen Stoffen in einem Arbeitsschritt aus einer einzelnen Probe. Dabei werden mikroskopisch kleine Polystyrolsphären (Beads) mit einem Durchmesser von 5,6 µm verwendet, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefüllt sind. Die Klassifikation des Analyten erfolgt dann aus der kombinierten Fluoreszenz beider Farbstoffe im roten bzw. infraroten Lichtspektrum. Die Farbstoffe werden in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationen in die Partikel eingebracht woraus eine Gesamtzahl von 100 verschiedenen Analyten folgt. Die daraus resultierenden spektral unterscheidbaren Schattierungen werden als „Beadregionen“ bezeichnet. Jede Beadregion ist spezifisch für einen vorher definierten Analyten. Auf der Oberfläche der Beads dienen monoklonale Antikörper mittels ihrer hochspezifischen Affinität zur kovalenten Bindung des Analyten. In einem weiteren Schritt werden durch die Zugabe eines Detektionsmoleküls (Konjugat) gebundene Stoffe quantifiziert. Es handelt sich bei dem verwendeten Konjugat um spezifisch bindende Antikörper, an die ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff (Streptavidin-Phycoerythrin) gekoppelt ist. Dieser Farbstoff emittiert im Wellenlängenbereich grünes Licht um eine Überschneidung der gemessenen Fluoreszenzen von Beads und Konjugat zu vermeiden.

Die Messung der Lichtemission erfolgt nach der Methode der Durchflusszytometrie. Dabei werden die Proben einzeln durch den Fokus des laser-basierten Messapparats geführt. Die Probe wird von zwei Festkörperlasern erfasst und die Fluoreszenzemission der Farbstoffe auf entsprechende Detektoren geleitet. Dort erfolgt die computergestützte Klassifikation (rote/infrarote Lichtemission der Beads) und Quantifizierung (grüne Lichtemission des Konjugats) des Analyten.

3.4.8.2 Durchführung

Zu Beginn des Assays wurden die aliquotierten Proben aufgetaut und mit Zellkulturmedium zu einer Konzentration von 1:10 verdünnt. Diese Arbeitsschritte und die anschließende Lagerung bis zu Weiterverarbeitung wurden stets auf Eis durchgeführt. In einem weiteren Schritt wurde der für die Messung verwendete Standard nach Angaben des Herstellers in einer Verdünnungsreihe vorbereitet. Dazu wurden 128 µl des gelieferten Stocks mit 72 µl Zellkulturmedium in einem Reagenzgefäß vermischt. Es folgte eine Verdünnungsreihe mit acht absteigenden Verdünnungen, bei der jeweils 50 µl des verdünnten Standards in 150 µl Zellkulturmedium überführt wurden.

Im Anschluss wurde die für die Messung verwendete 96 Loch Mikrotiterplatte für Kontrollen und Proben beschriftet. Nach den Angaben des Herstellers wurden daraufhin die ausreichende Menge an Beads, Antikörpern wie auch Streptavidin-PE vorbereitet. Die Beads wurden bis zur Verwendung abgedeckt mit Alufolie auf Eis gelagert. Für die Messung wurden für die gesamte 96 Loch-Mikrotiterplatte 240 µl Beads in 5,76 ml Pufferlösung verwendet. Außerdem wurden sowohl die Proben, die Kontrollen wie auch die vorbereiteten verdünnten Standardlösungen mindestens 20 min vor der Messung auf Raumtemperatur erwärmt. Die Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Pufferlösung befüllt und mit Hilfe des Vakuumfilters abgezogen. Jeder Napf der Platte wurde daraufhin mit 50 µl der magnetischen Beads bestückt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde erneut durch Applikation des Vakuumfilters entfernt. Es folgte ein 2 maliger Waschvorgang mit 100 µl Pufferlösung pro Napf mit sofortigem Abziehen durch den Vakuumfilter. 50 µl wurden jeweils von den vorbereiteten Standardlösungen, Kontrollen bzw. Proben in die beschrifteten Plattenlöcher pipettiert. Die Platte wurde mit einer mitgelieferten Verschlussfolie versiegelt und auf einem Mikroplattenrüttler unter einer Aluminiumschutzhülle mit einer Geschwindigkeit von 1100 U/min für 30 Sekunden bewegt. Für die anschließende Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Geschwindigkeit auf 300 U/min reduziert.

Während der Inkubationszeit wurden die Antikörper in Suspension genommen und in der richtigen Konzentration vorbereitet. Jeder Napf wurde nach Abzug des Flüssigkeitsüberstandes durch den Vakuumfilter und 3 maligem Waschvorgang mit 2,5 µl Detektionsantikörpern befüllt. Diese wurden mit Hilfe der Antikörperlösung auf ein Volumen von 25 µl angeglichen. Es folgte eine erneute Inkubationszeit unter stetigem rütteln bzw. Lichtschutz auf dem Mikroplattenrüttler bei 300 U/min für 30 min. Die Inkubationszeit wurde wiederum genutzt um die Streptavidin-Phycoerythrin-Puffer Lösung vorzubereiten. Hierzu wurden 60 µl Streptavidin-PE in 5,94 ml Pufferlösung verdünnt. Nach erneuter Applikation des Vakuumfilters sowie eines 3 maligen Waschvorganges wurden in jeden Napf 50 µl der Streptavidin-PE Lösung (0,5 µl Streptavidin-PE, 49,5 µl Puffer Lösung) pipettiert. Der Überstand wurde erneut nach 10 minütiger Inkubation auf dem Mikroplattenrüttler bei 300 U/min durch den Vakuumfilter entfernt und die Lochplatte einem 3 maligen Waschvorgang unterzogen. Jeder Napf der Mikrotiterplatte wurde vor dem finalen Messvorgang zum Resuspendieren der Beads mit 125 µl

Pufferlösung gefüllt. Die Daten wurden anschließend unter Verwendung des Bio-Plex Suspensions Array Systems (Luminex System) (Bio-Rad, München, Deutschland) und der Bio-Plex Manager™ Software akquiriert.

3.5 STATISTIK

Messwerte, welche an den gleichen Probanden zu mehreren Zeitpunkten (präoperativ, 2 Stunden und 24 Stunden postoperativ) erhoben wurden, wurden mittels einfacher Varianzanalyse (one way ANOVA) auf signifikante Veränderungen im Verlauf untersucht. Bei signifikanten Ergebnissen der ANOVA wurde der Holm-Sidak Test für entsprechende *post hoc* Testung eingesetzt (SigmaStat 3.5, Systat Software GmbH). Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde für alle statistischen Untersuchungen als signifikant angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 ZELLOBERFLÄCHENMARKER

4.1.1 Oberflächenmarkerexpression der T-Zellen

Bei der Analyse verschiedener CD3 positiver T-Zellsubtypen konnte postoperativ eine Reduktion der Fraktion der CD3+CD28+ Zellen sowohl 2 Stunden als auch 24 Stunden zu den im Vergleich präoperativ gemessenen Werten festgestellt werden. Auch zeigte sich das Verhältnis von CD3+CD28+ zu CD3+ Zellen ($CD3+CD28+/CD3+$) signifikant reduziert im Vergleich zu präoperativen Werten. Dies bedeutet, dass die CD3+CD28+ Zellen im Vergleich stärker unterdrückt waren, als es die CD3+ T-Zellen waren.

In gleicher Weise zeigte sich auch bei der Subpopulation von CD3+CD25+ Zellen postoperativ eine verminderte Anzahl, sowohl 2, als auch 24 Stunden postoperativ. Auch das Verhältnis CD3+CD25+ T-Zellen zu CD3+ Zellen zeigte zum Messzeitpunkt 2 Stunden nach OP eine signifikante Reduzierung. Dies konnte auch für die CD3+CD69+ Zellen nachgewiesen werden, jedoch war der Unterschied hier nicht signifikant.

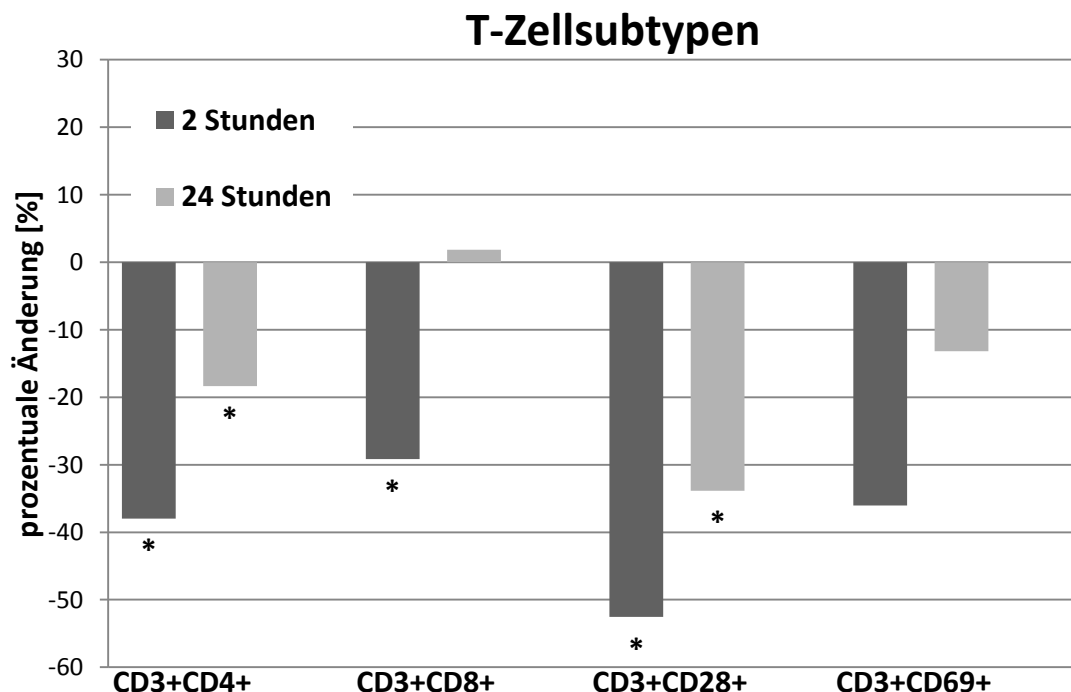


Abbildung 4.1: Zellzahlen der CD3+ Subpopulationen: Diese Abbildung zeigt die relative Veränderung der Subpopulationen verglichen mit den präoperativen Ausgangswerten. Die Subpopulationen waren sowohl 2 Stunden, als auch 24 Stunden postoperativ unterdrückt. Die signifikanteste Unterdrückung zeigte sich für die Subpopulationen von CD3+CD28+ und CD3+CD25+ Zellen. * $p < 0.05$ verglichen mit den präoperativen Werten.

Bei der Analyse CD3+CD4+ Helferzellen zeigte sich eine signifikante postoperative Zellzahlunterdrückung sowohl 2 und 24 Stunden bei jedoch gleichbleibendem Verhältnis von CD3+CD4+/CD3+ Zellen. In der Untergruppe der T-Helferzellen war die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}, CD4+CD25+CD127-) im Vergleich zu den präoperativ gewonnenen Werten unverändert, wobei das Verhältnis von CD4+CD25+CD127-/CD3+ Zellen leicht, aber signifikant, nach 2 Stunden erhöht war.

CD3+CD8+ Zellen waren nach 2 Stunden signifikant unterdrückt nicht aber nach 24 Stunden, dabei zeigte aber das Verhältnis CD3+CD8+/CD3+ keinen messbaren Unterschied. Das Verhältnis von CD3+CD4+/CD3+CD8+ war postoperativ nur leicht reduziert.

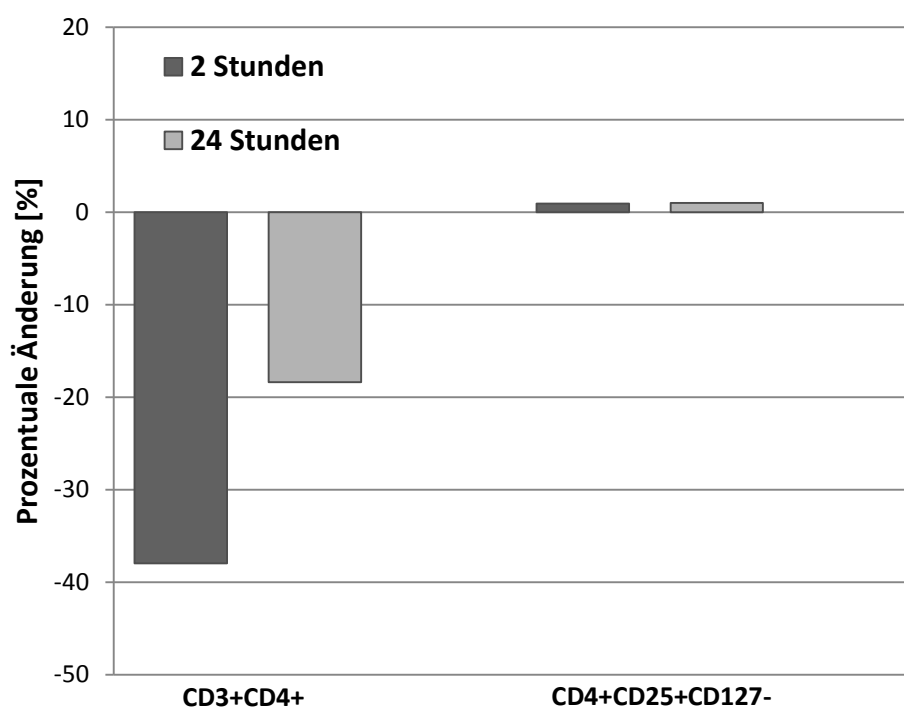


Abbildung 4.2: Analyse der CD4+ Subpopulationen: Im Falle der CD3+CD4+ Zellen zeigte sich eine Reduktion nach erfolgter Operation, ähnlich der anderen CD3+ Zellpopulationen. Die Untergruppe der regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+CD127-) war hingegen nicht unterdrückt. * p < 0.05 verglichen mit präoperativen Werten.

4.1.2 Oberflächenmarkerexpression der Antigen-präsentierenden Zellen

Die Untergruppe der CD14+CD80+ Zellen zeigte sich 2 wie auch 24 Stunden postoperativ signifikant erhöht, jedoch ohne signifikanten Unterschied im Verhältnis von CD14+CD80+/CD14+. In gleicher Weise waren auch die CD14+CD86+ Zellen sowohl 2 Stunden als auch 24 Stunden nach der Operation erhöht. Hier konnte ein geringer Anstieg im Verhältnis von CD14+CD86+/CD14+ nachgewiesen werden. Des Weiteren waren auch die Oberflächenmarker der HLA-DR+ Zellen im Vergleich zu den präoperativen Werten signifikant angestiegen, jedoch zeigte sich keine Änderung im Verhältnis von CD14+HLA-DR+ /CD14+.

CD14+CD16+ Zellen waren nach 24 Stunden induziert, nicht jedoch nach 2 Stunden, wohingegen das Verhältnis von CD14+CD16+/CD14+ eine leichte, jedoch signifikante Reduktion 2 Stunden postoperativ zeigte. Die CD14+CD40+ Zellen waren sowohl 2 als auch 24 Stunden nach der Operation erhöht, ohne Veränderung im Verhältnis von CD14+CD40+/CD14+.

Die stärkste Zellzahlzunahme aller CD14+ Zelluntergruppen konnte jedoch bei den CD14+HLA-DR-myeloiden Suppressorzellen nachgewiesen werden.

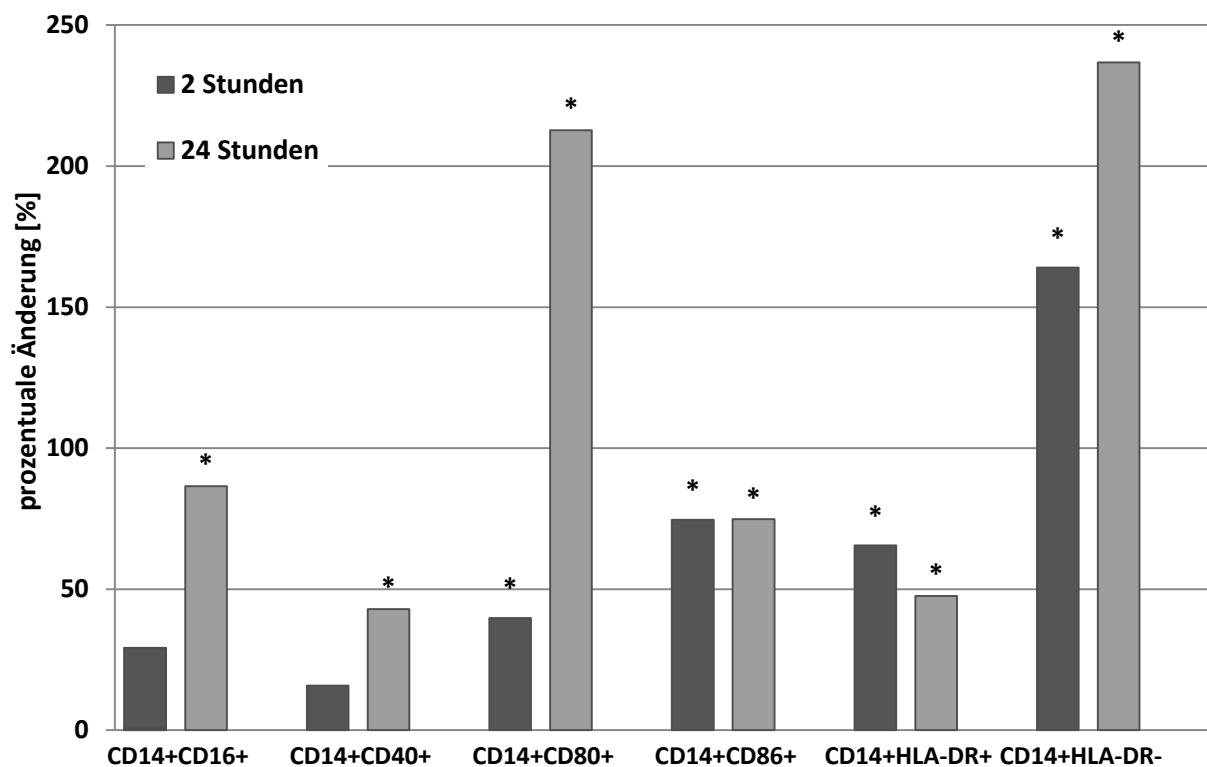


Abbildung 4.3: Zellzahlen der CD14+ Zellen: Die CD14+ Zellen zeigten sich postoperativ induziert.

* $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

4.2 ZYTOKINSEKRETION AUS DEN CO-KULTUREN DER T-ZELLEN UND APC

4.2.1 T-Zell spezifische Zytokine

4.2.1.1 Interferon- γ

Das aus der Gruppe 2 (postoperative T-Zelle mit postoperativer APC) gewonnene IFN- γ zeigte am 2 Stunden Messzeitpunkt einen signifikanten Rückgang. Auch 24 Stunden postoperativ zeigte sich die Sekretion vermindert. Dieser Rückgang war jedoch nicht signifikant. Die verbliebenen Co-Kulturgruppen (Gruppe 3+4) zeigten für IFN- γ auch Sekretionsrückgänge. Diese stellten sich aber als nicht signifikant dar. Es kam hier lediglich zu einer vorübergehenden Reduktion 2 Stunden nach erfolgter Operation.

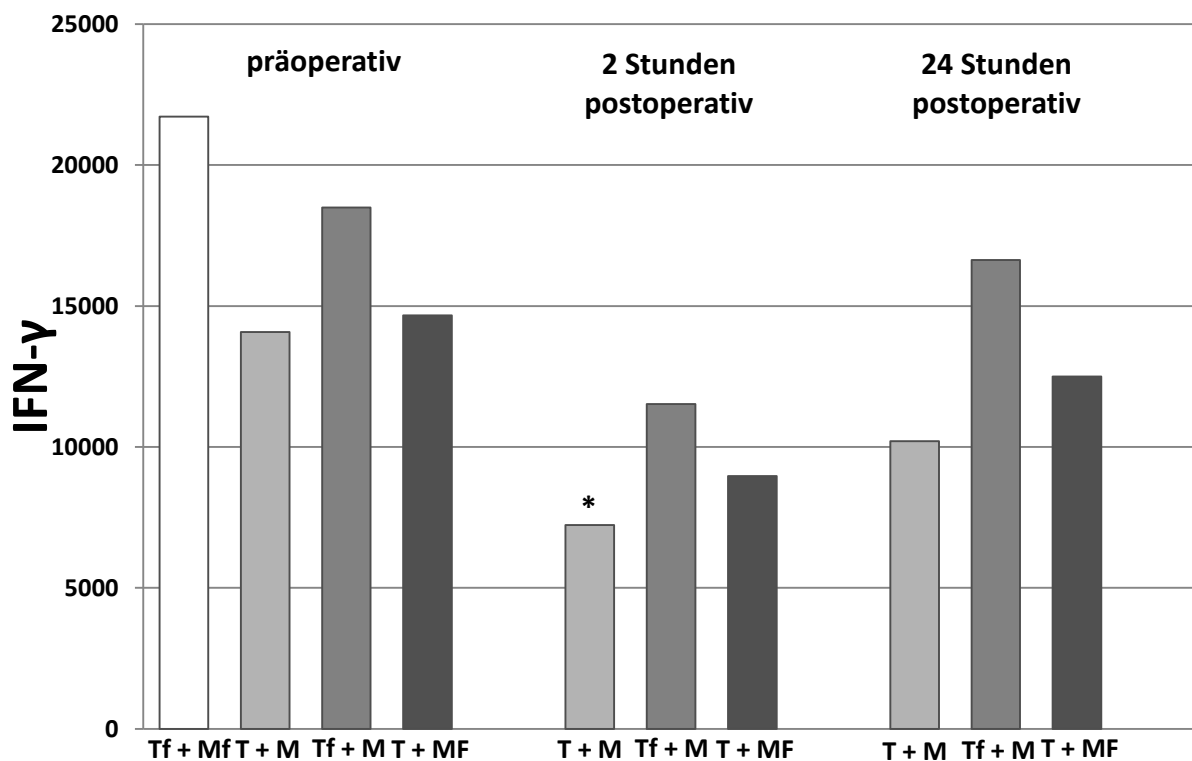


Abbildung 4.4: IFN- γ : Die Produktion von IFN- γ zeigte sich 2 Stunden postoperativ in den Co-Kulturen unterdrückt. Die Unterdrückung war signifikant in den Co-Kulturen welche naive Zellen, nicht jedoch gefrorene Zellen enthielten. T: T-Zellen; M: Antigen-präsentierende Zellen; f: gefroren. * $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

4.2.1.2 GM-CSF

In gleicher Weise wie im Falle von IFN- γ offenbarte auch GM-CSF 2 Stunden postoperativ in Gruppe 2 eine erhöhte Sekretion. Im Gegensatz zu IFN- γ konnte jedoch eine erhöhte Sekretion auch 24 Stunden postoperativ in Gruppe 2 wie auch in Gruppe 3 nachgewiesen werden. Auch am 2 Stunden Messzeitpunkt war die Sekretion in Gruppe 3 erhöht. Lediglich in den Co-Kulturen, in denen gefrorene Makrophagen enthalten waren (Gruppe 1+4), konnte keine Sekretionsänderung nachgewiesen werden.

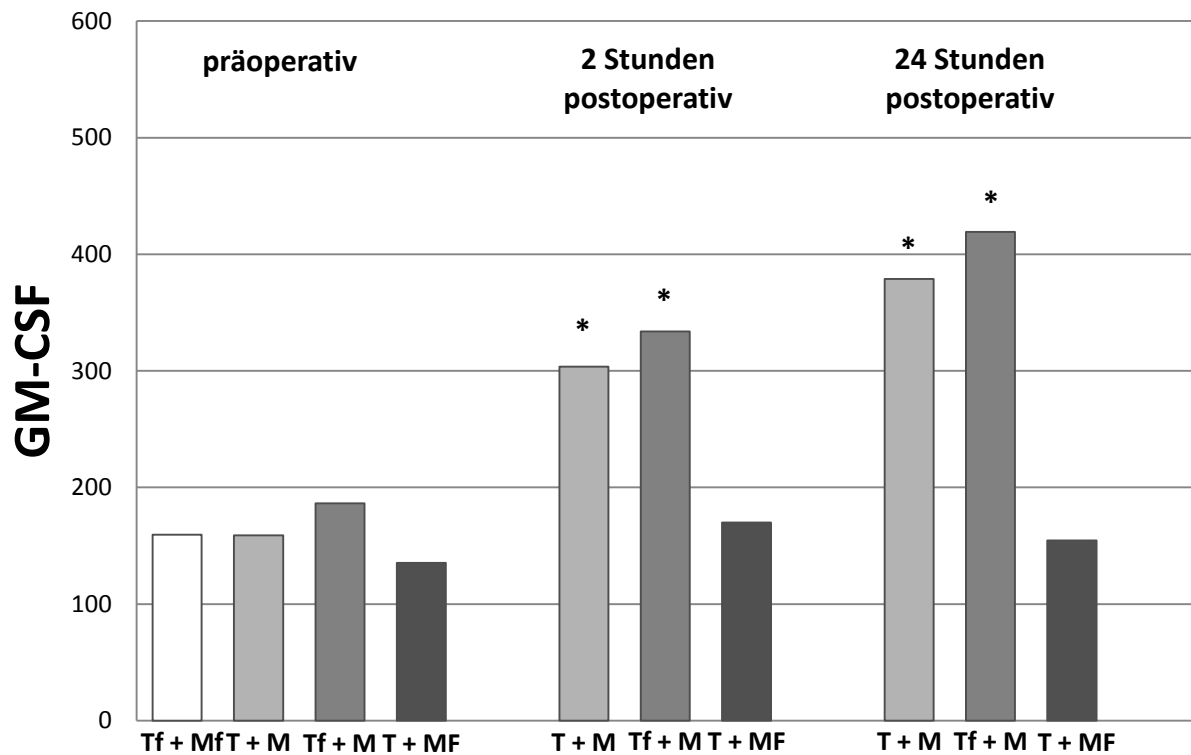


Abbildung 4.5: GM-CSF: Die Produktion von GM-CSF war in den Co-Kulturen von gefrorenen oder naiven T-Zellen kultiviert mit naiven APCs, nicht jedoch mit gefrorenen APCs, erhöht. T: T-Zellen; M: Antigen-präsentierende Zellen; f: gefroren. * $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

4.2.2 APC spezifische Zytokine

4.2.2.1 Interleukin 6

Nach Stimulation der Co-Kulturen durch Lipopolysaccharide zeigte sich die Sekretion von IL-6 aus postoperativ gewonnenen Makrophagen in Co-Kultur mit postoperativ gewonnenen T-Zellen (Gruppe 2) sowohl 2 Stunden wie auch 24 Stunden nach der Operation signifikant erhöht verglichen mit präoperativen Werten. In Co-Kulturen der Gruppe 3 mit postoperativ gewonnenen Makrophagen und gefrorenen T-Zellen zeigte sich die Sekretionsrate gleichermaßen induziert wie in den Co-Kulturen mit rein postoperativ gewonnenen Zellen (Gruppe 2). Gefrorene Makrophagen hingegen zeigten keine erhöhte Interleukinsekretion in Co-Kultur mit naiven T-Zellen (Gruppe 4). In diesem Fall glich die Sekretionsrate derer aus den Kontroll-Co-Kulturen mit ausschließlich gefrorenen Zellen (Gruppe 1).

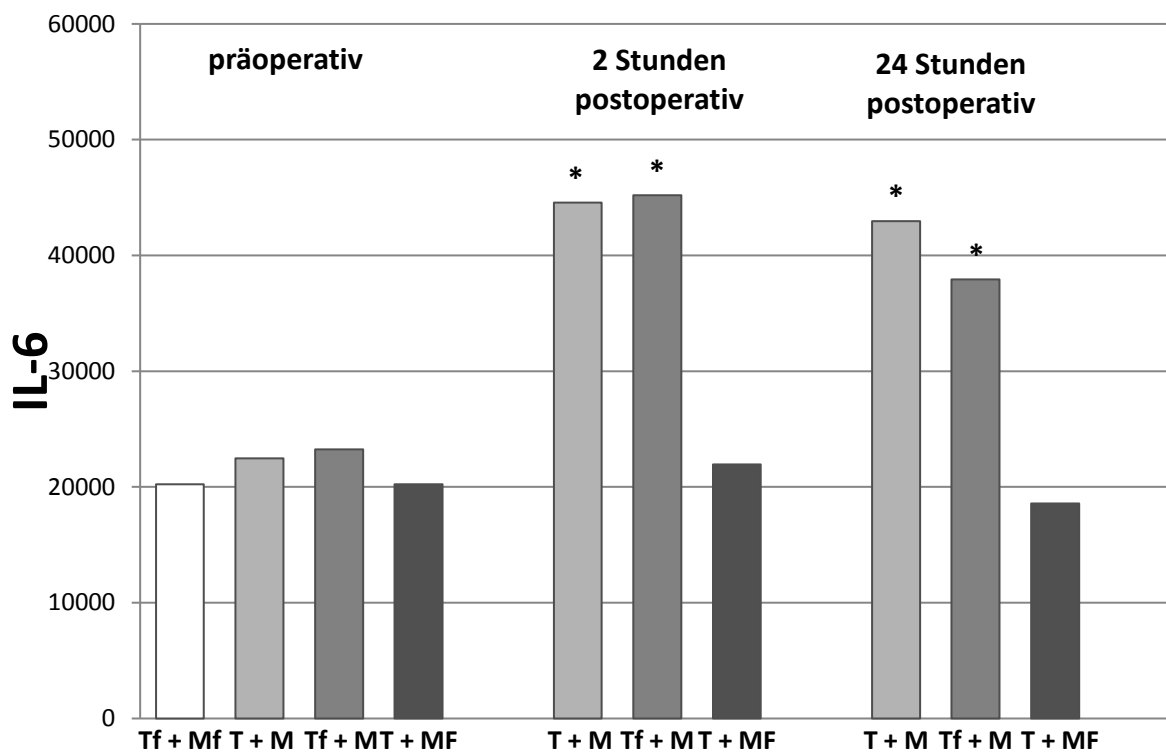


Abbildung 4.6: IL-6: Die Produktion von IL-6 zeigte sich im Falle der Co-Kulturen mit gefrorenen bzw. naiven T-Zellen und naiven APCs postoperativ erhöht. T: T-Zellen; M: Antigen-präsentierende Zellen; f: gefroren. * $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

4.2.2.2 Interleukin 12

Die Sekretion von IL-12 zeigte postoperativ unveränderte Sekretionswerte (Gruppe 2) und zeigte sich auch in den Co-Kulturen mit postoperativ gewonnenen Makrophagen und gefrorenen T-Zellen (Gruppe 3) nicht beeinflusst. Die Sekretion ging in den Co-Kulturen der Gruppe 1 und Gruppe 4 mit gefrorenen Makrophagen auf fast unmessbare Werte zurück. Ähnlich verhielten sich auch präoperative Kontrollen.

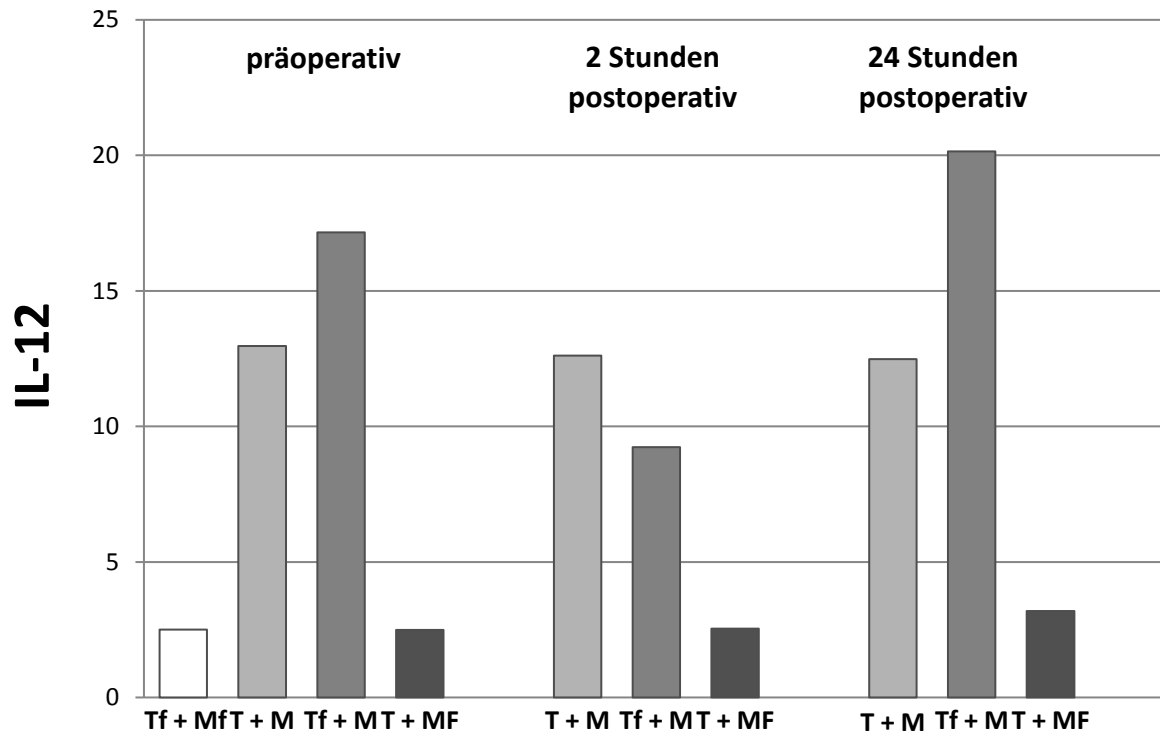


Abbildung 4.7: IL-12: Die Produktion von IL-12 war im Falle der Co-Kulturen mit gefrorenen APCs auf unmessbar kleine Werte unterdrückt. T: T-Zellen; M: Antigen-präsentierende Zellen; f: gefroren. * $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

4.2.2.3 Tumor Nekrose Faktor α

Vergleichbare Sekretionsveränderungen wie im Falle von IL-6 konnten für TNF- α gemessen werden (Abbildung 4.8). Auch hier zeigte sich eine Erhöhung der Sekretionsrate sowohl 2 als auch 24 Stunden in Co-Kulturen mit ausschließlich postoperativ gewonnenen Zellen (Gruppe 2). Auch war die Sekretion von TNF- α in gleicher Weise bei postoperativ gewonnenen Makrophagen, kultiviert mit gefrorenen T-Zellen (Gruppe 3), induziert wie in Co-Kulturen aus rein postoperativ geernteten Zellen (Gruppe 2). Des Weiteren konnte auch keine Sekretionssteigerung nachgewiesen werden in den Co-Kulturen der Gruppe 4 mit postoperativen T-Zellen und gefrorenen Makrophagen.

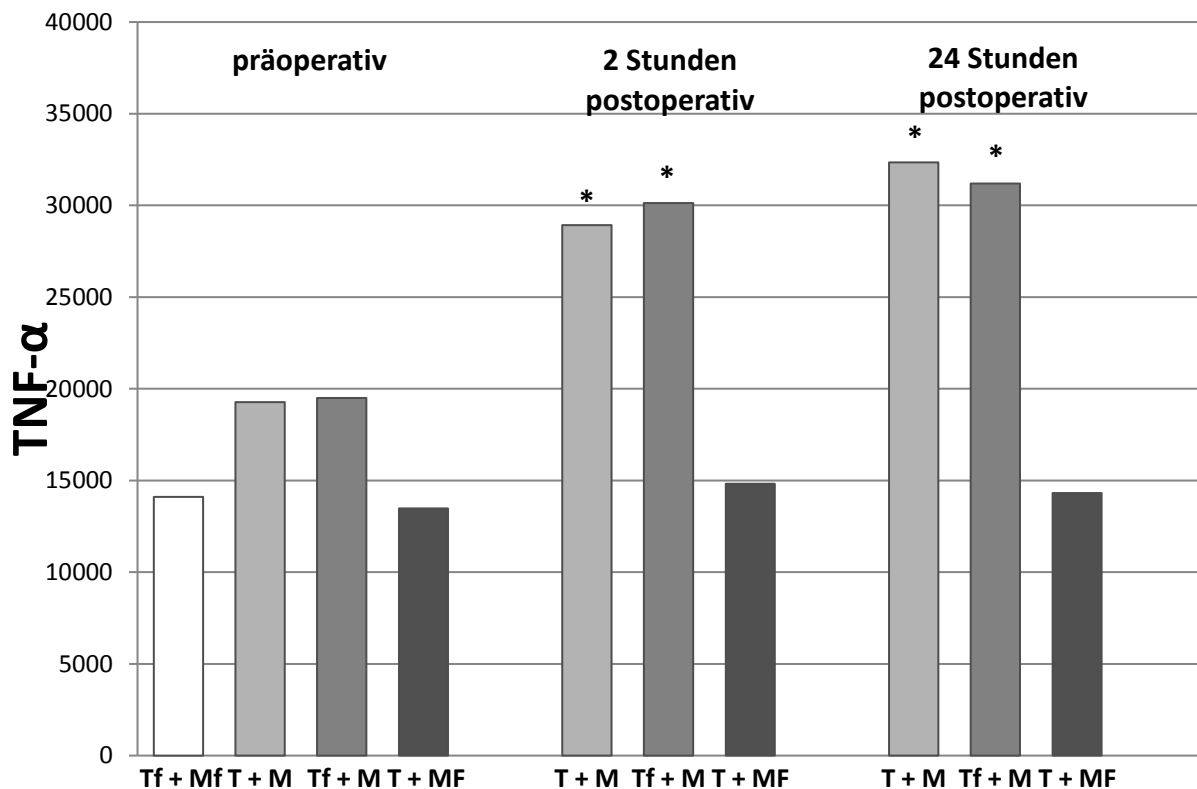


Abbildung 4.8: TNF- α : Die TNF- α Produktion war postoperativ in den Co-Kulturen mit gefrorenen T- und naiven T-Zellen kultiviert mit naiven APCs gesteigert, nicht jedoch im Fall der Co-Kulturen mit gefrorenen APCs. T: T-Zellen; M: Antigen-präsentierende Zellen; f: gefroren. * $p < 0.05$ verglichen mit präoperativen Werten.

5 DISKUSSION

5.1 PROBLEMSTELLUNG

Abdominalchirurgische operative Eingriffe lösen eine Unterdrückung der zellvermittelten Immunreaktionen aus mit einer daraus resultierenden Anfälligkeit für infektiös bedingte Komplikationen und letztlich einer erhöhten Mortalität [56]. Dabei kommt es nach dem traumatischen Ereignis lokal zu einer Entzündungsreaktion (Hyperinflammation), die mit einer Sezernierung proinflammatorischer Zytokine einhergeht [2, 3, 8]. Kompensatorisch führt die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen [2, 56, 57] zu Zellfunktionsstörungen vor allem im Bereich der adaptiven Immunantwort [56, 58].

Diese Immunsuppression umfasst neben anderen Immunzellen auch T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen. T-Zellen z.B. weisen eine geringere Proliferationsrate auf [3, 13] und sezernieren weniger produzierte Zytokine wie IL-2 und IFN- γ [11, 59]. Zusätzlich zu einer reduzierten Zytokinausschüttung zeigten Antigen-präsentierende Zellen auch noch einen verminderten Einbau von MHC-II Molekülen in die Zellmembran, was wiederum zu einer geringeren Antigenpräsentation führt [2, 29, 60]. Diese Interaktion ist für die Regulation der Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass diese Interaktion nach Trauma und Hämorrhagie sowohl durch T-Zellen als auch durch antigenpräsentierende Zellen gestört wird. Kawasaki et al. zeigte in *in vitro* Experimenten, dass antigenpräsentierende Zellen, welche 2 Stunden nach einem Trauma gewonnen wurden die T-Zell Antwort unterdrücken [46]. Auf der anderen Seite sind auch anerge T-Zellen in der Lage die Oberflächenmarkerexpression von MHC II auf antigenpräsentierenden Zellen zu unterdrücken [31]. In einem Co-Kulturmodell konnten Walz et al. zeigen, dass nach Trauma und Hämorrhagie gewonnene T-Zellen die Freisetzung von IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen unterdrücken [11]. Andererseits waren die von T-Zellen produzierten Zytokine IFN- γ , IL-4 oder GM-CSF [10] von traumatisierten, antigenpräsentierenden Zellen nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass in tierexperimentellen Studien eine verminderte MHC-II Expression auf APCs nach Trauma und Hämorrhagie durch eine reduzierte Zytokinfreisetzung aus T-Zellen bedingt ist. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welcher Immunzelltyp primär für die postoperative Immunsuppression beim Menschen verantwortlich ist.

5.2 EXPERIMENTELLER VERSUCHSAUFBAU

Es ist nur bedingt möglich, tierexperimentelle Daten aus Schockmodellen auf den Menschen zu übertragen, wenngleich die in der Forschung verwendeten Mäuse wie der Mensch, bei einer genetischen Übereinstimmung von ca. 80% [61], über eine ausgeprägte Th1/Th2 Immunantwort verfügen [62] und es in beiden Spezies zu einer unterdrückten Zytokinreaktion von T-Zellen kommt [8, 63], oder Antigen-präsentierende Zellen eine unterdrückte Antigenpräsentation sowie eine reduzierte Zytokinfreisetzung aufweisen [2, 8, 13, 29].

Bei den im tierexperimentellen Versuchsaufbau verwendeten Mäusen handelt es sich jedoch vorwiegend um gesunde, gleichaltrige, eingeschlechtliche Mausklone mit einer vergleichbaren Immunsystemaktivität [64]. Ferner werden die Versuchstiere alle einem standardisierten Trauma unterzogen, die Schwere der Traumatisierung ist also nahezu identisch. Durch sogenannte Schein-Operationen, ein fester Bestandteil in tierexperimentellen Schocksimulationen, ist ein exakter Vergleich zwischen operierten Mäusegruppen und Kontroll-Mäusegruppen möglich.

Humane Patienten sind deutlich heterogener in Bezug auf Alter, Geschlecht und Klinik. Eine Vergleichbarkeit zwischen tierexperimentellem Aufbau und humanexperimentellem Setting wird zudem durch ergänzende externe Faktoren wie Lebensstandard oder medizinischer Vorgeschichte der einzelnen Studienteilnehmer erschwert [61]. Ziel dieser Arbeit war daher in humanen Patienten die initiale posttraumatische Immunreaktion sowohl anhand der Zelloberflächenrezeptoren als auch der zellspezifischen Zytokinsekretion zu analysieren wie es aus etablierten tierexperimentellen „traumatisch hämorrhagischen Schockmodellen“ bekannt ist. Aus der Gesamtheit operativer Patienten wurden, zur Beantwortung der zur untersuchenden immunologischen Fragestellungen, Studienteilnehmer mit einer großen viszeralchirurgischen Operation ausgewählt und untersucht, da hier von einem adäquaten operativem Trauma mit entsprechendem Entzündungsreiz und Blutverlust auszugehen ist. Eine einschränkende Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse ist jedoch bei einer Teilnehmerzahl von 14 Studienteilnehmern gegeben.

In FACS Analysen wurden die prä- und postoperativ gewonnenen Immunzellen auf die Expression Zell-charakterisierender Oberflächenmarker analysiert. Ferner wurde auch der Aktivierungsgrad der einzelnen Zelltypen über die Oberflächenmarkerexpression gemessen. Durch den Einsatz von Isotypenkontrollen (baugleiche Kontrollantikörper) bzw. durch Blockierung des Fc Fragments auf APC wurden antikörperbedingte Autofluoreszenzen sowie unspezifische Antikörperbindungen verhindert.

CD3 charakterisiert hierbei die T-Zellpopulation. Die T-Zellpopulation wurde durch weitere gemessene Oberflächenmarker wie CD4, CD8, CD25 und CD127 in Subpopulationen analysiert. Die

Oberflächenexpression von CD4 und CD25 bei fehlendem CD127 charakterisiert dabei den als regulatorische T-Zelle (T_{reg}) bezeichneten T-Zellsubtyp [9, 65, 66]. Diese regulatorischen T-Zellen können die Th1-induzierte Immunantwort unterdrücken und einen Wechsel zugunsten einer Th2-vermittelten anti-inflammatorischen, immunsuppressiven Zellantwort vorantreiben [67].

Im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen spielt die Co-Stimulation über Co-Rezeptoren eine mitentscheidende Rolle, da T-Zellen ohne Co-Rezeptoren präsentierte Antigene nicht erkennen oder aber in einen anergen Zustand verfallen [68]. Einen wichtigen Co-Rezeptor stellt CD28 dar, das als Ligand CD80 und CD86 auf APCs bindet. Zusammen mit dem TCR (T-Zell-Rezeptor) stellt CD28 die sog. Immunologische Synapse dar [69, 70]. Das in dieser Arbeit ebenfalls bestimmte CD69 wird als „*very-early-activation-marker*“ bezeichnet [71, 72], da es schon sehr früh nach T-Zell-Aktivierung in die Zellmembran integriert wird. Auch CD154, der CD40 Ligand, gehört zu den schnell exprimierten T-Zell-Aktivierungsmarkern [73]. Dieser stellt durch erhebliche Steigerung der Zytokinproduktion [74] nach $IFN-\gamma$ Sekretion den zweiten wichtigen Aktivierungsweg für Makrophagen dar.

Die Antigen-präsentierenden Zellen wurden auf das LPS-spezifische [75] und den Zelltyp charakterisierende CD14 sowie CD16, CD40, CD80, CD86 und auf MHC-II analysiert. Makrophagen, die den niedrig affinen Fc-Rezeptor CD16 exprimieren, weisen im Rahmen einer Inflammation erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen sowie eine verstärkte Antigenexpression über MHC-II auf [76, 77]. Die Expression des Co-Rezeptors CD40 auf Makrophagen stimuliert die Produktion und Sekretion von IL-6, IL-12 sowie $TNF-\alpha$, die somit deren Aktivierung anzeigen. Des Weiteren fördert es den Einbau von MHC-II, CD80 bzw. CD86 in die Zellmembran [78], die weitere Aktivierungsmarker darstellen. CD80 und CD86, die Liganden von CD28 [79] gehören zur B7- Immunglobulin-Superfamilie [80]. Die Interaktion von CD40 und CD40L (CD154) zeigt sowohl einen Effekt auf die APCs wie auch auf die T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine unterbrochene Verbindung zwischen CD40/CD154 bei in vitro durchgeführten APC/T-Zell Co-Kulturen zu einer unterdrückten T-Zell Proliferation führt [81]. Zudem stellt diese Bindung eines der entscheidenden Signale für die vollständige Ausreifung und Schlagfertigkeit der APCs dar [82]. Zuletzt wurde auch noch das Ausmaß der Antigenpräsentation mittels der Expression des MHC-II Rezeptors bestimmt. Der Einbau von MHC-II Molekülen in die Zellmembran aktiviert APCs und fördert die Zytokinausscheidung [83]. Einen Subtyp der Antigen-präsentierenden Zellen stellen die HLA-DR negativen Zellen dar. Der als *myeloid derived suppressor cell* (MDSC) bezeichnete Zelltyp [84] bezeichnet eine heterogene Zellpopulation aus myeloiden Progenitorzellen, unreifen Makrophagen, Granulozyten bzw. dendritischen Zellen, deren Zellzahl vor allem im Rahmen von Tumorerkrankungen, Infektionen und Inflammation ansteigt. Ein Charakteristikum dieser Zellpopulation ist die ausgeprägte Fähigkeit die T-Zellantwort zu unterdrücken [85]. Im Rahmen der Immunantwort können sie ferner die Zytokinproduktion von IL-12 durch Makrophagen vermindern [86]. Studien haben gezeigt, dass

MDSCs nach Trauma hochreguliert werden [52, 87]. Die daraus resultierende vermehrte Produktion von Arginase-1 führt zu verminderten Argininspiegeln [9]. Außerdem konnte eine enge Korrelation zwischen der Verfügbarkeit von Arginin und der Proliferationsregulation von T-Zellen durch mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [88, 89].

Die Analyse der posttraumatischen Zytokinfreisetzung erfolgte in vier Co-Kulturgruppen, die wie folgt zusammengestellt wurden: In Gruppe 1 wurden präoperativ gewonnene T-Zellen und APC in Co-Kultur gebracht um nach 2 bzw. 24 Stunden eine initiale Verlaufsbeurteilung der sezernierten Zytokine zu analysieren. Gruppe 2 setzte sich ausschließlich aus postoperativen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen zusammen, mit dem Ziel die initiale postoperative Immunreaktion zu analysieren. Gruppe 3 diente der Untersuchung der Zytokinsekretion posttraumatischer Antigen-präsentierender Zellen und deren Einfluss auf T-Zellen. In Gruppe 4 wurde der Einfluss traumatisierter T-Zellen auf präoperativ gewonnenen APC analysiert. Die Co-Kulturen wurden während der Inkubationszeit von 24 Stunden mit LPS stimuliert. Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien wie *Escherichia coli*. Zusammen mit dem Lipopolysaccharid Binding Protein bindet es an den auf der Zelloberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimierten, LPS spezifischen, CD14 Rezeptor [75]. Dieser Rezeptor wird samt Antigen phagozytotisch in die Zelle aufgenommen, zerkleinert und mittels MHC-II wieder auf der Zelloberfläche eingebaut [90]. Hieraus resultiert eine Zytokinsekretion der APC, da die Expressierung von Antigen-bestücktem MHC-II als Aktivierungssignal dient [83]. Obwohl LPS spezifisch an CD14 auf APCs bindet muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass eine mögliche T-Zell-Stimulation durch LPS nicht auszuschließen ist [91]. Die Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen durch LPS [29, 92-94] wurde bereits in vielen experimentellen wie auch klinischen Studien verwendet und stellt somit eine anerkannte Stimulationsmethode dar. Auch die Kryokonservierung ist eine etablierte und seit langem eingesetzte Methode Zellen in gefrorenem Zustand für einen späteren Einsatz zu konservieren. Beobachtungen zeigten jedoch nach Kryokonservierung LPS-stimulierter Antigen-präsentierender Zellen eine signifikant reduzierte IL-12 Reduktion [95, 96], wohingegen APCs nach Stimulation mit CD40L bzw. IFN- γ keine IL-12 Sekretionsreduktion aufwiesen [97]. Die in dieser Arbeit generierten Daten korrelieren mit den Beobachtungen einer LPS induzierten IL-12 Reduktion, da alle Co-Kulturen (Gruppe 1+4) in denen gefrorene Makrophagen co-inkubiert wurden eine signifikant unterdrückte IFN- γ bzw. IL-12 Sekretion aufwiesen. Eine Feststellung, die sich nicht mit den Daten von Walz et al. im Tiermodell decken [11]. Die auffällig reduzierte IL-12 Sekretion könnte somit neben dem Trauma auch durch LPS als Aktivierungsstimulus im Rahmen der Kryokonservierung verursacht sein. Die T-Zellen waren von den Kryokonservierungsvorgängen augenscheinlich nicht beeinflusst wie die IFN- γ bzw. die GM-CSF Sekretion zeigt.

Aus den Zellkulturüberständen wurden nach 24 Stunden die Zytokinsekretion für IL-6, IL-12, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ mit Hilfe eines Multiplex-Assays gemessen. Diese Multiplex Assay Technologie

verbindet die Durchflusszytometrie mit der ELISA Technik. Diese Technik ermöglicht es, verglichen mit dem klassischen ELISA-Assay, mehrere, unterschiedliche Zytokine in weniger zeitaufwendigen Arbeitsschritten, in einem größeren Messbereich (bis 30.000 pg/ml) zu untersuchen. Verdünnungsreihen, wie sie beim ELISA-Assay entfallen dadurch. Potentielle Verdünnungsfehler können somit vermieden werden.

5.3 ANALYSE DER T-ZELLFUNKTION

Eine supprimierte Aktivierung der T-Zellen in der frühen postoperativen Phase, wie sie schon von Hsieh et al. [68] nachgewiesen werden konnte, deckt sich mit den Daten dieser Arbeit. Sowohl auf der Ebene der Oberflächenproteine, als auch bei der Produktion bzw. Sekretion von Zytokinen zeigt sich eine verminderte Aktivierung. In der frühen postoperativen Phase ist nach 2 Stunden eine maximale Suppression CD3 positiver T-Zellen nachweisbar. Hieraus resultiert eine reduzierte Aktivierung in das Zellinnere. Eine reduzierte Zytokinproduktion bzw. Sekretion ist die Folge, wie man anhand der Ergebnisse 2 Stunden nach erfolgter Operation für IFN- γ sehen kann. Zeitgleich wurden jedoch für GM-CSF im Anschluss an ein abdominalchirurgisches Trauma mit Hämorrhagie signifikant erhöhte Werte gemessen. Dies weist darauf hin, dass die Unterdrückung von T-Zellen speziell die IFN- γ Sekretion betreffen könnte und zumindest teilweise einen APC-unabhängigen Mechanismus darstellt. Andere T-Zell Subpopulationen (CD3+CD4+, CD3+CD8+) waren in ähnlicher Weise reduziert. Interessanterweise war der Oberflächenmarker CD28, der als co-stimulatorischer Rezeptor auf T-Zellen mit dem Rezeptorkomplex von CD80 und CD86 für die reziproke Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen sorgt [47] 2 und 24h Stunden nach Trauma im Vergleich zu präoperativ gemessenen Werten, sowie verglichen mit der gesamten postoperativen CD3 positiven Zellpopulation, signifikant vermindert. Diese Ergebnisse unterstreichen wiederum die nachgewiesene frühe Suppression von T-Zellen in der posttraumatisch bedingten Immunreaktion. Ein weiteres Indiz für die supprimierte Aktivierung bzw. Zellproliferation von T-Zellen in der frühen postoperativen Phase sind die 2 Stunden postoperativ gemessenen Werte für CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors [65]. Die auf aktivierten T-Zellen in die Zellmembran integrierte α -Kette erhöht die Bindungsaffinität für IL-2 [98]. Fehlt dem IL-2 Rezeptor die α -Kette ist die Bindungsaffinität nicht ausreichend den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 zu binden, eine IL-2 induzierte Proliferation bzw. Zell-Differenzierung bleibt aus. Wenn auch nicht signifikant, was möglicherweise auf den geringen Probenumfang zurückzuführen ist, deutet auch die Unterdrückung des „*very-early-activation-markers*“ CD69 [71, 72] auf eine supprimierte T-Zellaktivierung in der frühen postoperativen Phase hin, wie schon in anderen Arbeiten gezeigt [68].

Interessanterweise zeigten sich die CD4+CD25+CD127- T-Zellen postoperativ nicht unterdrückt. Verglichen mit der gesamten CD3 positiven Zellpopulation zeigten die regulatorischen T-Zellen

2 Stunden nach der Operation einen signifikanten Anstieg. Daher scheinen die regulatorischen T-Zellen nach bauchchirurgischer Operation bezogen auf die Gesamtheit der T-Zellen induziert zu sein. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei Traumapatienten [99] beschrieben und kann möglicherweise, durch Induktion der Th2-vermittelten, immunsuppressiven T-Zellantwort, eine unterdrückte T-Zellaktivierung erklären. Auch das Verhältnis von CD4 positiven Th1-Lymphozyten zu CD8 positiven Th2-Lymphozyten war postoperativ zu Gunsten der Th2-Lymphozyten verändert. Die errechneten Verhältnisse stellten sich zwar als nicht signifikant heraus, waren aber kongruent mit Messwerten vorangegangener Arbeiten [10] und typisch für Traumapatienten [100].

5.4 ANALYSE DER FUNKTION ANTIGEN-PRÄSENTIERENDER ZELLEN

Im Gegensatz zur T-Zellfunktion zeigte sich eine Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen in der postoperativen Phase neben einer Zellzahlerhöhung CD14 positiver APC nach operativem Trauma mit einer maximalen Zellzahlerhöhung 24 Stunden nach der Operation. Der HLA-DR exprimierende Subtyp CD14 positiver Zellen wies eine Expressionssteigerung des MHC-II Moleküls auf, eine konträre Beobachtung zu früheren Studien von Ayala bzw. Walz et al. [11, 29]. Diese fehlende MHC-II Unterdrückung mag dem relativ milden Trauma bzw. Hämorrhagie dem unsere Patienten ausgesetzt waren, geschuldet sein, da die Patienten in der Mehrzahl der Fälle keinem massivem Schock ausgesetzt waren. Die Hochregulation des MHC-II Moleküls auf Antigen-präsentierenden Zellen könnte möglicherweise auch auf die direkte Stimulation durch LPS in den Co-Kulturen zurückzuführen sein [101], welche bereits in vielen experimentellen wie auch klinischen Studien verwendet wurde [29, 92-94]. 2 Stunden nach der Operation konnte wie für MHC-II auch für die Oberflächenmarker CD16 und den co-stimulatorischen Rezeptor CD86 eine signifikante Steigerung aufgezeigt werden, verglichen mit der gesamt gemessenen CD14 positiven Zellpopulation. Wie in dieser Arbeit konnte eine postoperative Zunahme der CD16 positiven APCs in Patienten in der frühen postoperativen Phase auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden [102]. CD16 positive APCs produzieren unter Stimulation von LPS immunsuppressive Zytokine wie IL-10 [103]. Als Hauptproduzent von IL-10 unterstützt die postoperative Zunahme CD16 positiver APCs eine posttraumatische Unterdrückung der Th1-vermittelten Immunantwort. Ferner kommt es zu einer unterdrückten Produktion von IFN- γ durch IL-10 unter Stimulation von LPS [104]. CD86 ein Ligand für den auf T-Zellen exprimierten Rezeptor CD28 liefert co-stimulatorische Signale, welche für die Aktivierung von T-Zellen nötig sind [68]. Die Bindungsaffinität von CD86 zu CTLA-4 ist um ca. 20 fach größer als die Bindungsaffinität von CD 86 für CD28 [78]. Im Falle von CD152 (CTLA-4) führt die Co-Stimulation durch CD86 und CTLA-4 zu einer ausgeprägten IL-2 Sekretions- bzw. T-Zellproliferationshemmung [105]. Eine gesteigerte Interaktion von CD86 und CTLA-4 könnte, wie im Tiermodell angedeutet [68], bei vermehrter Expression von CD86, aber verminderter Expression von CD28, zu einer posttraumatischen Unterdrückung der T-Zellaktivierung beitragen. Die CD86-CTLA-4 Interaktion wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Die deutlichste Zellzunahme zeigte sich für die CD14+HLA-DR- Zellen (MDSC). Arginin ist an der Proliferation der Lymphozyten und an der Formierung des T-Zell-Rezeptors beteiligt. Aus der Zellzunahme der MDSC resultiert jedoch, durch die vermehrte Produktion von Arginase -1, ein reduzierter Argininspiegel im Blut [9]. Dieser Blutspiegel kann jedoch auch unter dem Einfluss von Th-2-Zytokinen (IL4, IL-10) bzw. durch aktivierte oder regulatorische Makrophagen, die selbst Arginase-1 produzieren können entstehen [106]. Die Aktivierung bzw. Differenzierung von Makrophagen dauert jedoch mehr als 48 Stunden, daher ist es unwahrscheinlich, dass eine reduzierte Argininkonzentration im Blut hierdurch bedingt ist. Dies unterstreicht die von uns, in operierten Patienten, nachgewiesene, gestörte immunoproliferative T-Zellantwort bzw. Zytokinproduktion durch

die Hochregulation der MDSC. Das am Übergang der humoralen Immunantwort in die zelluläre Immunantwort eine Schlüsselstellung einnehmende IL-6 [107] zeigte im Anschluss an ein abdominalchirurgisches operatives Trauma mit Hämorrhagie, eine gesteigerte Sekretion, unabhängig davon ob die Makrophagen mit naiven oder traumatisierten T-Zellen inkubiert wurden (Gruppe 2+3). Hieraus lässt sich für das untersuchte Patientenkollektiv folgern, dass die Sekretion von IL-6 durch Antigen-präsentierende Zellen unabhängig vom Aktivierungsgrad der T-Zellen ist.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Antigen-präsentierende-Zellen früh und persistierend im Anschluss an ein relevantes chirurgisches Trauma aktiviert sind, während T-Zellen in der frühen postoperativen Phase in ihrer Immunantwort unterdrückt werden. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation dieser Vorgänge scheinen MDSC und regulatorische T-Zellen zu spielen.

5.5 KLINISCHE RELEVANZ

Im Rahmen von traumatisch-hämorrhagischen Schocksituationen kommt es zu Störungen der Immunantwort auf zellulärer Ebene [2, 57, 108] mit teilweise schwerwiegenden Komplikationen im weiteren Krankheitsverlauf. Es ist daher von großer Dringlichkeit neue Therapieoptionen zur Behandlung dieses akuten Krankheitsbildes zu entwickeln. Dies ist jedoch nicht möglich, ohne die pathophysiologischen Zusammenhänge im Rahmen des Schocks genau verstanden zu haben.

Die bis dato durchgeführten Therapieversuche mit dem Ziel die Immunkaskade auf zellulärer Ebene mit rekombinant hergestellten Zytokinen wie IFN- γ oder IL-12 [109-112] wieder herzustellen, erzielen nicht den gewünschten Therapieerfolg. Dies weist auf ein möglicherweise differenzierteres Störungsmuster in der Zellkommunikation hin. Hierbei spielen der Applikationszeitpunkt, die Menge und Konzentration sowie die Applikationsform immunomodulatorischer Substanzen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie, indem sie zelluläre Mechanismen der postoperativen Immunsuppression aufklärt und im zeitlichen Verlauf darstellt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ein ausgedehntes operatives Trauma bedingt eine Kompromittierung der zellulären Immunantwort, die wiederum zur Ausbildung von weiteren schwerwiegenden Komplikationen wie z.B. Sepsis, Multi-Organversagen oder sogar zum Tod führen kann. T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Die komplexe Interaktion dieser beiden Zelltypen ist für die Aufrechterhaltung einer geregelten Immunantwort mitverantwortlich. Eine aus einem Ungleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischer Zytokinfreisetzung resultierende Immunsuppression kann ursächlich für Komplikationen sein. Welcher Zelltyp für Initiierung und Unterhalten der Immunsuppression nach Trauma und Hämorrhagie verantwortlich ist, kann auf Basis der aktuellen Studienlage nicht ausreichend beantwortet werden. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie die Veränderungen von isolierten Antigen-präsentierenden Zellen wie auch T-Zellen bzw. die gegenseitigen Einflüsse zueinander nach abdominalchirurgischem Trauma und Hämorrhagie mit Hilfe eines Co-Kulturmodells zu untersuchen.

Den Studienteilnehmern wurde an vier vorher definierten Zeitpunkten Blut zur Gewinnung der T-Zellen bzw. APCs entnommen. Nach deren Isolierung aus PBMCs wurden diese 24 Stunden in vier definierten Gruppen unter Stimulation mit LPS co-inkubiert. Zur Bestimmung der T-Zell- bzw. der APC Funktion wurden die Zellüberstände auf zellspezifische Zytokine hin analysiert. Des Weiteren wurden charakteristische Oberflächenrezeptoren sowohl auf T-Zellen wie auch auf APCs mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Nach chirurgischem Trauma ließ sich eine unterdrückte T-Zellzahl nachweisen, wohingegen die Zellzahlen der CD14+ Zellen erhöht waren. Ferner war auch die Oberflächenmarkerexpression auf T-Zellen unterdrückt. Eine Induktion zeigten hingegen APC. Verknüpft mit der T-Zellsuppression zeigte sich eine deutliche Induktion myeloider Suppressorzellen sowie eine Aktivitätssteigerung der regulatorischen T-Zellen. Für die Produktion zelltypischer Zytokine konnte eine unterdrückte Sekretion auf Seiten der T-Zellen nachgewiesen werden, während APC T-Zell-unabhängig aktiviert erschienen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie beim Menschen eine Suppression der T-Zellaktivierung in der frühen postoperativen Phase nach Trauma und Hämorrhagie, wohingegen Antigen-präsentierende Zellen unabhängig von der T-Zellfunktion persistierend aktiviert erscheinen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. BANCHEREAU, J., ET AL., *IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS*. ANNU REV IMMUNOL, 2000. **18**: P. 767-811.
2. KEEL, M. AND O. TRENTZ, *PATHOPHYSIOLOGY OF POLYTRAUMA*. INJURY, 2005. **36**(6): P. 691-709.
3. CHAUDRY, I.H., ET AL., *HEMORRHAGE AND RESUSCITATION: IMMUNOLOGICAL ASPECTS*. AM J PHYSIOL, 1990. **259**(4 Pt 2): P. R663-78.
4. PRUITT, J.H., E.M. COPELAND, 3RD, AND L.L. MOLDAWER, *INTERLEUKIN-1 AND INTERLEUKIN-1 ANTAGONISM IN SEPSIS, SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME, AND SEPTIC SHOCK*. SHOCK, 1995. **3**(4): P. 235-51.
5. HILDEBRAND, F., H.C. PAPE, AND C. KRETTEK, [*THE IMPORTANCE OF CYTOKINES IN THE POSTTRAUMATIC INFLAMMATORY REACTION*]. UNFALLCHIRURG, 2005. **108**(10): P. 793-4, 796-803.
6. AYALA, A., M.M. PERRIN, AND I.H. CHAUDRY, *DEFECTIVE MACROPHAGE ANTIGEN PRESENTATION FOLLOWING HAEMORRHAGE IS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF MHC CLASS II (IA) ANTIGENS*. IMMUNOLOGY, 1990. **70**(1): P. 33-9.
7. AYALA, A., ET AL., *DIFFERENTIAL EFFECTS OF HEMORRHAGE ON KUPFFER CELLS: DECREASED ANTIGEN PRESENTATION DESPITE INCREASED INFLAMMATORY CYTOKINE (IL-1, IL-6 AND TNF) RELEASE*. CYTOKINE, 1992. **4**(1): P. 66-75.
8. ANGELE, M.K. AND I.H. CHAUDRY, *SURGICAL TRAUMA AND IMMUNOSUPPRESSION: PATHOPHYSIOLOGY AND POTENTIAL IMMUNOMODULATORY APPROACHES*. LANGENBECKS ARCH SURG, 2005. **390**(4): P. 333-41.
9. MARIK, P.E. AND M. FLEMMER, *THE IMMUNE RESPONSE TO SURGERY AND TRAUMA: IMPLICATIONS FOR TREATMENT*. J TRAUMA ACUTE CARE SURG. **73**(4): P. 801-8.
10. WALZ, C.R., ET AL., *THE POTENTIAL ROLE OF T-CELLS AND THEIR INTERACTION WITH ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN MEDIATING IMMUNOSUPPRESSION FOLLOWING TRAUMA-HEMORRHAGE*. INNATE IMMUN, 2009. **15**(4): P. 233-41.
11. WALZ, C.R., ET AL., *DEPRESSED T CELL-DERIVED IFN-GAMMA FOLLOWING TRAUMA-HEMORRHAGE: A POTENTIAL MECHANISM FOR DIMINISHED APC RESPONSES*. LANGENBECKS ARCH SURG, 2007. **392**(3): P. 339-43.
12. ANGELE, M.K., ET AL., *SEX STEROIDS REGULATE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE BY MACROPHAGES AFTER TRAUMA-HEMORRHAGE*. AM J PHYSIOL, 1999. **277**(1 Pt 1): P. C35-42.
13. ANGELE, M.K. AND E. FAIST, *CLINICAL REVIEW: IMMUNODEPRESSION IN THE SURGICAL PATIENT AND INCREASED SUSCEPTIBILITY TO INFECTION*. CRIT CARE, 2002. **6**(4): P. 298-305.
14. EFRON, P. AND L.L. MOLDAWER, *SEPSIS AND THE DENDRITIC CELL*. SHOCK, 2003. **20**(5): P. 386-401.
15. ABRAHAM, E., *PHYSIOLOGIC STRESS AND CELLULAR ISCHEMIA: RELATIONSHIP TO IMMUNOSUPPRESSION AND SUSCEPTIBILITY TO SEPSIS*. CRIT CARE MED, 1991. **19**(5): P. 613-8.
16. RAHBARI, N.N., ET AL., *POST-HEPATECTOMY HAEMORRHAGE: A DEFINITION AND GRADING BY THE INTERNATIONAL STUDY GROUP OF LIVER SURGERY (ISGLS)*. HPB (OXFORD). **13**(8): P. 528-35.
17. ROULIN, D., ET AL., *SYSTEMATIC REVIEW OF DELAYED POSTOPERATIVE HEMORRHAGE AFTER PANCREATIC RESECTION*. J GASTROINTEST SURG. **15**(6): P. 1055-62.

18. BATEMAN, R.M., M.D. SHARPE, AND C.G. ELLIS, *BENCH-TO-BEDSIDE REVIEW: MICROVASCULAR DYSFUNCTION IN SEPSIS--HEMODYNAMICS, OXYGEN TRANSPORT, AND NITRIC OXIDE*. CRIT CARE, 2003. **7**(5): P. 359-73.
19. GUTIERREZ, G., H.D. REINES, AND M.E. WULF-GUTIERREZ, *CLINICAL REVIEW: HEMORRHAGIC SHOCK*. CRIT CARE, 2004. **8**(5): P. 373-81.
20. THAULAND, T.J. AND D.C. PARKER, *DIVERSITY IN IMMUNOLOGICAL SYNAPSE STRUCTURE*. IMMUNOLOGY. **131**(4): P. 466-72.
21. DAVIS, D.M. AND M.L. DUSTIN, *WHAT IS THE IMPORTANCE OF THE IMMUNOLOGICAL SYNAPSE?* TRENDS IMMUNOL, 2004. **25**(6): P. 323-7.
22. YANAGI, Y., ET AL., *A HUMAN T CELL-SPECIFIC CDNA CLONE ENCODES A PROTEIN HAVING EXTENSIVE HOMOLOGY TO IMMUNOGLOBULIN CHAINS*. NATURE, 1984. **308**(5955): P. 145-9.
23. HARDING, F.A., ET AL., *CD28-MEDIATED SIGNALLING CO-STIMULATES MURINE T CELLS AND PREVENTS INDUCTION OF ANERGY IN T-CELL CLONES*. NATURE, 1992. **356**(6370): P. 607-9.
24. HARRIS, N.L. AND F. RONCHESI, *THE ROLE OF B7 COSTIMULATION IN T-CELL IMMUNITY*. IMMUNOL CELL BIOL, 1999. **77**(4): P. 304-11.
25. LENSCHOW, D.J., T.L. WALUNAS, AND J.A. BLUESTONE, *CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION*. ANNU REV IMMUNOL, 1996. **14**: P. 233-58.
26. LIM, T.S., ET AL., *CD80 AND CD86 DIFFERENTIALLY REGULATE MECHANICAL INTERACTIONS OF T-CELLS WITH ANTIGEN-PRESENTING DENDRITIC CELLS AND B-CELLS*. PLOS ONE. **7**(9): P. E45185.
27. SAMELSON, L.E., J.B. HARFORD, AND R.D. KLAUSNER, *IDENTIFICATION OF THE COMPONENTS OF THE MURINE T CELL ANTIGEN RECEPTOR COMPLEX*. CELL, 1985. **43**(1): P. 223-31.
28. ASTHANA, D., ET AL., *DIFFERENTIAL EFFECTS OF IFN-GAMMA ON KIDNEY CELL EXPRESSION OF MHC CLASS II MOLECULES, KIDNEY CELL ASSOCIATED MOLECULES AND THEIR STIMULATORY CAPACITY IN MIXED LYMPHOCYTE KIDNEY CELL CULTURE*. TRANSPL IMMUNOL, 1993. **1**(4): P. 282-293.
29. AYALA, A., W. ERTEL, AND I.H. CHAUDRY, *TRAUMA-INDUCED SUPPRESSION OF ANTIGEN PRESENTATION AND EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY CLASS II ANTIGEN COMPLEX IN LEUKOCYTES*. SHOCK, 1996. **5**(2): P. 79-90.
30. NEWTON, S., ET AL., *SEPSIS-INDUCED CHANGES IN MACROPHAGE CO-STIMULATORY MOLECULE EXPRESSION: CD86 AS A REGULATOR OF ANTI-INFLAMMATORY IL-10 RESPONSE*. SURG INFECT (LARCHMT), 2004. **5**(4): P. 375-83.
31. VENDETTI, S., ET AL., *ANERGIC T CELLS INHIBIT THE ANTIGEN-PRESENTING FUNCTION OF DENDRITIC CELLS*. J IMMUNOL, 2000. **165**(3): P. 1175-81.
32. RUDD, C.E., A. TAYLOR, AND H. SCHNEIDER, *CD28 AND CTLA-4 CORECEPTOR EXPRESSION AND SIGNAL TRANSDUCTION*. IMMUNOL REV, 2009. **229**(1): P. 12-26.
33. SHARPE, A.H., *MECHANISMS OF COSTIMULATION*. IMMUNOL REV, 2009. **229**(1): P. 5-11.
34. UNANUE, E.R., ET AL., *ANTIGEN PRESENTATION: COMMENTS ON ITS REGULATION AND MECHANISM*. J IMMUNOL, 1984. **132**(1): P. 1-5.
35. MCHONEY, M., ET AL., *DECREASED MONOCYTE CLASS II MHC EXPRESSION FOLLOWING MAJOR ABDOMINAL SURGERY IN CHILDREN IS RELATED TO OPERATIVE STRESS*. PEDIATR SURG INT, 2006. **22**(4): P. 330-4.
36. CHAIN, B.M., P.M. KAYE, AND M.A. SHAW, *THE BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING*. IMMUNOL REV, 1988. **106**: P. 33-58.
37. SHEVACH, E.M. AND A.S. ROSENTHAL, *FUNCTION OF MACROPHAGES IN ANTIGEN RECOGNITION BY GUINEA PIG T LYMPHOCYTES. II. ROLE OF THE MACROPHAGE IN THE REGULATION OF GENETIC CONTROL OF THE IMMUNE RESPONSE*. J EXP MED, 1973. **138**(5): P. 1213-29.

38. FAIST, E., ET AL., *ALTERATION OF MONOCYTE FUNCTION FOLLOWING MAJOR INJURY*. ARCH SURG, 1988. **123**(3): p. 287-92.
39. WAKEFIELD, C.H., ET AL., *CHANGES IN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II EXPRESSION IN MONOCYTES AND T CELLS OF PATIENTS DEVELOPING INFECTION AFTER SURGERY*. BR J SURG, 1993. **80**(2): p. 205-9.
40. ABRAHAM, E., *EFFECTS OF STRESS ON CYTOKINE PRODUCTION*. METHODS ACHIEV EXP PATHOL, 1991. **14**: p. 45-62.
41. ABRAHAM, E. AND A.A. FREITAS, *HEMORRHAGE IN MICE INDUCES ALTERATIONS IN IMMUNOGLOBULIN-SECRETING B CELLS*. CRIT CARE MED, 1989. **17**(10): p. 1015-9.
42. KANG, S.C., ET AL., *ARE THE IMMUNE RESPONSES DIFFERENT IN MIDDLE-AGED AND YOUNG MICE FOLLOWING BONE FRACTURE, TISSUE TRAUMA AND HEMORRHAGE?* CYTOKINE, 2004. **26**(5): p. 223-30.
43. MENGER, M.D. AND B. VOLLMAR, *SURGICAL TRAUMA: HYPERINFLAMMATION VERSUS IMMUNOSUPPRESSION?* LANGENBECKS ARCH SURG, 2004. **389**(6): p. 475-84.
44. HILDEBRANDT, U., ET AL., *COMPARISON OF SURGICAL STRESS BETWEEN LAPAROSCOPIC AND OPEN COLONIC RESECTIONS*. SURG ENDOSC, 2003. **17**(2): p. 242-6.
45. WEIGHARDT, H., ET AL., *IMPAIRED MONOCYTE IL-12 PRODUCTION BEFORE SURGERY AS A PREDICTIVE FACTOR FOR THE LETHAL OUTCOME OF POSTOPERATIVE SEPSIS*. ANN SURG, 2002. **235**(4): p. 560-7.
46. KAWASAKI, T., ET AL., *TRAUMA-HEMORRHAGE INDUCES DEPRESSED SPLENIC DENDRITIC CELL FUNCTIONS IN MICE*. J IMMUNOL, 2006. **177**(7): p. 4514-20.
47. JENKINS, M.K., ET AL., *CD28 DELIVERS A COSTIMULATORY SIGNAL INVOLVED IN ANTIGEN-SPECIFIC IL-2 PRODUCTION BY HUMAN T CELLS*. J IMMUNOL, 1991. **147**(8): p. 2461-6.
48. ANGELE, M.K., M.C. FRANTZ, AND I.H. CHAUDRY, *GENDER AND SEX HORMONES INFLUENCE THE RESPONSE TO TRAUMA AND SEPSIS: POTENTIAL THERAPEUTIC APPROACHES*. CLINICS, 2006. **61**(5): p. 479-88.
49. MARTIN, R.S., ET AL., *SELECTIVE MANAGEMENT OF CARDIOVASCULAR DYSFUNCTION IN POSTTRAUMATIC SIRS AND SEPSIS*. SHOCK, 2005. **23**(3): p. 202-8.
50. ZALLEN, G., ET AL., *POSTINJURY SUPPRESSION OF HUMAN NEUTROPHIL CYTOKINE PRODUCTION RESULTS FROM THE STABILIZATION OF INHIBITORY KAPPA B*. SHOCK, 1999. **11**(2): p. 77-81.
51. ANGELE, M.K., ET AL., *EFFECT OF GENDER AND SEX HORMONES ON IMMUNE RESPONSES FOLLOWING SHOCK*. SHOCK, 2000. **14**(2): p. 81-90.
52. ZHU, X., G. HERRERA, AND J.B. OCHOA, *IMMUNOSUPPRESSION AND INFECTION AFTER MAJOR SURGERY: A NUTRITIONAL DEFICIENCY*. CRIT CARE CLIN. **26**(3): p. 491-500, IX.
53. OCHOA, J.B., ET AL., *ARGINASE I EXPRESSION AND ACTIVITY IN HUMAN MONONUCLEAR CELLS AFTER INJURY*. ANN SURG, 2001. **233**(3): p. 393-9.
54. PRIX, N.J., *MECHANISMEN DER KOMPROMITTIERTEN INTERAKTION VON T-ZELLEN UND ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN BEI ABDOMINALCHIRURGISCHEN UND SEPTISCHEN PATIENTEN*. 2016, DISSERTATION, LMU MÜNCHEN: MEDIZINISCHE FAKULTÄT.
55. WALZ, C., *DIE KOMPROMITTIERTE T-ZELL-FUNKTION NACH TRAUMA-SHOCK IST VERANTWORTLICH FÜR DIE VERMINDETE ZELL-VERMITTELTE IMMUNANTWORT*. 2008, DISSERTATION, LMU MÜNCHEN: MEDIZINISCHE FAKULTÄT.
56. NI CHOILEAIN, N. AND H.P. REDMOND, *CELL RESPONSE TO SURGERY*. ARCH SURG, 2006. **141**(11): p. 1132-40.
57. NI CHOILEAIN, N. AND H.P. REDMOND, *THE IMMUNOLOGICAL CONSEQUENCES OF INJURY*. SURGEON, 2006. **4**(1): p. 23-31.

58. KNAUS, W.A., ET AL., *PROGNOSIS IN ACUTE ORGAN-SYSTEM FAILURE*. ANN SURG, 1985. **202**(6): P. 685-93.
59. ANGELE, M.K., ET AL., *TESTOSTERONE: THE CULPRIT FOR PRODUCING SPLENOCYTE IMMUNE DEPRESSION AFTER TRAUMA HEMORRHAGE*. AM J PHYSIOL, 1998. **274**(6 Pt 1): P. C1530-6.
60. MACH, B., ET AL., *REGULATION OF MHC CLASS II GENES: LESSONS FROM A DISEASE*. ANNU REV IMMUNOL, 1996. **14**: P. 301-31.
61. TSUKAMOTO, T. AND H.C. PAPE, *ANIMAL MODELS FOR TRAUMA RESEARCH: WHAT ARE THE OPTIONS?* SHOCK, 2009. **31**(1): P. 3-10.
62. AYALA, A., ET AL., *POLYMICROBIAL SEPSIS BUT NOT LOW-DOSE ENDOTOXIN INFUSION CAUSES DECREASED SPLENOCYTE IL-2/IFN-GAMMA RELEASE WHILE INCREASING IL-4/IL-10 PRODUCTION*. J SURG RES, 1994. **56**(6): P. 579-85.
63. ANGELE, M.K., ET AL., *TESTOSTERONE AND ESTROGEN DIFFERENTLY EFFECT TH1 AND TH2 CYTOKINE RELEASE FOLLOWING TRAUMA-HAEMORRHAGE*. CYTOKINE, 2001. **16**(1): P. 22-30.
64. DEITCH, E.A., *ANIMAL MODELS OF SEPSIS AND SHOCK: A REVIEW AND LESSONS LEARNED*. SHOCK, 1998. **9**(1): P. 1-11.
65. CHEN, W., ET AL., *CONVERSION OF PERIPHERAL CD4+CD25- NAIVE T CELLS TO CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS BY TGF-BETA INDUCTION OF TRANSCRIPTION FACTOR FOXP3*. J EXP MED, 2003. **198**(12): P. 1875-86.
66. WING, K., ET AL., *CD4+ CD25+ FOXP3+ REGULATORY T CELLS FROM HUMAN THYMUS AND CORD BLOOD SUPPRESS ANTIGEN-SPECIFIC T CELL RESPONSES*. IMMUNOLOGY, 2005. **115**(4): P. 516-25.
67. WING, J.B. AND S. SAKAGUCHI, *MULTIPLE TREG SUPPRESSIVE MODULES AND THEIR ADAPTABILITY*. FRONT IMMUNOL. **3**: P. 178.
68. HSIEH, C.H., ET AL., *SUPPRESSION OF ACTIVATION AND COSTIMULATORY SIGNALING IN SPLENIC CD4+ T CELLS AFTER TRAUMA-HEMORRHAGE REDUCES T-CELL FUNCTION: A MECHANISM OF POST-TRAUMATIC IMMUNE SUPPRESSION*. AM J PATHOL, 2009. **175**(4): P. 1504-14.
69. MONTOYA, M.C., ET AL., *CELL ADHESION AND POLARITY DURING IMMUNE INTERACTIONS*. IMMUNOL REV, 2002. **186**: P. 68-82.
70. DELON, J., S. STOLL, AND R.N. GERMAIN, *IMAGING OF T-CELL INTERACTIONS WITH ANTIGEN PRESENTING CELLS IN CULTURE AND IN INTACT LYMPHOID TISSUE*. IMMUNOL REV, 2002. **189**: P. 51-63.
71. MARZIO, R., J. MAUEL, AND S. BETZ-CORRADIN, *CD69 AND REGULATION OF THE IMMUNE FUNCTION*. IMMUNOPHARMACOL IMMUNOTOXICOL, 1999. **21**(3): P. 565-82.
72. TESTI, R., ET AL., *THE CD69 RECEPTOR: A MULTIPURPOSE CELL-SURFACE TRIGGER FOR HEMATOPOIETIC CELLS*. IMMUNOL TODAY, 1994. **15**(10): P. 479-83.
73. CASAMAYOR-PALLEJA, M., M. KHAN, AND I.C. MACLENNAN, *A SUBSET OF CD4+ MEMORY T CELLS CONTAINS PREFORMED CD40 LIGAND THAT IS RAPIDLY BUT TRANSIENTLY EXPRESSED ON THEIR SURFACE AFTER ACTIVATION THROUGH THE T CELL RECEPTOR COMPLEX*. J EXP MED, 1995. **181**(4): P. 1293-301.
74. POU德里ER, J., ET AL., *CD40 LIGAND SIGNALS OPTIMIZE T HELPER CELL CYTOKINE PRODUCTION: ROLE IN TH2 DEVELOPMENT AND INDUCTION OF GERMINAL CENTERS*. EUR J IMMUNOL, 1998. **28**(10): P. 3371-83.
75. FENTON, M.J. AND D.T. GOLENBOCK, *LPS-BINDING PROTEINS AND RECEPTORS*. J LEUKOC BIOL, 1998. **64**(1): P. 25-32.
76. ZIEGLER-HEITBROCK, L., *THE CD14+ CD16+ BLOOD MONOCYTES: THEIR ROLE IN INFECTION AND INFLAMMATION*. J LEUKOC BIOL, 2007. **81**(3): P. 584-92.

77. SCHERBERICH, J.E. AND W.A. NOCKHER, *CD14++ MONOCYTES, CD14+/CD16+ SUBSET AND SOLUBLE CD14 AS BIOLOGICAL MARKERS OF INFLAMMATORY SYSTEMIC DISEASES AND MONITORING IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY*. CLIN CHEM LAB MED, 1999. **37**(3): p. 209-13.
78. SEBILLE, F., B. VANHOVE, AND J.P. SOULILLOU, *MECHANISMS OF TOLERANCE INDUCTION: BLOCKADE OF CO-STIMULATION*. PHILOS TRANS R SOC LOND B BIOL SCI, 2001. **356**(1409): p. 649-57.
79. BUGEON, L. AND M.J. DALLMAN, *COSTIMULATION OF T CELLS*. AM J RESPIR CRIT CARE MED, 2000. **162**(4 Pt 2): p. S164-8.
80. SHARPE, A.H. AND G.J. FREEMAN, *THE B7-CD28 SUPERFAMILY*. NAT REV IMMUNOL, 2002. **2**(2): p. 116-26.
81. VAN ESSEN, D., H. KIKUTANI, AND D. GRAY, *CD40 LIGAND-TRANSDUCED CO-STIMULATION OF T CELLS IN THE DEVELOPMENT OF HELPER FUNCTION*. NATURE, 1995. **378**(6557): p. 620-3.
82. BANCHEREAU, J. AND R.M. STEINMAN, *DENDRITIC CELLS AND THE CONTROL OF IMMUNITY*. NATURE, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
83. KOBAYASHI, H., ET AL., *CYTOKINE PRODUCTION BY RABBIT ALVEOLAR MACROPHAGES: DIFFERENCES BETWEEN ACTIVATED AND SUPPRESSOR CELL PHENOTYPES*. IMMUNOL LETT, 1999. **69**(3): p. 339-46.
84. GRETEN, T.F., M.P. MANNS, AND F. KORANGY, *MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN HUMAN DISEASES*. INT IMMUNOPHARMACOL. **11**(7): p. 802-7.
85. GABRILOVICH, D.I. AND S. NAGARAJ, *MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS AS REGULATORS OF THE IMMUNE SYSTEM*. NAT REV IMMUNOL, 2009. **9**(3): p. 162-74.
86. SINHA, P., ET AL., *CROSS-TALK BETWEEN MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS AND MACROPHAGES SUBVERTS TUMOR IMMUNITY TOWARD A TYPE 2 RESPONSE*. J IMMUNOL, 2007. **179**(2): p. 977-83.
87. BRYK, J.A., ET AL., *NATURE OF MYELOID CELLS EXPRESSING ARGINASE 1 IN PERIPHERAL BLOOD AFTER TRAUMA*. J TRAUMA. **68**(4): p. 843-52.
88. OCHOA, A.C., ET AL., *ARGINASE, PROSTAGLANDINS, AND MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN RENAL CELL CARCINOMA*. CLIN CANCER RES, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 721s-726s.
89. RODRIGUEZ, P.C. AND A.C. OCHOA, *ARGININE REGULATION BY MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS AND TOLERANCE IN CANCER: MECHANISMS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES*. IMMUNOL REV, 2008. **222**: p. 180-91.
90. FORESTIER, C., ET AL., *INTERACTION OF BRUCELLA ABORTUS LIPOPOLYSACCHARIDE WITH MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MOLECULES IN B LYMPHOCYTES*. INFECT IMMUN, 1999. **67**(8): p. 4048-54.
91. KAYA, Z., ET AL., *COMPLEMENT RECEPTORS REGULATE LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED T-CELL STIMULATION*. IMMUNOLOGY, 2005. **114**(4): p. 493-8.
92. ANGELE, M.K., ET AL., *SEX-SPECIFIC P38 MAP KINASE ACTIVATION FOLLOWING TRAUMA-HEMORRHAGE: INVOLVEMENT OF TESTOSTERONE AND ESTRADIOL*. AM J PHYSIOL ENDOCRINOL METAB, 2003. **285**(1): p. E189-96.
93. ANGELE, M.K., ET AL., *L-ARGININE: A UNIQUE AMINO ACID FOR IMPROVING DEPRESSED WOUND IMMUNE FUNCTION FOLLOWING HEMORRHAGE*. EUR SURG RES, 2002. **34**(1-2): p. 53-60.
94. EISENMENGER, S.J., ET AL., *DIFFERENCES IN THE EXPRESSION OF LPS-RECEPTORS ARE NOT RESPONSIBLE FOR THE SEX-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE AFTER TRAUMA AND HEMORRHAGIC SHOCK*. CELL IMMUNOL, 2004. **230**(1): p. 17-22.
95. MEIJERINK, M., ET AL., *CRYOPRESERVATION OF MONOCYTES OR DIFFERENTIATED IMMATURE DCs LEADS TO AN ALTERED CYTOKINE RESPONSE TO TLR AGONISTS AND MICROBIAL STIMULATION*. J IMMUNOL METHODS. **373**(1-2): p. 136-42.

96. HAYDEN, H., ET AL., *CRYOPRESERVATION OF MONOCYTES IS SUPERIOR TO CRYOPRESERVATION OF IMMATURE OR SEMI-MATURE DENDRITIC CELLS FOR DENDRITIC CELL-BASED IMMUNOTHERAPY*. J IMMUNOTHER, 2009. **32**(6): p. 638-54.
97. LEWALLE, P., ET AL., *FREEZING OF DENDRITIC CELLS, GENERATED FROM CRYOPRESERVED LEUKAPHERESES, DOES NOT INFLUENCE THEIR ABILITY TO INDUCE ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES OR FUNCTIONALLY REACT TO MATURATION STIMULI*. J IMMUNOL METHODS, 2000. **240**(1-2): p. 69-78.
98. LETOURNEAU, S., ET AL., *IL-2- AND CD25-DEPENDENT IMMUNOREGULATORY MECHANISMS IN THE HOMEOSTASIS OF T-CELL SUBSETS*. J ALLERGY CLIN IMMUNOL, 2009. **123**(4): p. 758-62.
99. MACCONMARA, M.P., ET AL., *INCREASED CD4+ CD25+ T REGULATORY CELL ACTIVITY IN TRAUMA PATIENTS DEPRESSES PROTECTIVE TH1 IMMUNITY*. ANN SURG, 2006. **244**(4): p. 514-23.
100. FAIST, E. AND M.W. WICHMANN, *[IMMUNOLOGY IN THE SEVERELY INJURED]*. CHIRURG, 1997. **68**(11): p. 1066-70.
101. CASALS, C., ET AL., *LIPOLYSACCHARIDE UP-REGULATES MHC CLASS II EXPRESSION ON DENDRITIC CELLS THROUGH AN AP-1 ENHANCER WITHOUT AFFECTING THE LEVELS OF CIITA*. J IMMUNOL, 2007. **178**(10): p. 6307-15.
102. WEST, S.D., ET AL., *TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA, MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND C-REACTIVE PROTEIN LEVELS CORRELATE WITH CD14(HIGH)CD16+ MONOCYTE INDUCTION AND ACTIVATION IN TRAUMA PATIENTS*. PLOS ONE. **7**(12): p. e52406.
103. SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J., ET AL., *PERIPHERAL BLOOD CD14HIGH CD16+ MONOCYTES ARE MAIN PRODUCERS OF IL-10*. SCAND J IMMUNOL, 2008. **67**(2): p. 152-9.
104. VARMA, T.K., ET AL., *CELLULAR MECHANISMS THAT CAUSE SUPPRESSED GAMMA INTERFERON SECRETION IN ENDOTOXIN-TOLERANT MICE*. INFECT IMMUN, 2001. **69**(9): p. 5249-63.
105. KRUMMEL, M.F. AND J.P. ALLISON, *CD28 AND CTLA-4 HAVE OPPOSING EFFECTS ON THE RESPONSE OF T CELLS TO STIMULATION*. J EXP MED, 1995. **182**(2): p. 459-65.
106. MOSSER, D.M. AND J.P. EDWARDS, *EXPLORING THE FULL SPECTRUM OF MACROPHAGE ACTIVATION*. NAT REV IMMUNOL, 2008. **8**(12): p. 958-69.
107. JONES, S.A., *DIRECTING TRANSITION FROM INNATE TO ACQUIRED IMMUNITY: DEFINING A ROLE FOR IL-6*. J IMMUNOL, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
108. ANGELE, M.K., ET AL., *TESTOSTERONE RECEPTOR BLOCKADE AFTER HEMORRHAGE IN MALES. RESTORATION OF THE DEPRESSED IMMUNE FUNCTIONS AND IMPROVED SURVIVAL FOLLOWING SUBSEQUENT SEPSIS*. ARCH SURG, 1997. **132**(11): p. 1207-14.
109. AYALA, A., P. WANG, AND I.H. CHAUDRY, *INSIGHTS INTO THE MECHANISM BY WHICH INTERFERON-GAMMA IMPROVES MACROPHAGE FUNCTION FOLLOWING HEMORRHAGE AND RESUSCITATION*. J SURG RES, 1993. **54**(4): p. 322-7.
110. FRANKE, A., ET AL., *IS INTERFERON GAMMA SUPPRESSION AFTER CARDIAC SURGERY CAUSED BY A DECREASED INTERLEUKIN-12 SYNTHESIS?* ANN THORAC SURG, 2006. **82**(1): p. 103-9.
111. SCHINKEL, C., ET AL., *INTERFERON-GAMMA MODIFIES CYTOKINE RELEASE IN VITRO BY MONOCYTES FROM SURGICAL PATIENTS*. J TRAUMA, 2001. **50**(2): p. 321-7.
112. ERTEL, W., ET AL., *INHIBITION OF THE DEFENSE SYSTEM STIMULATING INTERLEUKIN-12 INTERFERON-GAMMA PATHWAY DURING CRITICAL ILLNESS*. BLOOD, 1997. **89**(5): p. 1612-20.

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Angele (Chirurgische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern) für die Überlassung dieses Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Während meiner Arbeit unterstütze er mich mit Rat und Tat, er weckte in mir den wissenschaftlichen Ehrgeiz und vermittelte mir die wissenschaftliche Denkweise, bzw. lehrte mich die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens. Für die Erfahrung, die Arbeit auf einem internationalen Kongress vorzustellen, möchte ich mich ausdrücklich bedanken. Die Herangehensweise an klinische Problemlösungen sowie die wissenschaftliche Denkweise werden für mich in der Zukunft im Rahmen meiner klinischen Arbeit sicher förderlich sein.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Markus Albertsmeier, meinem Betreuer, bedanken, der mir neben seinem täglichen klinischen Alltag bei der Patientenakquise, der -aufklärung, wie auch der statistischen Ausarbeitung der Versuchsdaten mit all seiner Erfahrung und seinem unermüdlichen Enthusiasmus zur Seite stand. Er verstand es mich nach misslungenen Versuchen zu motivieren, mich anzuspornen und er ermunterte mich stets zum Weitermachen.

Auch möchte ich nicht vergessen Frau Prof. Dr. Christiane Bruns und ihrem Laborteam zu danken, die es mir ermöglicht haben in ihrem Labor mit deren technischem Equipment und Knowhow meine experimentellen Versuche durchzuführen und mich dort wie ein Mitglied ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen haben.

Außerdem gebührt mein großer Dank Frau Dr. rer. nat. Natasja van den Engel. Ihr erschien keine Frage meinerseits zu ausgefallen um mir nicht mit Rat und Tat bei der Durchführung der Zellkultur oder der FACS Analyse zur Seite zu stehen.

Zu allerletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich mein ganzes Leben uneigennützig begleiten und ohne die ich heute nicht hier wäre und ohne die ich meinen Wunsch Arzt zu werden und diese Dissertation zu schreiben nie hätte realisieren können.

Dank gebührt auch meiner Frau Alexandra, die mir die Zeit gegeben hat und mich immer wieder unterstützt und angetrieben hat diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Dominik Stephan Quaiser, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Die Bedeutung der Interaktion von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen für die postoperative Immunsuppression abdominalchirurgischer Patienten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.12.2018

Ort, Datum

D.Quaiser

Doktorand

10 ANHANG

Verwendete Geräte und Materialien

Die nachfolgende Tabelle enthält die für die experimentellen Versuche benötigten Geräte und Werkzeuge.

Tabelle 10.1

Geräteart	Herkunft/Firma
S-®Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Werkbank HeraSafe	ThermoScientific, Langensfeld, Deutschland
Ficoll-Hypaque(1,07g/L)	Biomol, Hamburg, Deutschland
HBSS	Lonza, Basel, Schweiz
Multipipette®plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Microbeads® CD3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microbeads® CD14	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS® MS-Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS™ Separationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
50ml Zentrifugiergefäß/Schraubdeckelröhrchen Falcon™ Blue Max	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Handpipetten 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen 200µl, 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Anti-CD3 Antikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD28 Antikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Gefrierbox /Einfrierbox Mr. Frosty™	ThermoScientific, Schwerte, Deutschland
Gefrierschrank	ThermoScientific, Schwerte, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biomol, Hamburg, Deutschland
Lipopolysaccharide (E.coli 055:B5)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nunc® Cryotube®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA