

**Mechanismen der Akkumulation von  
CD4<sup>+</sup> dendritischen Zellen im Knochenmark  
und  
deren Auswirkung auf die Differenzierung  
dendritischer Zellen  
während der polymikrobiellen Sepsis**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie

an der  
Universität Duisburg-Essen  
vorgelegt von

Stephanie Pohlmann  
aus Pritzwalk

**Dezember 2014**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Chirurgische Forschung der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Flohé
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2015

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	7
1.1 Das Immunsystem.....	7
1.1.1 Das angeborene Immunsystem .....	7
1.1.2 Das erworbene Immunsystem .....	10
1.2 Dendritische Zellen.....	11
1.2.1 Ontogenese .....	12
1.2.2 Funktion, Reifung und Migration .....	14
1.2.3 T-Zell Aktivierung .....	15
1.3 Toll like Rezeptoren.....	17
1.4 Sepsis.....	19
1.4.1 Pathogenese der Sepsis .....	20
1.4.2 Leukozyten während Sepsis .....	21
1.4.3 Murine Studien der post-septischen Immunsuppression.....	22
1.4.4 Einfluss der Sepsis auf die TLR-Expression und Signaltransduktion ....	23
1.4.5 Sepsisbedingte Störung der Hämatopoese im Knochenmark.....	24
1.5 Zielsetzung .....	26
<b>2. Materialien</b> .....	27
2.1 Verbrauchsmaterialien .....	27
2.2 Laborgeräte .....	27
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	28
2.3.1 Reagenzien.....	28
2.3.2 Serum .....	28
2.3.3 Pufferlösungen.....	29
2.3.4 Kulturmedium .....	30
2.3.5 Kulturmedium für Bakterien.....	30
2.4 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	30



3.3.4 Einfluss von FTY720 auf die Vermittlung der postseptischen Immunsuppression bei <i>P. aeruginosa</i> Infektion .....	40
3.4 Durchflusszytometrische Analysen.....	40
3.4.1 Prinzip und Methode der Durchflusszytometrie.....	40
3.4.2 Markierung von Zelloberflächenmolekülen.....	41
3.4.3 Intrazelluläre Bestimmung des Proliferationsmarkern Ki-67.....	41
3.5 Nachweis löslicher Moleküle in Zellkultur-Überständen mittels <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	42
3.5.1 Nachweis von Zytokinen in Zellkulturüberständen .....	43
3.5.2 Nachweis von Prostaglandin-E <sub>2</sub> in Knochenmarklavage.....	43
3.6 Statistische Analysen .....	44
<b>4. Ergebnisse</b> .....	45
4.1 Während der akuten Phase der Sepsis kommt es zu zellulären Veränderungen des Knochenmarks .....	45
4.1.1 Reduktion von B-Zellen und Granulozyten im Knochenmark während akuter Sepsis.....	46
4.1.2 Sepsis-assoziierte Akkumulation von T-Zellen im Knochenmark .....	48
4.1.3 Einfluss der polymikrobiellen Sepsis auf Monozytenpopulationen im Knochenmark .....	49
4.2 CD4 <sup>+</sup> DC erscheinen in der akuten Phase der Sepsis im Knochenmark.....	53
4.2.1 Das Erscheinen CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark ist assoziiert mit der Verschiebung der Zytokinbalance hin zur Antiinflammation .....	56
4.2.2 Einfluss von CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark auf die <i>de novo</i> Differenzierung von DC während der Sepsis.....	58
4.2.3 Phänotyp und Herkunft der CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark.....	60
4.2.4 CD4 <sup>+</sup> DC erscheinen früh in den mesenterialen Lymphknoten während Sepsis.....	62
4.2.5 Frühe Akkumulation von CD4 <sup>+</sup> DC in der Milz und dem Blut gefolgt von einem starken Zellverlust in der Milz .....	64

4.3 Herkunft zirkulierender CD4 <sup>+</sup> DC.....	64
4.4 TLR-abhängige Verteilung CD4 <sup>+</sup> DC und CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen in lymphoiden Organen.....	69
4.5 S1P-vermittelte Wanderung von CD4 <sup>+</sup> DC während Sepsis.....	71
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>78</b>
5.1 Sepsis führt rasch zu einer Veränderung der Knochenmarkzusammensetzung .....	78
5.2 Akkumulierende CD4 <sup>+</sup> DC vermitteln die Sepsis-assoziierte Differenzierung dysfunktionaler DC.....	81
5.3 CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark teilen Oberflächenmarker mit cDC aus lymphoiden Organen.....	82
5.4 Sepsis induziert eine TLR2/MyD88-abhängige, S1P-vermittelte Wanderung der CD4 <sup>+</sup> DC über die Blutzirkulation in das Knochenmark .....	85
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>113</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	113
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	116
8.3 Tabellenverzeichnis .....	118
8.4 Lebenslauf.....	119
8.5 Erklärungen .....	121

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat.: *immunis* für „unberührt“, „frei“, „rein“) ist ein komplexes biologisches Abwehrsystem höherer Lebewesen, bestehend aus molekularen und zellulären Bestandteilen. Es beugt Gewebeschädigungen vor, indem es körperfremde Substanzen und Organismen (Pathogene), wie z.B. Pilze, Bakterien, Viren und Parasiten, aber auch geschädigte körpereigene Zellen entfernt. Innerhalb der phylogenetischen Entwicklung entstand neben dem unspezifischen Erkennen körperfremder Strukturen, dem angeborenen Immunsystem, welches schon bei Insekten ausgeprägt ist, in höher entwickelten Organismen (Wirbeltieren) das adaptive oder auch erlernte Immunsystem. Dieses zeichnet sich durch das spezifische Erkennen von pathogenen Strukturen über spezialisierte Rezeptoren aus. Ein wirkungsvoller Schutz vor Infektionen bedarf des effektiven Zusammenspiels beider Systeme [55, 77, 91].

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem zählen erste mechanische und chemische Barrieren, wie die epithelialen Oberflächen (Haut und Schleimhäute), verbunden mit mikrobiziden Substanzen und Enzymen, die das Eindringen und das Wachstum von Mikroorganismen hemmen [139]. Zu den chemischen Barrieren gehören, die in Körperflüssigkeiten, wie Speichel und Tränenflüssigkeit, enthaltenen Enzyme, wie Lysozym, antibakterielle Peptide, wie Defensine und ein drastisch erniedrigter pH-Wert, wie z.B. im Magen [129]. Werden diese ersten Barrieren durchbrochen sind Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage, eindringende Krankheitserreger anhand konservierter molekularer Strukturen, die spezifisch für Mikroorganismen sind, zu erkennen. Diese sogenannten pathogen assoziierten Mustermoleküle (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP's) werden über limitierte keimbahn-kodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) erkannt [91, 92]. Typische PAMP's sind z.B. bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan (PGN) und Flagellin, sowie nicht-methylierte DNA-Sequenzen (CpG), die nur in Bakterien vorkommen. Zu den PRR gehören die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR). Diese extrazellulären oder endosomal gebundenen Transmembranrezeptoren erkennen virale und auch bakterielle Muster. Zudem gibt es auf der Zelloberfläche lokalisierte *Scavenger*- und C-Typ Lektinrezeptoren, die

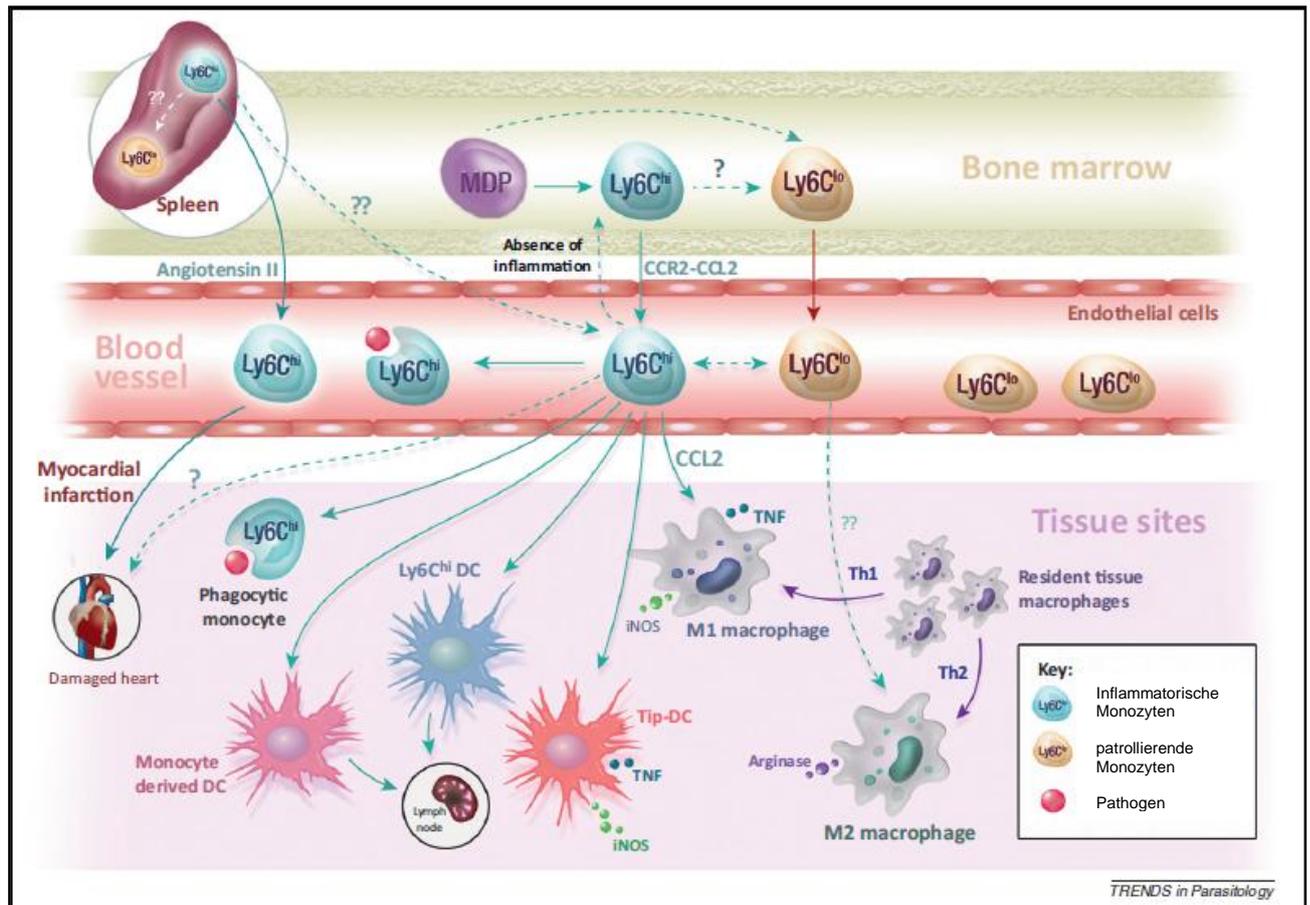
intrazellulären *NOD-like (RIG)* Rezeptoren oder *RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)* ähnliche Proteine, sowie lösliche PRR's, wie das Mannose bindende Lektin [33, 38, 126, 130, 137, 157]. Das Erkennen des Pathogens verläuft hierbei relativ unspezifisch und schnell in Bezug auf den Krankheitserreger, jedoch hochspezialisiert in Bezug auf das zu bindende Epitop.

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören spezialisierte Phagozyten, wie Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, die sämtliche Gewebe des Körpers besiedeln und dort Mikroorganismen mittels PRR's erkennen und aufnehmen. Des Weiteren werden auch dendritische Zellen (DC), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen, sowie eosinophile und basophile Granulozyten zum angeborenen Immunsystem gezählt [51, 92].

Als humoralen Bestandteil umfasst das angeborene Immunsystem eine Reihe von Proteinen, wie dem Komplementsystem und den Akute-Phase-Proteinen, die einerseits die Phagozytose von Mikroorganismen erleichtern, selbst mikrobizid wirken und Immunzellen durch Chemotaxis zum Infektionsort leiten [90]. Neben der direkten Beseitigung von Mikroorganismen sind Makrophagen, wie auch DC, in der Lage, bestimmte Antigene des aufgenommenen Pathogens, endogen aufzuspalten und auf bestimmten Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I oder II auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Diese Antigen-MHC-Komplexe werden von Zielzellen des adaptiven Immunsystems erkannt. Man bezeichnet Makrophagen und DC deshalb auch als Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln sich im Knochenmark aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC). Hierbei handelt es sich um pluripotente Zellen, die in der Lage sind in myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen zu differenzieren. Sie bilden damit die Grundlage aller Immunzellen. Die gemeinsamen Vorläufer aller Zellen des angeborenen Immunsystems werden als gemeinsame myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*, CMP) bezeichnet. Monozyten, Makrophagen und DC entwickeln sich des Weiteren über die gemeinsame Vorstufe der MDP (*monocyte/macrophage and DC progenitor*) [8]. Makrophagen und DC besiedeln rasch lymphoide und nicht-lymphoide Gewebe, wobei die Vielzahl an Monozyten und direkten Monozytenvorläufern unter *steady-state* Bedingungen im Knochenmark und zum Teil

in der Milz verbleibt oder patrouillierend das Blut durchwandert [209, 229]. Unter inflammatorischen Bedingungen migrieren Monozyten rasch in die betroffenen Gewebe und sind dort in der Lage in Makrophagen oder DC zu differenzieren. Sie bilden damit ein Reservoir, schnell zu akquirierender potenter APC und gewährleisten eine rasche und effektive Immunreaktion. Die Art der Differenzierung hängt dabei stark vom eindringenden Pathogen, dem Gewebe und bereits initialisierten Immunreaktionen von z.B. adaptiven Immunzellen ab (Abb.1.1) [212].



**Abbildung 1. 1 Differenzierungspotential von Monozyten unter homöostatischen**

**und inflammatorischen Bedingungen (übernommen von [193]).** Monozyten entstehen aus gemeinsamen Vorläufern der Monozyten, Makrophagen und DC (*monocyte/macrophage and dc progenitor*, MDP) im Knochenmark. Unter homöostatischen Bedingungen liegen Monozyten als patrouillierende Ly6C<sup>lo</sup> und Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Knochenmark vor. Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten gelangen CCL2-vermittelt ins Blut aus. Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen können sie wieder ins Knochenmark zurück migrieren. Inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten differenzieren im Gewebe in verschiedene DC-Subpopulationen und M1-Makrophagen. Patrouillierende Ly6C<sup>lo</sup> Monozyten sind wahrscheinlich in der Lage, über noch ungeklärte Mechanismen in M2-Makrophagen zu differenzieren. Die Milz stellt ebenfalls ein Reservoir für Monozyten dar, welches unter bestimmten Bedingungen akquiriert werden kann.

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem besteht das erworbene, oder auch adaptive Immunsystem aus Antigen-spezifischen Zellen, den T- und B-Zellen. Diese entstehen, wie auch die Zellen des angeborenen Immunsystems, aus HSC im Knochenmark. T- und B-Zellen entwickeln sich dabei aus gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) [89, 104].

Die Entwicklung und Reifung der B-Zellen geschieht im Knochenmark unter Ausbildung der spezifischen B-Zell-Marker, wie CD19 und B220. Reife B-Zellen exprimieren verstärkt B220 auf ihrer Oberfläche. Diese wandern über die Blutzirkulation aus dem Knochenmark und verteilen sich so in allen lymphoiden Geweben, wie den Lymphknoten und der Milz, aber auch in nicht-lymphoiden Geweben, wie dem Peritoneum [27, 28, 94, 108]. Über Immunglobuline, die als membrangebundener B-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche oder als Antikörper sezerniert werden, erkennen B-Zellen pathogen spezifische Antigene und sind auch in der Lage diese über MHCII Moleküle zu präsentieren. Deshalb werden B-Zellen auch zu den APC gezählt [111].

Vorläufer der T-Zellen differenzieren aus CLP im Knochenmark und gelangen über das Blut in den Thymus [185, 255], bevor sie sich dann ausgereift, jedoch noch naiv, in den sekundären lymphoiden Organen, wie der Milz und den Lymphknoten, verteilen. Erst im Thymus werden die T-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküle ausgebildet, vor allem CD3, welches einen Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes darstellt (*T cell receptor complex*, TCR-complex) [172]. Über den TCR werden spezifische Antigen-Peptide erkannt, die auf MHC-Komplexen von APC präsentiert werden. Zwei charakteristische Oberflächenmoleküle, CD4 und CD8, dienen der maßgeblichen Unterscheidung von Subpopulationen der T-Zellen. Als Subpopulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen unterscheidet man natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg), die sich vornehmlich durch ihre starke CD25-Expression und den intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 (*Forkhead-Box-Protein P3*) charakterisieren lassen und sich neben den klassischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen im Thymus entwickeln [253].

Reife CD8<sup>+</sup>T-Zellen erkennen auf MHCI präsentierte Antigen-Peptide und differenzieren anschließend vornehmlich zu zytotoxischen T-Zellen. So werden z.B. virusbefallene körpereigene Zellen erkannt und zerstört [54]. Reife CD4<sup>+</sup>T-Zellen erkennen vornehmlich Antigene, die auf MHCII-Molekülen präsentiert werden und differenzieren anschließend zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>). Bislang sind sechs verschiedene

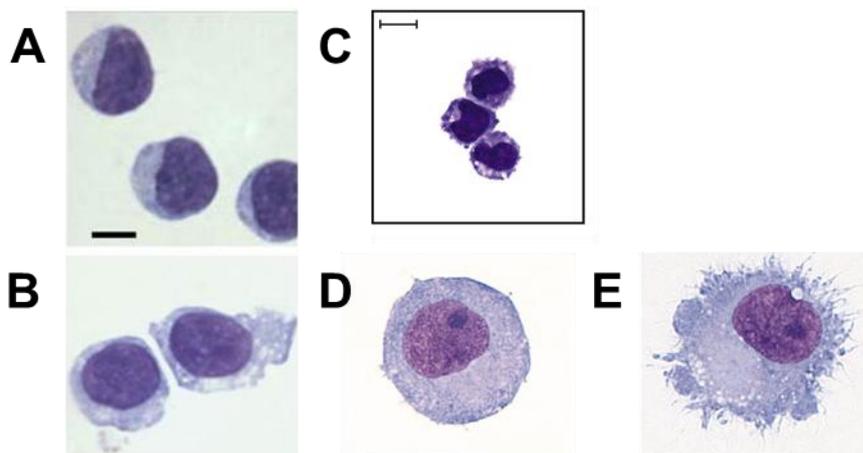
Unterarten der T<sub>H</sub>-Zellen bekannt, die sich in ihrer Funktion und der Fähigkeit zur Produktion verschiedener Zytokine unterscheiden [254]. Die Art der Differenzierung wird durch verschiedene Signale während der T-Zell-Aktivierung beeinflusst. So differenzieren in Anwesenheit von Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) T<sub>H</sub>1-Zellen, die daraufhin ebenfalls IFN- $\gamma$  produzieren und damit Makrophagen zur Abwehr von Bakterien anregen [90]. In Anwesenheit von IL-4 und IL-6 differenzieren vermehrt T<sub>H</sub>2-Zellen, die durch vermehrte IL-4-Produktion unter anderem B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen [36]. Die Zytokine IL-6, TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) und IL-21 fördern die Differenzierung von IL-17-produzierenden T<sub>H</sub>17-Zellen [49]. Durch TGF- $\beta$  entstehen zudem induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs). Diese supprimieren durch die Produktion von TGF- $\beta$  und IL-10 die Proliferation von Effektor-T-Zellen [34]. IL-6 und IL-21 führen zu follikulären T<sub>H</sub>-Zellen (T<sub>fh</sub>), die die Differenzierung von aktivierten B-Zellen in langlebige Gedächtniszellen fördern [39, 149]. Die Kombination aus IL-4 und TGF- $\beta$  führt zu IL-9 produzierenden T<sub>H</sub>9-Zellen [252]. Je nach Stimulation entsteht so ein heterogenes T-Zell-Gemisch.

## 1.2 Dendritische Zellen

Das effiziente Zusammenspiel zwischen angeborenem und erlerntem Immunsystem bedarf spezialisierter Vermittler, die sowohl die spezifische Information über die Art des Pathogens weiterleiten, als auch spezifische Immunantworten einleiten und verstärken. DC sind als professionelle APC in der Lage Pathogene zu erkennen, zu phagozytieren und diese spezifischen T-Zellen über MHC-Moleküle zu präsentieren und so die Information über die Art des Pathogens weiterzugeben [217].

Erstmals beschrieben wurden DC im Jahr 1868 als Langerhans-Zellen der Haut und 1973 von R. Steinman und Z. Cohn in der Milz von Mäusen näher charakterisiert [206]. Demnach handelt es sich um Zellen in geringer Anzahl, die durch besondere morphologische Eigenschaften, wie stellare Ausläufe eindeutig von anderen Zellen zu unterscheiden sind. Heute beschreibt man DC als eine heterogene Gruppe von Leukozyten, die sich je nach Lokalisation in der Expression von Oberflächenmolekülen, ihrem Migrationsmuster und ihrer Zytokinsekretion unterscheiden können [121, 196, 243]. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen konventionellen und nicht-konventionellen DC. Konventionelle DC (cDC) bilden das natürliche Reservoir aus residenten DC in lymphoiden Geweben, wie der Milz und den Lymphknoten, aber auch aus migratorischen DC in nicht-lymphoiden Geweben, wie der Haut, der Lunge und dem Intestinaltrakt. Nicht-konventionelle DC sind von besonderer

Bedeutung unter inflammatorischen Bedingungen. Zu ihnen gehören plasmazytoide DC (pDC) und inflammatorische von Monozyten abgeleitete DC (*monocyte derived DC*, MoDC) [119]. pDC besiedeln lymphoide Organe und inflammatorische DC verteilen sich vornehmlich in nicht-lymphoiden Geweben, am Ort der Infektion [196].



**Abbildung 1. 2 Morphologie dendritischer Zellen.** Unstimulierte (A) sowie CpG-stimulierte (B) plasmazytoide DC (pDC) [210], CD11b<sup>+</sup>DC der Haut (C) [211], unreife (D) bzw. reife von Monozyten abgeleitete DC (MoDC) (E) [150].

### 1.2.1 Ontogenese

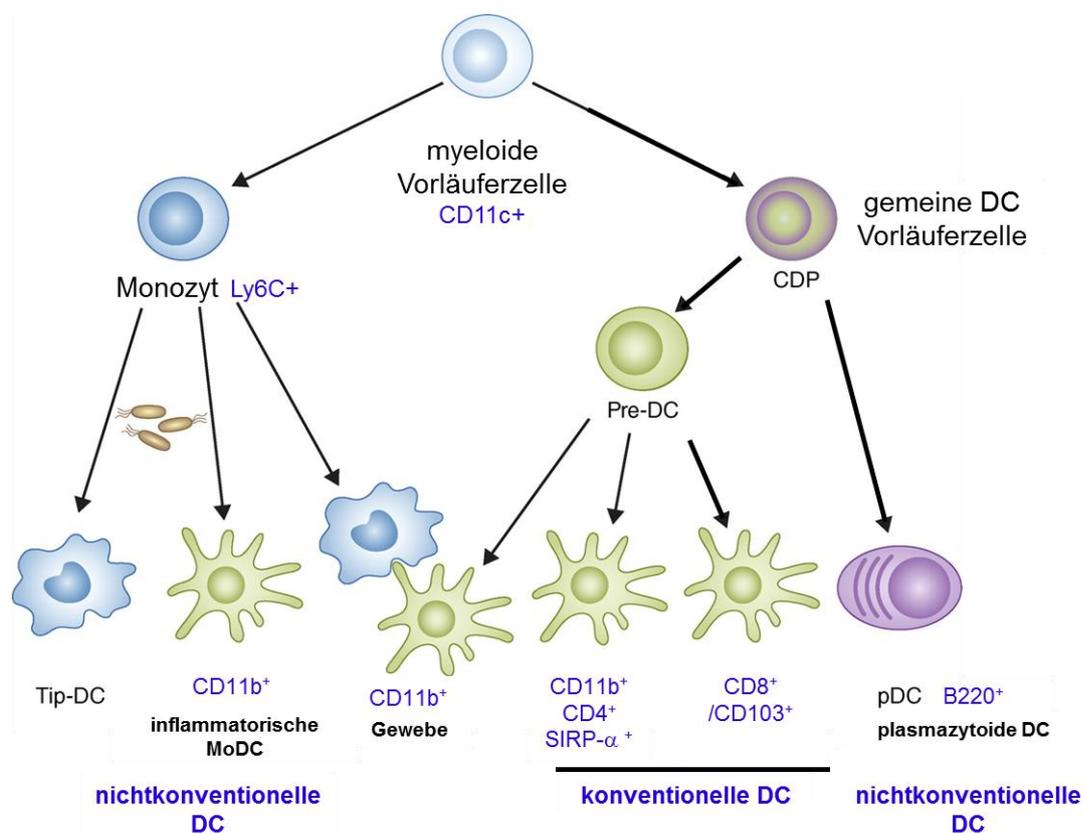
Vorläufer der DC differenzieren kontinuierlich aus CD34<sup>+</sup>HSC im Knochenmark [207]. Über multipotente CLP oder CMP entwickeln sich sogenannte pre-DC, sowie auch pDC, unter Einfluss des Liganden für die *fms-like*-Tyrosinkinase 3 (FLT3-L) [121]. Über die Blutzirkulation verteilen sich diese im gesamten Organismus und besiedeln lymphoide, sowie nicht lymphoide Gewebe, wo es zur terminalen Differenzierung der cDC kommt [120, 237].

Alle DC Subpopulationen teilen gemeinsame Merkmale, die sie eindeutig als Gruppe charakterisieren lassen. Allen gemeinsam ist die Expression des Integrins CD11c [136]. pDC unterscheiden sich im Wesentlichen von cDC durch ihre B220-Expression und der Fähigkeit zur Produktion von Typ-1-Interferonen [199]. In lymphoiden Geweben residente cDC lassen sich in die Subpopulationen der CD8 $\alpha^+$  und CD8 $\alpha^-$  cDC unterteilen. Ein Großteil der CD8 $\alpha^-$  cDC ist zudem CD4<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> und SIRP- $\alpha^+$  [233, 234]. Migratorische DC, wie Langerin<sup>+</sup> E-Cadherin<sup>+</sup> LC der Haut oder häufig CD103<sup>+</sup> interstitielle DC, besiedeln periphere nicht-lymphoide Gewebe, unter Anderem den Gastrointestinaltrakt. Das Adhäsionsmolekül E-Cadherin ist der natürliche Ligand des CD103 [30].

Monozyten bilden unter entzündlichen Bedingungen und unter Wirkung des Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktors (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) aus Ly6C<sup>+</sup>MoDC [114], sowie die spezielle

Form der TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-a) und iNOS (*inducible nitric oxide synthase*, induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) produzierenden DC (TipDC) [191].

Unter T-Zell-vermittelten inflammatorischen Bedingungen differenzieren Gr1<sup>+</sup> inflammatorische Monozyten in den darmassoziierten Geweben (*gut associated lymphoid tissues*, GALT) zu E-Cadherin<sup>+</sup> DC [198]. In vitro Kulturen mit GM-CSF von Knochenmarkszellen, oder Monozyten, die in großer Zahl im Knochenmark vorhanden sind, generieren eine relativ homogene Population CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> inflammatorischer MoDC, die ebenfalls E-Cadherin exprimieren [95, 181, 198]. Knochenmarkkulturen versetzt mit FLT3-L generieren dagegen ein heterogenes Gemisch aus pDC sowie cDC vergleichbar mit den *steady-state* Bedingungen im Organismus [22].



**Abbildung 1. 3 Dendritische Zellen entstehen aus myeloiden Vorläufern im Knochenmark (adaptiert von [166]).** Dendritische Zellen entwickeln sich aus myeloiden Vorläufern im Knochenmark. Über eine Vorstufe der gemeinsamen DC-Vorläufer differenzieren die sogenannten pre-DC, aber auch plasmazytoide DC (pDC) und verteilen sich übers Blut in periphere Organe, wo es zur finalen Differenzierung der pre-DC in konventionelle DC kommt.

### 1.2.2 Funktion, Reifung und Migration

Klassisch betrachtet nehmen migratorische DC im Gewebe eine Wächterfunktion ein. Kontinuierlich phagozytieren sie Antigene aus ihrer Umgebung und wandern über die Lymphbahn in den drainierenden Lymphknoten, um dort durch Antigenpräsentation eine Immunantwort antigenspezifischer Lymphozyten auszulösen. In lymphoiden Geweben residente cDC haben keine direkte Verbindung zur Lymphbahn, dagegen aber zum Blut, wo sie kontinuierlich Antigene aufnehmen. Im Thymus dienen sie so durch Präsentation von Selbstantigenen der negativen Selektion von T-Zellen, um die Apoptose potentiell autoreaktiver T-Zellen einzuleiten [244]. Unreife DC exprimieren eine Vielzahl von PRR auf Ihrer Zelloberfläche, einschließlich TLR, C-Typ Lektinrezeptoren und NOD-like Rezeptoren [217]. Handelt es sich bei dem phagozytierten Antigen um ein Pathogen, so kommt es schnell zur Reifung der DC. Unabhängig vom Pathogen kann dies jedoch auch durch inflammatorische Signale, wie die Zytokine IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  [176], oder Prostaglandine (PGE) ausgelöst werden [99].

Die Aktivierung der DC führt zu einer raschen Änderung der Chemokin-Rezeptor-Expression. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren, die bestimmte migrationsfördernde Proteine, sog. Chemokine, binden. Man unterscheidet zwischen inflammatorischen Chemokinen, die am Inflammationsort von Nicht-Immunzellen, wie z.B. den Keratinozyten der Haut, gebildet werden und konstitutiv gebildeten Chemokinen, die unter normalen Bedingungen für die Verteilung von Immunzellen in lymphoiden Geweben verantwortlich sind [37]. Aktivierte DC regulieren die Expression inflammatorischer Rezeptoren, wie CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 herunter, wobei die konstitutiven Rezeptoren, wie CXCR4 und CCR7 verstärkt exprimiert werden. Dadurch wird die Migration entlang des CCL19/CCL21-Gradientens in den afferenten Lymphknoten induziert [177]. Auf diesem Weg kommt es zur Reifung der DC, wobei Adhäsionsmoleküle, sowie MHCII- und MHCI-Moleküle verstärkt exprimiert werden. Die Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD86 und CD40 dient als essentielles Signal der Aktivierung von T-Zellen [10].

Unreife DC im Gewebe besitzen die, für sie so typischen, stellaren Ausläufe. Diese Dendriten werden im Laufe der Reifung und der verstärkten Migration eingezogen. Im Lymphknoten werden sie jedoch wieder stärker exprimiert und die DC verlieren ihre Beweglichkeit um den effektiven Kontakt mit Lymphozyten zu gewährleisten [12,

118]. Diese Veränderungen werden durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts der DC ermöglicht. Während der DC-Reifung wird diese Reorganisation intrazellulär vermittelt durch die Rho-Familie der kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) bestehend aus Rho, Rac und Cdc42. Das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reguliert über die Aktivierung dieser GTPasen die Zytoskelettorganisation sowie die Migration der DC [202] und ist zudem ein potenter Chemoattraktor für viele weitere Immunzellen, wie z.B T-Zellen, B-Zellen, aber auch NK-Zellen [35, 67, 109, 127]. DC exprimieren alle der fünf bekannten S1P-Rezeptoren (S1PR1-5), wobei die S1PR5-Expression lokal begrenzt ist auf die Milz und das Gehirn [4, 75, 171]. Im ruhenden Zustand exprimieren DC verstärkt S1PR2 auf ihrer Oberfläche. Nach Aktivierung der DC wird diese Expression vermindert und es werden verstärkt S1PR1 und S1PR3 auf der Zelloberfläche prozessiert. Die Aktivierung von S1PR2 führt über die GTPase Rho zur Hemmung der chemokingerichteten Migration der DC. Werden S1PR1/3 aktiviert, kommt es über die Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 zur Unterstützung der chemokingerichteten Migration der bis dahin rastenden DC [40]. S1P wird von vielen Zellen durch den endogenen Abbau des Zellwandbestandteils Sphingomyelin unter Beteiligung der Sphingosinkinasen (SphK) 1 und 2 synthetisiert [171]. Die Hauptproduzenten des S1P sind Erythrozyten sowie Epithelzellen [70, 154, 161]. Dies führt zu hohen S1P Konzentrationen im Bereich  $\mu\text{M}$  Konzentrationen im Plasma und so zu einem natürlichen Gradienten zwischen dem Plasma und den peripherem Gewebe, der die Wanderung verschiedenster Immunzellen induziert [167, 183].

### 1.2.3 T-Zell Aktivierung

Die Aktivierung naiver T-Zellen bedarf drei spezifischer Signale, die sowohl verantwortlich sind für die effektive Aktivierung als auch die Ausbildung der spezifischen Effektorfunktion der T-Zelle.

Die Bindung des TCR an den MHC-Peptid-Komplex der DC (1.Signal), sowie die Interaktion kostimulatorischer Moleküle der APC mit spezifischen Rezeptoren der T-Zelle (2. Signal) führen zur Proliferation und Cytokinsynthese seitens der T-Zelle. Zur Ausbildung der finalen Effektorfunktion und Polarisierung der  $T_H$ -Zelle bedarf es eines dritten Signals, vermittelt durch pro- oder anti-inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-12 (IL-12), welches die Polarisierung  $CD4^+$ T-Zellen in Richtung  $T_H1$  fördert [189, 225].

Der pathogenspezifische TCR erkennt Peptidfragmente, präsentiert als MHC-Peptid-Komplexe durch DC und ist umringt von kostimulatorischen Rezeptoren, da die Bindung des TCR allein nicht ausreicht um die T-Zelle effektiv zu aktivieren [10, 143]. Fehlt das kostimulatorische Signal, durch Bindung kostimulatorischer Rezeptoren der T-Zelle mit entsprechenden Liganden auf der APC, kommt es zur Anergie und schließlich Apoptose der T-Zelle. Kostimulatorische Liganden, die während der Reifung der DC hoch reguliert werden, binden ihren Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche und dienen so der Aktivierung oder Inhibierung der T-Zell-Antwort. Hierzu zählen die zur B7-Familie gehörenden CD80 und CD86 [71, 88]. Diese binden CD28 auf der T-Zell Oberfläche und vermitteln dadurch aktivierende Signale, die zur Proliferation und zum Überleben der T-Zelle führen. Aktivierte T-Zellen exprimieren verstärkt das zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens 4 (*cytotoxic t lymphocyte antigen 4*, CTLA-4), ebenfalls ein B7-Ligand, wobei CD28 durch Endozytose herunterreguliert wird. Die Bindung des CTLA-4 an CD80 oder CD86 inhibiert die T-Zell-Aktivierung und schützt so vor erneuter unspezifischer Stimulierung der aktivierten T-Zelle [173]. Ko-Inhibition führt zur Blockade der Proliferation und inhibiert die Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen [24]. Kostimulatorische Rezeptoren, sowie Adhäsionsmoleküle der T-Zelle sind kolokalisiert mit dem TCR und bilden so die immunologische Synapse auf der T-Zell-Oberfläche, um so eine effiziente Interaktion mit den DC zu gewährleisten [174].

**Tabelle 1.2.3.1 Kostimulatorische Rezeptoren in der immunologischen Synapse**

T-Zell Molekül	Funktion	DC Ligand	Lit.
LFA-1	Adhäsion	ICAM-1, ICAM-3	[180]
ICAM-3	Adhäsion	DC-SIGN	[62, 63]
CD2	Adhäsion, Ko-Stimulation	LFA-3	[192]
TCR	Antigenerkennung	MHC-Peptid-Komplex	[60, 72]
CD28	Ko-Stimulation	CD80, CD86	[173]
CTLA-4	Ko-Inhibition	CD80, CD86	[173]
CD40-Ligand	Ko-Stimulation	CD40	[131]
PD1	Ko-Inhibition	PDL-1, CD80	[26, 249]

### 1.3 Toll like Rezeptoren

Eine bedeutende Stellung in der Erkennung eindringender Pathogene und der Einleitung der initialen Immunantwort nimmt die Gruppe der TLR ein. Diese erhielten ihren Namen auf Grund der starken Ähnlichkeit zum Toll-Rezeptor der Taufliege *Drosophila melanogaster* [168]. Da sie im Gegensatz zu Vertebraten nur über ein angeborenes Immunsystem verfügt, nimmt der Toll-Rezeptor eine zentrale Rolle im Immunsystem der Drosophila-Fliege ein und führt zur Erkennung bakterieller und mykogener Bestandteile [224]. Bis heute sind 13 verschiedene TLR in Vertebraten identifiziert, wobei TLR 1-9 im Menschen und der Maus vergleichbar sind [112, 133, 151]. TLR gehören zu den bestuntersuchten PRR und dienen der Erkennung pathogenassoziierter Lipide, Proteine, Lipoproteine und Nukleinsäuren. Dabei ist jeder einzelne TLR spezifisch in der Erkennung einer bestimmten PAMP Gruppe [107, 133, 134, 248].

Strukturell betrachtet, sind alle TLR Typ-1-Transmembranrezeptoren, bestehend aus der N-terminalen leucinreichen LRR-Sequenz und der zytoplasmatischen Toll/IL-1-Rezeptor homologen Domäne (TIR-Domäne) [101, 107, 132-134]. Die Signalübertragung ist abhängig von der Rekrutierung spezifischer TIR-Domäne-tragender Adaptermoleküle an die TIR-Domäne des TLR. Hierzu gehören der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (*myeloid differentiation factor 88*, MyD88), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$* ), TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor-protein*) oder TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Über die Aktivierung nachgeschalteter Kinasen führen sie zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Produktion pro-, sowie anti-inflammatorischer Zytokine, kostimulatorischer Moleküle, sowie Chemokine [59, 78, 79, 98, 100, 134, 247].

TLR werden von einer Vielzahl an Zellen exprimiert, einschließlich APC, wie Makrophagen und DC, sowie Lymphozyten, wie B-Zellen und zum Teil T-Zellen aber auch NK-Zellen, sowie Nicht-Immunzellen, wie Fibroblasten oder Epithelzellen [2]. Sie befinden sich entweder auf der äußeren Zellmembran, wie TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6, wobei TLR1 und TLR6 Heterodimere mit TLR2 bilden, oder sind endosomal lokalisiert, wie TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9.

Tabelle 1.3.1 TLR und deren Liganden

TLR	Expression	Ligand	Ursprung	Adapter-molekül
TLR2/1	extrazellulär	Triacyl-Lipopeptide: Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Gram-neg. Bakterien	MyD88
TLR2	extrazellulär	Lipopeptide Peptidoglycan (PGN) Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid, LTA) Lipoarrabinomannan Zymosan	Gram-pos./neg. Bakterien Gram-pos. Gram-pos. Mycobakterien Pilze	MyD88
TLR2/6	extrazellulär	Diacyllipopeptide	Gram-pos. Bakterien	MyD88
TLR3	endosomal	Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) Poly-Inosin-:Poly-Cytidyl-Säure (poly I:C)	Viren	TRIF
TLR4	extrazellulär	Lipopolisaccharide (LPS) Fusionsprotein des respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) Fibrinogen Hitze-Schock-Proteine (HSP) 60/70	Gram-neg. RSV körpereigen körpereigen	MyD88/TRIF
TLR5	extrazellulär	Flagellin	Gram-neg.	MyD88
TLR7	endosomal	Einzelsträngige RNA (ssRNA)	Viren	MyD88
TLR8	endosomal	ssRNA	Viren	MyD88
TLR9	endosomal	Nicht-methylierte Cytosin-phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotide	Bakterien, Viren	MyD88

[2]

## 1.4 Sepsis

Ein funktionierendes Immunsystem ist die Grundlage für jeden gesunden Organismus und resultiert aus der Balance zwischen schützenden und schädigenden Immunantworten. Gerät dies aus dem Gleichgewicht, so kann es auf der einen Seite zum Überschießen der Immunantwort kommen und damit zur Schädigung körpereigener Gewebe, unabhängig davon, ob der initiale Auslöser körperfremd, oder körpereigen war. Auf der anderen Seite führt eine geschwächte Immunantwort zur Persistenz von Krankheitserregern und zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen.

Das Krankheitsbild der Sepsis vereint beide Formen der Immundysfunktion, indem eine meist pathogengerichtete überschießende Immunantwort zur massiven Gewebeschädigung des Organismus führt und nach dem Überstehen der initialen Infektion ein erhöhtes Risiko für Sekundärinfektionen besteht [48, 153, 201].

Als dritthäufigste Todesursache in Deutschland, mit einer Inzidenz von über 150.000 Patienten pro Jahr in Deutschland und einer Sterblichkeit von 36 % (Stand 2003/2004) [50] handelt es sich bei der Sepsis um ein schwerwiegendes Versagen des Immunsystems.

Per Definition entsteht Sepsis als Reaktion des Körpers auf eine Infektion, jedoch ist die Quelle der Infektion häufig nicht nachweisbar [164]. Eine einheitliche Definition auf Grundlage der nordamerikanischen Konsensuskonferenz aus dem Jahr 1991 erleichtert daher die klinische Diagnostik von Sepsispatienten. Hiernach unterscheidet man zwischen der eigentlichen Sepsis, die überschießende Immunreaktion auf eine zum Teil nachweisbare Infektion, der schweren Sepsis mit assoziiertem Organversagen und dem septischen Schock, der, trotz ausreichendem Flüssigkeitersatz, mit arterieller Hypotonie einhergeht. Die diagnostischen Kriterien werden über das systemische inflammatorische Response-Syndrom (*systemic inflammatory response syndrom*, SIRS) beschrieben und beinhalten eine stark erhöhte oder auch erniedrigte Körpertemperatur, erhöhte Atem- und Herzfrequenz sowie eine pathologisch veränderte Leukozytenzahl im Blut. Des Weiteren ermöglicht ein Punktesystem, anhand prädispositioneller Faktoren, Art der Infektion, Immunantwort und Organschädigung (*predisposing factors, infection, response, organ dysfunction*, PIRO) die Einschätzung der Schwere und des Verlaufs der vorliegenden Sepsis [115]. Häufige Auslöser einer Sepsis sind gram-positive (*Staphylococcus aureus*, MRSA (multi-resistenter *S. aureus*), Enterokokken), sowie

gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*-Spezies, *Enterobacter*) Bakterien, sowie Pilze (*Candida*, *Aspergillus*). Hierbei handelt es sich vorrangig um nosokomiale Infektionen, wobei *Pseudomonas*-Infektionen die höchste Sterblichkeit hervorrufen [232]. Das heutige Wissen über die Pathogenese der Sepsis beruht größtenteils auf *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen peripheren Blutes oder *post mortem* gewonnener Gewebeproben septischer Intensivpatienten.

#### 1.4.1 Pathogenese der Sepsis

In der initialen Phase der Sepsis entwickelt sich ein „Zytokin-Sturm“, der mit der Freisetzung großer Mengen an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und mikrobiziden Proteinen einhergeht. Zu diesen Mediatoren gehören vornehmlich TNF- $\alpha$ , Interleukine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10), HMGB-1 (*high-mobility group box-1*), Makrophagen-Migration inhibierender-Faktor (*macrophage migration inhibitory factor*, MIF), Stickstoffmonoxid (*nitric oxid*, NO), plättchenaktivierender Faktor (PAF), die aktivierten Komplementfaktoren C3a-5a, PGE und Leukotriene. Vor allem die aktivierten Komplementfaktoren, PFA, PGE, und Leukotriene führen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, was das Eindringen und die Ausbreitung von Leukozyten, aber auch Pathogenen ins Gewebe erleichtert. Die rasche und massive Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-1, führt schnell zu Fieber, Schock und Atemwegsstörungen durch Lungenschädigung [93]. Das Anlocken und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verstärkt zudem die Gewebedestruktion, durch die Produktion toxischer Mediatoren, wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [76, 238]. Durch die Aktivierung von Blutplättchen und Gerinnungsfaktoren kommt es zu einer verstärkten Bildung von Blutgerinnseln, vor allem in der Mikrozirkulation von Organen. Diese Durchblutungsstörung kann durch mangelhafte Sauerstoffversorgung, zusammen mit den bereits beschriebenen Faktoren zu weiteren Organschäden, bis hin zum Multiorganversagen führen [11, 53, 58].

Die anti-inflammatorische Immunreaktion wird hauptsächlich durch das Zytokin IL-10 vermittelt [128, 228]. Vergleichbar mit dem SIRS kommt es parallel zu einer überschießenden anti-inflammatorischen Immunantwort, die zusammengefasst wird als kompensatorisches anti-inflammatorisches Response-Syndrom (*compensatory antiinflammatory response syndrom*, CARS) und bis hin zur Immunparalyse führt [1].

Diverse Studien über die *in vitro* Stimulation von Vollblut und im Besonderen von Monozyten mit bakteriellen Stimuli, wie z.B. LPS, weisen zudem eine verringerte

Aktivierung sowie Produktion pro-inflammatorischer Zytokine *ex vivo* nach [52, 145, 200]. Das Verhältnis von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mediatoren ist dabei entscheidend für das Überleben des Patienten. So haben Patienten mit septischem Schock eine höhere Überlebenschance innerhalb der ersten 28 Tage, wenn das Verhältnis zugunsten der pro-inflammatorischen Mediatoren ausfällt [43]. Die überschießende anti-inflammatorische Immunantwort resultiert schließlich in der Dysregulation des Immunsystems und führt zu einer generellen Immunsuppression. Die Dauer der entstehenden Immunsuppression ist dabei abhängig von der Art, Schwere und Lokalisation der initialen Infektion [64] und kann zu einer langanhaltenden Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Infektionen führen. Klinische Studien berichten, dass für Sepsispatienten bis zu acht Jahre nach dem initialen Krankenhausaufenthalt ein erhöhtes Risiko für lebensbedrohende Infektionen besteht [159, 163].

#### 1.4.2 Leukozyten während Sepsis

Von großer Bedeutung für die Bekämpfung der initialen Infektion und zum Schutz vor Sekundärinfektionen, aber auch körperschädigender Immunantworten ist die Effektivität des adaptiven Immunsystems. Durch Produktion von IFN- $\gamma$  und GM-CSF unterstützen T-Zellen durch Stimulation von Makrophagen die Immunabwehr, können diese jedoch auch durch IL-10-Produktion limitieren [141, 169].

Sepsis führt zu einer Lymphopenie, bedingt durch verstärkte Apoptose von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen im Blut und peripheren Organen [19, 80, 83, 215]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine antiapoptotische Behandlung das Überleben der Versuchstiere in der akuten Phase der Sepsis fördert [84]. Neben dem peripheren Verlust von T-Zellen kommt es zu einer Verlagerung der Differenzierung von CD4<sup>+</sup>T-Zellen hin zum T<sub>H</sub>2-Typ und dem Anstieg von Tregs [56, 178]. Dies ist assoziiert mit verminderten IL-2 und IFN- $\gamma$ -Mengen, bei gesteigerten IL-10 und IL-4-Mengen im Blut [9, 96, 113, 230].

Die Rolle der B-Zelle in Bezug auf die Schwere der Sepsis ist noch unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass während septischen Schocks und *post mortem* eine erhöhte Zahl aktivierter CD80/CD86<sup>+</sup>B-Zellen im Blut vorhanden ist [140].

NK-Zellen sind in der Lage Pathogene direkt über PRR zu erkennen [32] und tragen effektiv zur Aktivierung von DC, Makrophagen, sowie Monozyten durch Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , sowie GM-CSF bei [13, 123, 236]. Sepsis führt zu einer raschen Aktivierung von NK-Zellen und dies korreliert ebenfalls mit der Sterblichkeit während

Sepsis. So lässt sich im Blut von Überlebenden eines septischen Schocks, über 28 Tage ein starker Verlust von NK-Zellen, im Vergleich zu nicht überlebenden Patienten beobachten. Zudem weisen die NK-Zellen der Patienten, die den septischen Schock nicht überlebten eine verstärkte Aktivierung auf [20, 44]. Somit scheint die Schwere einer Sepsis bedingt durch die ungehemmte Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu sein.

Neben der Lymphopenie führt Sepsis auch zu einem starken peripheren Apoptose-induzierten Verlust von DC [82, 86, 213]. Korrelierend zu den Erkenntnissen über Lymphozyten während Sepsis kommt es zudem zu einer raschen Aktivierung der DC, welche verstärkt kostimulatorische Moleküle, wie CD40 und CD86 sowie MHCII exprimieren. Bereits nach wenigen Stunden weisen DC zudem ein verändertes Zytokinprofil auf. Durch die verminderte Fähigkeit zur IL-12-Produktion und einer verstärkten Produktion von IL-10 sind DC, während der Akutphase der Sepsis, aber auch post-septisch, trotz starker Aktivierung nicht in der Lage eine effektive T<sub>H</sub>1-Antwort zu initiieren [61, 239].

#### **1.4.3 Murine Studien der post-septischen Immunsuppression**

Auf Grund der Heterogenität der Sepsis, sowie der unterschiedlichen Prädisposition der Patienten kommt es häufig zu widersprüchlichen Aussagen. Die Entwicklung diverser Tiermodelle dient der standardisierten Untersuchung der Sepsis-assoziierten Immundysfunktion. Um das breite Spektrum der humanen post-septischen Dysregulation des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems adäquat zu untersuchen, wurde das murine Sepsismodell der zökalen Ligatur und Punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP) entwickelt [87, 125]. Dieses Modell simuliert durch Punktion des Blinddarms eine bakterielle Peritonitis, die im Menschen neben der Infektion der Atemwege zu den häufigsten Auslösern einer Sepsis gehört [226]. Über die Größe und Anzahl der Punktionen, Länge des ligierten Darmabschnitts und Form der möglichen Antibiose ist es möglich den Schweregrad der Sepsis zu variieren und damit, die Heterogenität der humanen Sepsis widerzuspiegeln. Verringert man den Schweregrad, somit die Menge des aus dem Zökum austretenden pathogenen Materials, so verringert sich die Sterblichkeit sowie Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, bei steigender IL-10-Produktion [235].

Die CLP führt zudem auch, wie im klinischen Verlauf der Sepsis, zu einer akuten Lungenschädigung und einer erhöhten post-septischen Anfälligkeit gegenüber Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* oder dem opportunistischen Pilz *Aspergillus*

*fumigatus* [15, 144, 205]. Die Anfälligkeit für Lungeninfektionen wird maßgeblich durch eine verstärkte  $T_H2$ -Antwort vermittelt. Außerdem führt die gestörte IFN- $\gamma$  Produktion von NK-Zellen, zu einer verstärkten IL-10 Freisetzung durch APC in der Lunge [156]. Erhöhte IL-10-Mengen inhibieren die IL-12-Produktion, so induziert z.B. die *in vitro* Stimulation von DC aus der Milz mit IL-10 eine  $T_H2$  Antwort bei T-Zellen [45]. IL-10 fördert zudem die Differenzierung von DC, die durch die Induktion von Tregs die Antwort von T-Zellen effektiv supprimieren [18].

Die intrapulmonale Injektion von naiven DC in septische Mäuse verringert deren Anfälligkeit für sekundäre Lungeninfektionen. Dies weist darauf hin, dass DC maßgeblich an der Ausbildung der pulmonalen post-septischen Immunsuppression beteiligt sind [16, 156, 239]. Neben der verstärkten Bildung von IL-10 ist die IL-12-Produktion post-septischer DC im Mausmodell gestört. Trotz ausgeprägter Expression kostimulatorischer Moleküle sind diese DC nicht in der Lage eine effektive  $T_H1$ -Antwort zu induzieren [61, 155]. DC haben nur eine Lebensdauer von wenigen Tagen. Bereits vier Tage nach CLP lassen sich keine Bakterien mehr nachweisen, die für die Ausbildung der initialen Sepsis verantwortlich waren [155]. Die über mindestens 2 Wochen anhaltende Dysfunktion nach Sepsis weist somit auf eine bereits veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark hin [14]. *In vitro* Knochenmarkkulturen post-septischer Mäuse mit GM-CSF führen zu dysfunktionalen *de novo* generierten DC (*bone marrow derived DC*, BMDC), die die Immunsuppression auf naive Tiere übertragen können. So ist eine Infektion naiver Mäuse mit *P. aeruginosa* wesentlich stärker ausgeprägt, wenn ihnen zeitgleich post-septisch generierte BMDC *intra nasal* injiziert werden [155].

#### **1.4.4 Einfluss der Sepsis auf die TLR-Expression und -Signaltransduktion**

In septischen Patienten zeigt sich eine verstärkte periphere monozytäre TLR2- und TLR4-Expression im Vergleich zu gesunden Probanden [6, 219]. Murine Sepsis-Modelle weisen zudem die verstärkte TLR-Expression auf Makrophagen der Leber und Milz und bereits eine Stunde nach Sepsisinduktion die Hochregulation auf *Messenger-RNA*- (mRNA) Ebene in Leber und Lunge nach [221, 242]. Eine erhöhte TLR-Expression führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer verstärkten Immunreaktion. *In vitro* stimulierte periphere mononukleäre Zellen septischer Patienten zeigen trotz erhöhter TLR4-Expression eine reduzierte Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu gesunden Probanden [220]. LPS ist, als Bestandteil gram-negativer Bakterien, Hauptauslöser einer gram-negativen Sepsis. Im Mausmodell

konnte gezeigt werden, dass Präexposition mit LPS eine erneute Stimulation von Peritonealmakrophagen mit LPS verhindert. Diese Reaktion wird als Endotoxin-Toleranz bezeichnet und ist *in vitro* assoziiert mit der verminderten Expression des TLR4 und korreliert somit nicht mit der *in vivo* Situation bei Sepsis [148].

Auf Grund ihrer verstärkten Expression sind TLR während Sepsis stark im Fokus der Forschung, um eine adäquate Behandlung des SIRS zu erzielen und so die nachgeschaltete Anergie des adaptiven Immunsystems zu verhindern. Jedoch führen diese Studien zu kontroversen Ergebnissen. Die Blockade des murinen TLR4/MD-2-Komplexes sowie der nachgeschalteten Signaltransduktion verbessert das Überleben bei septischem Schock durch die verminderte Aktivierung von Leukozyten [42, 147]. Die Expression von TLR2 und TLR4 ist zudem assoziiert mit der Sterblichkeit in der frühen Phase polymikrobieller Sepsis [242]. Im humanen System führen Mutationen des TLR4 zu einem erhöhten Vorkommen von gram-negativen Infektionen und septischem Schock [122]. Betreffen die Mutationen dagegen die nachgeschaltete Signalkaskade des TLR4 so bringt dies einen Schutz gegen diverse Infektionen [102].

#### **1.4.5 Sepsisbedingte Störung der Hämatopoese im Knochenmark**

Das Knochenmark ist der Ursprung der Hämatopoese. Kontinuierlich differenzieren hier die Zellen des Immunsystems aus CD34<sup>+</sup> pluripotenten Vorläuferzellen, den HSC. Über den S1P-Gradienten zwischen Knochenmark, Blut und den peripheren Organen wandern kontinuierlich hämatopoetische Vorläufer aus dem Knochenmark aus und verteilen sich im Organismus [17, 65, 165]. Während der Sepsis kommt es bereits zu einer gestörten Hämatopoese.

Im Blut septischer Patienten zeigt sich im Verlauf der Sepsis ein starker Anstieg CD34<sup>+</sup> HSC, der zudem assoziiert ist mit der erhöhten Sterblichkeit der Patienten [218]. Neben der erhöhten Expression im Blut konnte dies im Tiermodell auch für das Knochenmark nachgewiesen werden [188]. HSC sind in der Lage direkt über TLR oder indirekt über die Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen auf eine Infektion zu reagieren [146]. In einem Mausmodell der Sepsis konnte gezeigt werden, dass die starke Akkumulation der HSC im Knochenmark und dem Blut dabei unabhängig von TLR4, IFN $\alpha/\beta$ , sowie der Signaltransduktion über MyD88 oder TRIF ist [188].

Die starke Expansion der HSC bei Sepsis dient in erster Linie der Regeneration des Immunsystems. In der frühen Phase der Sepsis kommt es zu einer starken Infiltration von neutrophilen Granulozyten am Infektionsherd. Da diese nur eine kurze

Lebensdauer haben, befindet sich ein großes Reservoir im Knochenmark, das im Falle einer Infektion schnell akquiriert werden kann. Ist dieses Reservoir durch anhaltende Infektion und stetigen Bedarf an neutrophilen Granulozyten aufgebraucht, kommt es zur raschen Neubildung aus HSC im Knochenmark [117, 222]. Während Sepsis ist diese Neubildung jedoch gestört und es kommt zu einem starken Verlust von neutrophilen Granulozyten im Blut, der sogenannten Neutropenie. In einem murinen Sepsismodell, das aus einem Verbrennungstrauma und anschließender Infektion mit *P. aeruginosa* besteht, wurde gezeigt, dass die fehlende Neubildung von neutrophilen Granulozyten durch eine gestörte Differenzierung von CD34<sup>+</sup>HSC im Knochenmark in myeloide Vorläuferzellen bedingt ist [170].

Eine starke Infektion leitet in kurzer Zeit die sogenannte Notfall-Myelopoese (*emergency myelopoiesis*) ein und führt zur schnellen Neubildung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Das Verhältnis von lymphoiden Vorläufern zu myeloiden Vorläufern verschiebt sich dabei zugunsten der Myelopoese [222, 223]. Durch die Sepsis-assoziierte Störung der HSC-Differenzierung entsteht dabei eine große Zahl unreifer Differenzierungsstufen, unter anderem die Gruppe der GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloiden Vorläufer. Diese lassen sich im späten Verlauf der murinen Sepsis in großer Zahl in Knochenmark, Milz und Lymphknoten nachweisen [47]. Sie besitzen die Fähigkeit T-Zellen in ihrer Immunantwort zu supprimieren und induzieren den Wechsel der Differenzierung von CD4<sup>+</sup>T-Zellen von T<sub>H</sub>1 zu T<sub>H</sub>2. Auf Grund dieser Fähigkeit werden sie als aus der myeloiden-Reihe entstammende Suppressor-Zellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) bezeichnet [47]. Die Akkumulation dieser Zellen ist unter anderem von den Zytokinen IL-1 und IL-6, PGE und den pro-inflammatorischen S100-Proteinen abhängig [152, 179]. MDSC aus septischen Mäusen lassen sich im Vergleich zu GR1<sup>+</sup>Zellen von Kontrolltieren *in vitro* leicht in DC und Makrophagen differenzieren, was sie weiterhin als unreife myeloide Vorläuferzellen charakterisiert. Diese Fähigkeit scheint jedoch *in vivo* unterdrückt zu sein [47]. Die starke Akkumulation von MDSC im Knochenmark findet erst in der späten Phase der Sepsis statt. Vierundzwanzig Stunden nach CLP findet man dagegen eine verminderte Zahl Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MDSC im Knochenmark im Vergleich zu Kontrolltieren. Dies und der zeitgleich starke Anstieg von neutrophilen Granulozyten im Blut, deuten darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt noch die Fähigkeit einer intakten Myelopoese besteht [47].

Die Ursache der gestörten HSC-Differenzierung während Sepsis ist noch unklar.

## 1.5 Zielsetzung

Sepsis gehört zu den schwerwiegenden Komplikationen auf Intensivstationen und führt selbst nach Überstehen der primären Infektion zur langandauernden, gesteigerten Empfänglichkeit für nosokomiale Infektionen. Ein stark ausgeprägter initialer Sturm pro-inflammatorischer, sowie anti-inflammatorischer Mediatoren und die Apoptose diverser Immunzellen führen dabei zu einer chronischen Anergie des Immunsystems.

Für DC konnte, mit Hilfe des CLP-Modells gezeigt werden, dass nach Überstehen der initialen Infektion eine veränderte DC Differenzierung im Knochenmark vorliegt. *De novo* differenzierte DC sind nicht in der Lage, eine potente Stimulation des adaptiven Immunsystems zu induzieren und können diese Dysfunktion auf naive Tiere übertragen. Dies führt dazu, dass eine Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* nicht effektiv bekämpft werden kann [155]. In der Frühphase der Sepsis kommt es zu einer Modulation der Hämatopoese. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass residente CD11c<sup>+</sup>Zellen im Knochenmark Einfluss auf die *de novo* Differenzierung von DC haben [155].

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, frühe zelluläre Veränderungen des Knochenmarks während der akuten Phase der Sepsis und vor allem den Einfluss residenter CD11c<sup>+</sup> DC im Knochenmark auf die *de novo* Differenzierung von DC zu untersuchen. Der Phänotyp residenter DC im Knochenmark und ihr Bezug zu peripheren lymphoiden Organen, wie der Milz und den Lymphknoten sollen dabei näher charakterisiert werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien, wie Reaktionsgefäße, Zellkulturplatten, Petrischalen, Objektträger, serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Einmalspritzen, Kanülen und Zellsiebe wurden von den Firmen BD Medical (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner bio-one GmbH (Frickenhäuser), Starlab Deutschland GmbH (Hamburg), Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und Sysmex Partec GmbH (Görlitz) bezogen.

### 2.2 Laborgeräte

Für alle Arbeitsschritte wurden die unter Tabelle 2.2.1 aufgeführten Geräte verwendet.

**Tabelle 2.2.1 Geräteverzeichnis**

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Auflichtmikroskop AxioStar plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axio Imager.M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
CO <sub>2</sub> Inkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
CO <sub>2</sub> Inkubator INCOmed	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Durchflusszytometer FACSCalibur®	BD, Heidelberg
FACS-Sorter FACS Aria II	BD, Heidelberg
Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Werkbank antair BSK	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Werkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge Heraeus Varifuge 3.0RS	Thermo Scientific™, Schwerte
Zentrifuge Heraeus BIOFUGE fresco	Thermo Scientific™, Schwerte
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific™, Schwerte
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Cytozentrifuge Cytospin™ 4	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse“ und, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen. Das zur Desinfektion verwendete 70 %ige Ethanol wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums Essen bezogen.

### 2.3.1 Reagenzien

In folgender Tabelle (2.3.1.1) sind alle Reagenzien aufgeführt, die zur Isolierung, Kultivierung und Stimulierung von Zellen, sowie zur *in vivo* Behandlung von Versuchstieren verwendet wurden.

**Tabelle 2.3.1.1 Reagenzien, Stimuli, Bakterien**

Reagenz	Bezugsquelle
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Collagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (rmGM-CSF)	R&D Systems, Wiesbaden
FTY720 (Fingolimod®)	LC Labs, Woburn [147]
Stimulus	Bezugsquelle
CpG-Oligonukleotide (Sequenz: T*C*C*ATGACGTTCCCTGAT*G*C*T)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Bakterien	Stamm
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853

### 2.3.2 Serum

Als Medienzusatz und Bestandteil des ELISA-Blockpuffers wurde fötales Kälberserum (FCS) der Firma Biochrom GmbH [184] verwendet. Der Endotoxingehalt des FCS lag unter 1,00 EU/ml. Für alle Versuche innerhalb dieser Arbeit wurde nach vorheriger Austestung nur eine bestimmte FCS-Charge

eingesetzt. Vor Gebrauch wurde das Serum durch Erwärmung für 30 min auf 56°C inaktiviert und nach Erkalten folgte eine Zentrifugation (4000 g, 10 min) zur Entfernung von Sedimenten.

### 2.3.3 Pufferlösungen

Zum Ansetzen der Pufferlösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, die Chemikalien der unter 2.3 angegeben Firmen verwendet. Als Lösungsmittel wurde entionisiertes Wasser aus der hauseigenen Anlage, selbst angesetztes PBS (*Phosphat-buffered Saline*) oder Aqua B. Braun (Braun, Melsungen) verwendet. Das in der Zellkultur verwendete PBS wurde von Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen und besaß geringe Endotoxinwerte ( $\leq 1$  EU ml). Die Pufferlösungen, die Anwendung in der Zellkultur fanden, wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert

**Tabelle 2.3.3.1 Verwendete Lösungen und Puffer**

Lösung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Cellwash <sup>®</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Foxp3 Staining Buffer Set</i> <sup>®</sup>	eBioscience, Frankfurt
EDTA	250 mM Stocklösung
ELISA-Blockpuffer	1 % FCS in PBS
ELISA-Waschpuffer	D-PBS + 0,05 % Tween 20, Serva,
TMB Substrate Reagent Set <sup>®</sup>	BD OptEIATM, BD Biosciences, Heidelberg
D-PBS (für ELISA)	1,5 M NaCl, 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 27,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max <sup>™</sup>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	70 % v/ v, Apotheke Universitätsklinikum Essen
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	100 % v/ v, Abbott, Wiesbaden
Trypanblaulösung	0,4 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Lösung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Physiologische NaCl-Lösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Paracarp® 50 mg/ml Injektionslösung	IDT Biologika, Dessau
Giemsa-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
20 %ige 2-Hydroxypropylpropyl- β-cyclodextrin-Lösung (2-HPCD)	PanReac AppliChem, Gatersleben

### 2.3.4 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente für alle Zellkulturen *very low endotoxin medium*, VLE RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin der Firma Biochrom GmbH [184]. Als endotoxinfreie Zusätze waren zudem 10 mM HEPES (Biochrom, Berlin), 0,06 mg/ml Penicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 0,02 mg/ml Gentamicin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 0,05 mM β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Taufkirchen) enthalten. Dem Kulturmedium wurden 10 % Hitze-inaktiviertes FCS zugesetzt.

### 2.3.5 Kulturmedium für Bakterien

Als Nährmedium für die Kultivierung von *P. aeruginosa* wurde *Tryptic-Soy-Agar* (TSA) verwendet. Dieses setzt sich aus *tryptic soy broth* (Tryptic-Soja-Bouillon, TSB) von Bacto™ (BD, Heidelberg) und Agar von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) zusammen. Für die Herstellung der TSA-Platten wurden 10,5 g TSB zusammen mit 5,2 g Agar und 350 ml destilliertem H<sub>2</sub>O vermischt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Hiervon wurden je 10 ml in sterile Petrischalen gegossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Trypticase™ Soy Agar Medium (BD, Heidelberg) wurde für die Anzucht der Bakterien verwendet.

## 2.4 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Zur Analyse von zellspezifischen Oberflächenmolekülen und eines intrazellulären Proliferationsmarker mittels Durchflusszytometrie wurden Antikörper in verschiedenen Kombinationen verwendet. Bezogen wurden die Antikörper von BD Biosciences (Heidelberg) und eBiosciences (Frankfurt am Main). In unten stehender Tabelle (Tab. 2.4.1) sind Bezugsquelle, Farbstoffkonjugation, Klon, sowie, falls verwendet, die entsprechende Isotyp-Kontrolle aufgeführt.

**Tabelle 2.4 1 Antikörperverzeichnis**

Konjugat	Antikörper- spezifität	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
FITC	CD3e	145-2C11	BD Biosciences	
	CD4	RM4-5	BD Biosciences	
	CD40	HM40-3	BD Biosciences	Arm. Hamster IgG <sub>1</sub> ,
	CD172a/SIRPα	P84	BD Biosciences	κ
	E-Cadherin I-A/I-36/E-Cadherin		BD Biosciences	Rat IgG <sub>1</sub> , κ
	E (MHCII)	2G9	BD Biosciences	Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ
	Ly6C	AL-21	BD Biosciences	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ Rat IgM, κ
PE	CD4	RM4-5	BD Biosciences	
	CD45R/B220	RA3-6B2	BD Biosciences	
	CD86	GL1	BD Biosciences	RatIgG <sub>2a</sub> , κ
	Ki-67	SolA15	eBioscience	IgG <sub>2a</sub> , κ
	Ly6G	1A8	BD Biosciences	
PerCPCy5.5	CD11b	M1/70	BD Biosciences	
	I-A/I-E (MHCII)	M5/114	BD Biosciences	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ
APC	CD11c	N418	eBioscience	Arm. Hamster IgG
	CD49b	DX5	eBioscience	
unkonjugiert	CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)	2.4G2	BD Biosciences	

## 2.5 Kommerzielle Standardtests

Die unten angegebenen Test-kits wurden von der Firma R&D Systems (Wiesbaden) verwendet und entsprechend Herstellerangaben durchgeführt.

*Mouse IL-12 p70 ELISA DuoSet*

*Mouse IL-10 ELISA DuoSet*

*Mouse IFN-γ ELISA DuoSet*

*Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit*

### 3. Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Operationsmethoden

##### 3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Mäuse vom Stamm BALB/c von Harlan Laboratorie (Borchen) bezogen, sowie die transgenen Stämme TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR2/4<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup> aus eigener Zucht verwendet. Alle Arbeiten mit diesen Tieren erfolgten unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 1, entsprechend der Gentechnik-Sicherheitsverordnung. Vor Versuchsbeginn hatten die von Harlan bezogenen Tiere eine Woche Zeit, sich im zentralen Tierlaboratorium zu äquilibrieren. Bei Versuchsbeginn hatten alle Tiere ein Alter von sieben bis zwölf Wochen und ein Gewicht von 20 bis 26 g erreicht. Die Versuchstiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen gehalten und hatten Zugang zu Standard-Nager-Futter und Wasser *ad libitum*. Alle chirurgischen Eingriffe erfolgten nach entsprechender Fachkunde unter sterilen Bedingungen.

##### 3.1.2 Operationsmethoden

###### 3.1.2.1 Zökale Ligation und Punktion als Modell der polymikrobiellen Sepsis

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis erfolgte nach Anwendung des abgewandelten Modells, der von der Arbeitsgruppe um Chaudry [240] entwickelten *Cecal Ligation and Puncture* (CLP). Dieses Modell führt durch Ligatur und anschließende Punktion des Blinddarms zu einer raschen Peritonitis resultierend in einer Sepsis. Ausgelöst wird dies durch den Austritt einer standardisierten Menge von Bakterien-beinhaltendem Darminhalt in die Bauchhöhle. Der Schweregrad der Sepsis ist dabei Abhängig von der Länge des abgebundenen Blinddarmabschnitts und der Größe und Anzahl der Punktionen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten polymikrobiellen Sepsis handelte es sich um eine subletale Form, bei der der Großteil der Versuchstiere einen Zeitraum von vier Tagen (96 Stunden) nach Operation überleben soll.

Die Sepsisinduktion wurde, wenn nicht anders angegeben, an weiblichen, sieben bis zwölf Wochen alten, BALB/c Mäusen durchgeführt. Nach Betäubung der Versuchstiere mit einer frisch angesetzten Narkose-Lösung, aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (CEVA Sante Animale, Düsseldorf) und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin (CEVA Sante Animale, Düsseldorf), welche *i.m.*, nach vorheriger

Inhalationsnarkose mit Isofluran, in den Vorderlauf der Tiere verabreicht wurde, erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde nach Desinfektion des Bauchbereichs mit einer Schere die Haut der Versuchstiere im mittleren Bauchbereich auf einer Länge von ca. einem Zentimeter unterhalb des Sternums aufgeschnitten und anschließend entlang der *linea alba* ein Bauchschnitt (Laparotomie) durchgeführt. Nach Freilegen des Zökums wurde ca. ein Zentimeter des distalen Endes mit 5-0 nicht-resorbierbarem chirurgischen Nahtmaterial von Ethicon (Norderstedt) ligiert. Der abgebundene Bereich des Zökums wurde mit einer 27-Gauge Nadel (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) punktiert und eine Menge von ca. 5 µl Darminhalt herausgepresst. Das Zökum, samt Darminhalt wurden anschließend vorsichtig in die Bauchhöhle zurück verlagert und der Flüssigkeitshaushalt des Versuchstieres durch Gabe von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung in den Bauchraum rekonstituiert. Anschließend wurden Peritoneum und Haut in zwei Schichten mittels 5-0 Nahtmaterial verschlossen.

Als Kontrollgruppe wurden Tiere der gleichen Operation ohne Ligatur und Punktion des Zökums unterzogen. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Aufwachphase der Tiere durch Wärmezufuhr von einer Wärmeplatte mit 37°C unterstützt und die Tiere in den folgenden maximal 96 Stunden intensiv, mindestens zweimal am Tag kontrolliert. Die Letalität lag bei 25 % nach CLP und 0 % nach Sham-Operation innerhalb der ersten 72 Stunden nach Operation.

### **3.1.2.2 Splenektomie**

Um den Einfluss der Milz auf die Entwicklung der polymikrobiellen Sepsis zu untersuchen wurde diese vor Sepsisinduktion bei sieben bis acht Wochen alten Tieren chirurgisch entfernt. Nach bereits beschriebener Narkoseeinleitung wurde ein Schnitt auf der linken Seite des Tieres, auf Höhe der Milz, von etwa einem Zentimeter Länge vorgenommen. Nach Freilegen der Milz und gebündelter Ligatur der angeschlossenen Blutgefäße mit 5-0 Nahtmaterial wurde die Milz distal der Ligaturen abgetrennt und entfernt. Nach optischer Vergewisserung, dass keine Blutungen vorlagen, wurden die Tiere mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung rekonstituiert und die Wunde in zwei Schichten mit 5-0 Nahtmaterial verschlossen. Zur Schmerzlinderung wurden 4 mg/kg Körpergewicht Paracarp® (IDT Biologika, Dessau) direkt nach Operation und einen Tag später *sub cutan* (s.c.) verabreicht. Nach einer Erholungsphase von drei bis vier Wochen wurden die Tiere für weitere Versuche eingesetzt.

### **3.1.2.3 Adenektomie der mesenterialen Lymphknoten**

In Kooperation mit Dr. Manuela Büttner (Zentrum Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover) wurde eine Adenektomie der mesenterialen Lymphknoten an sieben bis acht Wochen alten Tieren durchgeführt. Die Entfernung der mesenterialen Lymphknoten erfolgte analog zur Splenektomie, jedoch mit einem Bauchschnitt von 1,5 cm Länge. Nach Exposition des Dickdarms samt Mesenterium wurden die mesenterialen Lymphknoten vorsichtig mit einer spitzen Pinzette entfernt und das Mesenterium anschließend vorsichtig zurück verlagert. Durch Gabe von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung in den Bauchraum wurden die Tiere rekonstituiert. Anschließend wurden Peritoneum und Haut in zwei Schichten mittels 5-0 Nahtmaterial verschlossen und die Tiere analog zur Splenektomie mit Paracarp® behandelt.

### **3.1.3 *P. aeruginosa* Infektion**

#### **3.1.3.1 Bakterienanzucht**

Alle Arbeitsschritte mit lebenden Bakterien wurden unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die verwendeten *P. aeruginosa* wurden vor jeder Infektion frisch vermehrt, um eine ausreichende Menge und Aktivität gewährleisten zu können. Hierzu wurden die Bakterien am Tag vor der Infektion für ungefähr 16 Stunden auf TSA-Platten bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Vermehrung der Bakterien wurde eine Impföse mit Bakterien in warmem TSB überführt und bei 37°C, im Wärmeschrank, für eine Stunde kultiviert. Während der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien erfolgte das Ernten der *P. aeruginosa* durch Zentrifugation (1600 g, 10 min) der Bakterienlösung. Nach dem Resuspendieren in RPMI-Medium (Gibco®, Invitrogen, Darmstadt) wurde die Bakterienzahl photometrisch mit Hilfe der Absorption der Bakterien-Lösung bei 570 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entsprach dabei einer Bakterienzahl von  $1 \times 10^9$ /ml. Mit RPMI wurde nach zweimaligem Waschen die gewünschte Bakterienmenge eingestellt.

#### **3.1.3.2 Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa***

Naive Versuchstiere des Stamms BALB/c wurden mit  $5 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten (*Colony-Forming Units*, CFU) *intra nasal* (i.n.) infiziert. Hierzu wurden die Mäuse durch eine Isoflurannarkose kurz betäubt und die *P. aeruginosa* Bakterien in einem Volumen von 10 µl mit Hilfe einer Mikropipette rasch in ein Nasenloch

pipettiert. Mittels Nackengriff wurden die Tiere dabei in aufrechter Position gehalten, bis sie das Bewusstsein wieder erlangten, um die vollständige Flüssigkeitsaufnahme zu gewährleisten.

### **3.1.3.3 Bestimmungen der bakteriellen Beladung der Lungen**

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa* wurden die Lungen unter sterilen Bedingungen und Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 entnommen (s. 3.2.4) Die Lungen wurden anschließend mittels Duall Homogenisators mit Glaspistill in 1 ml PBS homogenisiert.

Hundert µl des Homogenisats wurden anschließend für 10 min unter Zugabe von 5 mg/ml Saponin lysiert, um intrazelluläre Bakterien freizusetzen. Durch die Zugabe von 900 µl kaltem PBS wurde die Reaktion gestoppt und 1 ml einer 1:10 Verdünnung des Lungenhomogenisates hergestellt. Nach serieller Verdünnung in 10er-Schritten wurden die Lungenhomogenisate auf TSA-Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die sich bildenden Kolonien ausgezählt.

## **3.2 Organentnahme, Isolierung und Kultivierung verschiedener Zelltypen**

Soweit nicht anders angegeben wurden die Tiere vor Organentnahme nach kurzer Inhalationsnarkose mit Isofluran, mittels Genickbruch getötet. Die Isolierung und Kultivierung primärer Mauszellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium mit 10 % FCS. Soweit möglich, wurden die präparierten und isolierten Zellen und Gewebe zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gekühlt. Die Zellzahlbestimmung nach Aufarbeitung aller Zellsuspensionen erfolgte nach 1:10 Verdünnung mit TrypanBlau (Sigma-Aldrich) mittels Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde sichergestellt, dass die Zahl der toten Zellen, hierbei blau gefärbt, unter 5 % lag. Die Inkubation aller Zellkulturen erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre (95 %) bei 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und bei 37°C im Brutschrank.

### **3.2.1 Gewinnung von Blut mittels Herzpunktion**

Unter Isofluran-Narkose wurden zwischen 700-1000 µl Blut mittels Herzpunktion mit einer heparinisierten 1 ml Spritze mit 20-Gauge Nadel isoliert und in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Jeweils 100 µl pro Tier wurden für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

### 3.2.2 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen

Die Isolation von Knochenmarkzellen (*bone marrow cells*, BMC) erfolgte aus Femur und Tibia der Hinterbeine der Tiere. Dazu wurden diese durch Durchtrennen der Gelenke von Hüfte und Fuß getrennt und von Fell und Muskelgewebe frei präpariert. Nach Eröffnung der Gelenkköpfe mittels einer Schere wurde das Knochenmark mit Hilfe einer mit Medium gefüllten Spritze mit 27-Gauge Nadel aus dem Knochen gespült. Zum vereinzeln des Knochenmarks wurde die Zellsuspension mit einer Spritze mit 23-Gauge Nadel mehrfach aufgezogen und anschließend durch einen 30 µm Zellfilter in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt.

Zur *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen (*bone marrow derived Dendritic Cells*, BMDC) wurden die BMC für sieben bis zehn Tage mit 20 ng/ml rmGM-CSF zunächst in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  BMC in 10 ml Kulturmedium im Brutschrank kultiviert. Nach drei bzw. sieben Tagen erfolgte die Zugabe von 10 ml frischem Kulturmedium mit 20 ng/ml rmGM-CSF. Nach Ernten der nicht adherenten Zellen wurde die Reifung der BMDC mittels durchflusszytometrischer Messung des Anteils der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Der Anteil CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> reifer BMDC betrug mindestens 65 %. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  BMDC in 200 µl Kulturmedium mit 20 ng/ml rmGM-CSF mit und ohne 5 µg/ml CpG stimuliert und im Brutschrank für 18 Stunden inkubiert.

#### 3.2.2.1 Aufreinigung CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> Zellen mittels Zellsortierung

Nach Isolation der Knochenmarkzellen wurden diese in PBS für die Zellkultur (2 % FCS) mit den fluoreszenzmarkierten Farbstoffen I-A/I-E FITC, CD4 PE und CD11c APC 15 min bei 4°C gefärbt. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation und Resuspension in PBS) wurden  $1 \times 10^7$  BMC in 1 ml PBS aufgenommen und mittels Zellsortierung am FACS-Sorter mit 70 µm Düse die CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> Zellen sortiert. Beide Fraktionen, sowohl positive, als auch negative Fraktion wurden weiter verwendet. Die negative Fraktion wurde, wie in 3.2.2 beschrieben über sieben bis zehn Tage mit rmGM-CSF kultiviert.

### 3.2.2.2 Cytospinpräparate CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> Knochenmarkzellen und Giemsa-Färbung

Nach positiver Zellsortierung CD4<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> Zellen aus dem Knochenmark wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen mittels Cytospin-Zentrifuge (5 min, 400 RPM) auf Objektträger gebracht und diese mittels eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) fixiert. Für 5 min wurden die so fixierten Präparate in Giemsa-Lösung getaucht und anschließend mit destilliertem Wasser vorsichtig gespült, um überschüssiges Färbereagenz zu entfernen.

Die Giemsa-Färbung ist eine modifizierte Romanowsky-Färbung, mittels Azur-Eosin-Methylenblaulösung. Durch Komplexbildung der DNA erscheinen hierbei Zellkerne purpur-farbend bis violett, wobei das Cytoplasma blau gefärbt ist. Die Aufnahmen der Cytospin-Präparate wurden mittels Durchlichtmikroskop *Axio Imager.M2* bei 20-facher Vergrößerung angefertigt.

### 3.2.3 Isolierung und Kultivierung von Milzzellen

Die Milz wurde nach Eröffnung der linken Bauchseite mit einer stumpfen Pinzette aus dem Tier präpariert und mit ca. 2 ml Collagenase D Lösung (400 ng/ml) für 18 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Durchreiben der Milz durch ein 70 µm Zellsieb in einer Petrischale mit 10 ml Kulturmedium und 5 mM EDTA wurde die Zellsuspension durch einen 30 µm Filter in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation (400 g, 6 min, 4°C) wurde das entstandene Zellpellet zur Lyse der Erythrozyten in 2 ml *Red Blood Cell Lysing Buffer* (Sigma) resuspendiert und für etwa eine Minute inkubiert. Die Lyse wurde mit Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt und die Milzzellen erneut zentrifugiert und anschließend in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. In einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen in 200 µl Kulturmedium wurden die TSC mit und ohne 5 µg/ml CpG für 18 Stunden im Brutschrank kultiviert.

### 3.2.4 Isolierung von Lymphknotenzellen aus den mesenterialen Lymphknoten

Die Präparation der mesenterialen Lymphknoten erfolgte nach Eröffnung des Bauchraums, indem diese nach Entfernen des umliegenden Gewebes mit spitzen Pinzetten vom Mesenterium abgetrennt wurden. Nach vorsichtigem Durchreiben durch ein 70 µm Zellsieb in 3 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension der Lymphknotenzellen durch einen 30 µm Filter in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt.

### **3.2.5 Isolierung von Lungenzellen**

Vor Präparation wurde die Lunge mit 5 ml kaltem PBS über Injektion in die rechte Herzkammer perfundiert. Anschließend wurden die Lungenlappen herausgelöst, in ein 15 ml PP-Röhrchen gefüllt mit 3 ml Collagenase P-Lösung (100 mM) für 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch kräftiges Schütteln homogenisiert und zunächst durch einen 70 µm Filter, in ein 50 ml PP-Röhrchen und anschließend durch einen 30 µm Filter, in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach sofortiger Zentrifugation (400 g für 6 min bei 4°C) wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

## **3.3 Versuchsverlauf und Applikationen**

### **3.3.1 Untersuchung der Zellzusammensetzung des Knochenmarks und sekundärer lymphoider Organe während Sepsis**

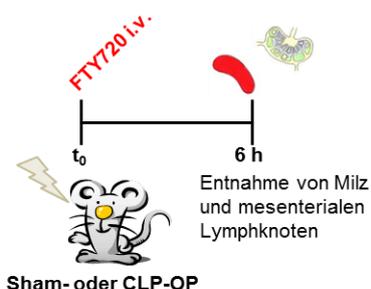
Zwischen drei und 96 Stunden nach Sepsisinduktion, oder entsprechender Sham-OP, wurden Knochenmark, Milz, mesenteriale Lymphknoten, Lunge und Blut isoliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Diese Analysen wurden zudem 24 Stunden nach Sepsisinduktion unter Verwendung verschiedener Mausstämme (3.1.1) durchgeführt. Aus dem Knochenmark generierte BMDC, sowie Milzzellen wurden auf ihre Zytokinproduktion nach Übernachtstimulation mit dem bakteriellen Bestandteil CpG hin untersucht.

### **3.3.2 Einfluss lymphoider Organe auf die Zellverteilung während Sepsis**

Vier Wochen vor Sepsisinduktion oder Sham-OP wurden entweder die Milz durch Splenektomie, oder die mesenterialen Lymphknoten durch Adenektomie entfernt. Sechsenddreißig Stunden nach CLP- oder Sham-OP wurde das Knochenmark und im Falle der Adenektomie auch die Milz durchflusszytometrisch analysiert.

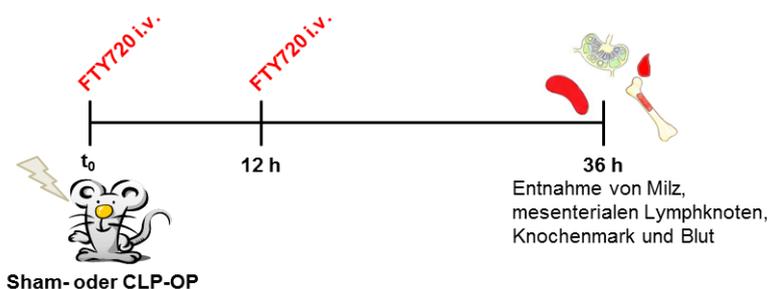
### 3.3.3 Blockade der Sphingosin-1-Phosphat-abhängigen Migration von Leukozyten

Zur Blockade der S1PR1, 3, 4 und 5 *in vivo* wurden den Versuchstieren kurz vor Operation (OP) 2 mg/kg Körpergewicht FTY720, oder die entsprechende Lösemittelkontrolle (20 %ige 2-Hydroxypropylpropyl- $\beta$ -cyclodextrin-Lösung (2-HPCD)) *intravenös (i.v.)* appliziert.



**Abbildung 3.1** Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Einflüsse in der frühen Phase der Sepsis (6 Stunden nach CLP).

Die FTY720-Gabe wurde nach zwölf Stunden wiederholt, sofern das Versuchsende 36 Stunden nach Sepsisinduktion war.



**Abbildung 3.2** Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Effekte in der akuten Phase der Sepsis (36 Stunden nach CLP).

Zur Untersuchung des postseptischen Einflusses der S1P-Blockade vier Tage nach CLP- oder Sham-OP wurden die Versuchstiere jedoch erst 24 Stunden nach Sepsisinduktion oder Sham-OP ein zweites Mal behandelt. FTY720 ist ein synthetisches Analogon des S1P mit stärkerer Affinität zu seinen entsprechenden Rezeptoren. Unter physiologischen Bedingungen wird FTY720 phosphoryliert und verstärkt so seine biologische Eigenschaft. Die Bindung von FTY720 an S1PR führt zum schnellen Abbau des Rezeptors [23].

### 3.3.4 Einfluss von FTY720 auf die Vermittlung der postseptischen Immunsuppression bei *P. aeruginosa* Infektion

Vier Tage nach Sepsisinduktion und Behandlung mit FTY720, oder der entsprechenden Lösemittelkontrolle, wurden BMDC über sieben bis zehn Tage aus dem Knochenmark generiert. Diese BMDC ( $1 \times 10^6$ ) wurden zusammen mit  $5 \times 10^8$  CFU *P. aeruginosa* i.n. in naive BALB/c injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen isoliert und die bakterielle Beladung bestimmt.

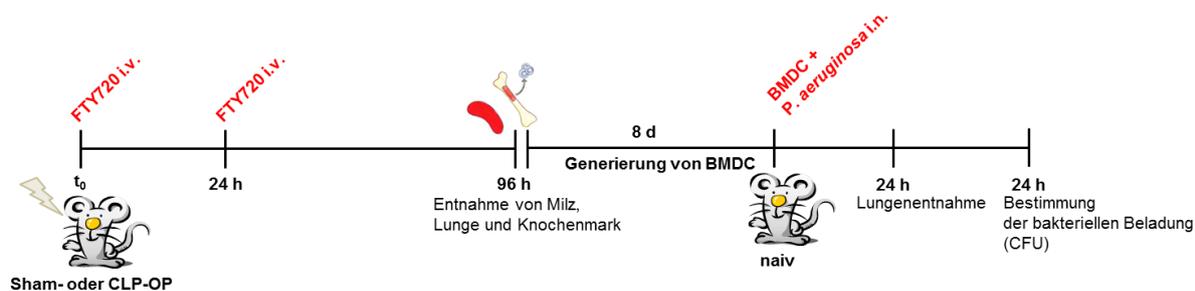


Abbildung 3.3 Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Effekte auf die Entwicklung der postseptischen DC-Dysfunktion (vier Tage nach CLP).

## 3.4 Durchflusszytometrische Analysen

### 3.4.1 Prinzip und Methode der Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden isolierte und kultivierte Zellen bezüglich der Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen analysiert und charakterisiert. Hierbei werden Zellen mit spezifischen, mit Fluoreszenzfarbstoff-beladenen Antikörpern markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt. Entsprechende Lichtstreuungseigenschaften und emittierte Lichtstrahlungen werden zeitgleich über geeignete Detektoren elektronisch erfasst und quantifiziert.

Je nach Größe der Zelle, Beschaffenheit der Zellmembran, des Kerns und der granulären Bestandteile im Inneren der Zelle, variieren die Lichtstreuungseigenschaften. Das *Forward-scattered light* (FSC) wird bestimmt durch die größenabhängige Lichtbeugung durch die Zelle. Das *Side-scattered light* [21] wird durch Brechen und Reflexion des Lichtstrahls an den Grenzflächen der Zelle erzeugt. Durch das Laserlicht angeregte Fluorochrome geben ein charakteristisches Lichtsignal ab, welches von spezifischen Detektoren erfasst und quantifiziert werden kann. Die Intensität des, durch ein Fluorochrom emittierten Lichts, ist dabei proportional zur Menge des entsprechenden, auf der Zelle geladenen fluorochromen

Antikörpers. Für die Durchflusszytometrischen Analysen innerhalb dieser Arbeit wurde ein FACS-Calibur verwendet, welches vier verschiedene Fluoreszenzbereiche mit zwei Lasern messen kann. Die Wellenlängenbereiche, in denen die verwendeten Farbstoffe ihre Emissionsmaxima besitzen, unterscheiden sich voneinander, so dass die Emissionen von verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen (FL-1 bis FL-4) erfasst werden können. Die detektierten Lichtsignale werden elektronisch erfasst und graphisch mit Hilfe von zweidimensionalen Punkt-Diagrammen, sogenannten Dot-Plots, dargestellt und quantifiziert. Zur Auswertung diente das Programm *Cell Quest Pro™* (BD Biosciences).

### **3.4.2 Markierung von Zelloberflächenmolekülen**

Für die Markierung von Molekülen auf den Oberflächen von Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 96-well Rundbodenplatte transferiert und bei 400 g (1500 rpm) und 4°C für 6 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment durch leichtes Schütteln (30 sec bei 500 rpm) gelöst. Um das unspezifische Binden von Antikörpern zu blockieren, wurde die Zellsuspension in 50 µl Cellwash® resuspendiert, welches 5 µg/ml Fcγ III/II Rezeptor enthielt. Die Inkubationszeit des Blockens betrug 6 min und wurde bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung der spezifischen Oberflächenmoleküle durch die Zugabe der entsprechenden Mengen an Antikörpern oder entsprechender Isotyp-Kontrollen (siehe Tabelle 2.4.1) ebenfalls in einem Volumen von 50 µl Cellwash®. Nach einer Inkubationszeit von 12 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Cellwash® und Zentrifugation bei 400 g (1500 rpm) für 6 min bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 200 µl Cellwash® aufgenommen. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte nach Transfer der Zellen in 5 ml Rundbodenröhrchen, in einem Endvolumen von 250 µl, mit einem FACS Calibur™.

### **3.4.3 Intrazelluläre Bestimmung des Proliferationsmarkern Ki-67**

Ki-67 ist ein Protein, das in alle sich teilenden Zellen nachweisbar ist. Da es in allen aktiven Phasen des Zellzyklus ( $G_1$ , S,  $G_2$  und M-Phase), aber nicht in der  $G_0$ -Phase ruhender Zellen zu finden ist, eignet es sich gut für den Nachweis der Proliferation [204]. Nach Isolation wurden  $1 \times 10^6$  Knochenmarkzellen in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und die Oberflächenmoleküle, nach bereits

beschriebenem Protokoll, gefärbt. Zur intrazellulären Bestimmung der Ki-67-Expression wurden die Zellen anschließend unter Anwendung des *Foxp3 Staining Buffer Sets* (ebioscience) mit 150 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Diese Lösung enthält Paraformaldehyd zur Fixierung der Zellen und Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembranen und des Zellkerns. Durch diesen Schritt werden die Zellen durchlässig für den zur intrazellulären Färbung verwendeten Antikörper. Nach Zentrifugation der Zellen bei 400 g für 6 min bei 4°C folgte ein Waschschriff mit 200 µl Permeabilisierungspuffer, der ebenfalls Saponin enthält. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen für 15 min bei 4°C im Dunkeln mit der jeweils titrierten Menge an fluoreszenzmarkierten Antikörpern in 100 µl Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit Permeabilisierungspuffer, wurden diese in 200 µl Cellwash aufgenommen. Hierdurch wurde das Schließen der Zellmembran erreicht. Nach Überführen der Zellen in 5 ml Rundbodenröhrchen wurden die Messdaten in einem Totalvolumen von 250 µl mit Hilfe eines FACSCalibur™ erfasst.

### **3.5 Nachweis löslicher Moleküle in Zellkultur-Überständen mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* [231]**

Zur Detektion und quantitativen Bestimmung löslicher Mediatoren in Zellkulturüberständen wurden *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* [231] durchgeführt. Erstmals beschrieben wurde diese Methode ELISA von Engvall und Perlman, die im Jahr 1971 den *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* zur quantitativen Bestimmung von Immunglobulin G einsetzten. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um das Prinzip der so genannten Sandwich-Technik. Dieses Verfahren gehört zu den nicht-kompetitiven ELISA-Methoden. Der Boden einer 96-well Flachboden-Mikrotiterplatte wird zunächst mit einem analytspezifischen monoklonalen Antikörper, auch *Capture-Antibody* oder Primärantikörper genannt, auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Kunststoff beladen. Noch unbeschichtete Flächen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden durch Zugabe einer Lösung aus verdünntem Serum (1 % FCS) blockiert um unspezifische Bindungen des zu untersuchenden Analyts während der nachfolgenden Inkubationsphase zu verhindern. Die anschließende Inkubation mit dem so genannten *Detection-Antibody*, oder Sekundärantikörper komplexiert das Analyt zwischen den beiden Antikörpern wie in einem Sandwich. Der Sekundärantikörper bindet dabei ein anderes Antigen als der Primärantikörper und trägt zudem eine

biotinylierte Seite, die das Binden eines Enzym-Konjugats möglich macht. Das Enzym *Horseradish-Peroxidase* (HRP) setzt bei Raumtemperatur das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um, was zu einer Farbentwicklung führt, die, nach Stoppen durch Absenken des pH Werts mit Schwefelsäure, photometrisch messbar und proportional zur Menge des gebundenen Analyts ist.

### **3.5.1 Nachweis von Zytokinen in Zellkulturüberständen**

Nach Übernachtsstimulation mit dem bakteriellen Stimulus CpG wurden die Überstände der Zellkulturen des Knochenmarks bezüglich der Zytokine IL-10 und IL-12 mit Hilfe der entsprechenden *Maus ELISA DuoSets* analysiert. Nach Übernachtskultur der Milzzellen wurde in den Überständen das Zytokin IFN- $\gamma$  unter Verwendung des entsprechenden *Maus ELISA DuoSets* bestimmt. Für alle ELISA wurden 96-well MaxiSorp<sup>®</sup> Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) verwendet. Die Durchführung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben. Zur Messung der Farbintensität wurde der Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808 mit der Software Microwin2000 verwendet.

### **3.5.2 Nachweis von Prostaglandin-E<sub>2</sub> in Knochenmarklavage**

Nach Durchspülen der Knochen wurde die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (400 g, 6 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und für weitere Untersuchungen verwendet. Der Nachweis von Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in der so gewonnenen Lavage des Knochenmarks wurde mit Hilfe des *Prostaglandin E<sub>2</sub> Parameter Assay Kits* der Firma R & D Systems (Wiesbaden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um eine kompetitive Form der ELISA-Technik zur quantitativen Bestimmung von PGE<sub>2</sub> in biologischen Flüssigkeiten. Hierbei konkurrieren Konjugate aus synthetisch hergestelltem PGE<sub>2</sub> und einer *Horseradish Peroxidase* (HRP) mit dem in Zellkultur-Proben vorliegenden PGE<sub>2</sub> um Bindungsstellen an monoklonalen Antikörpern. Hierzu wird die zu analysierende Probe zeitgleich mit einer bestimmten Menge an PGE<sub>2</sub>-HRP-Konjugaten und dem entsprechenden monoklonalen Antikörper für PGE<sub>2</sub> inkubiert. Dieser Antikörper wird seinerseits von Antikörper gebunden, die am Plattenboden haften und so immobilisiert. Die anschließende Farbreaktion, entstehend aus dem Umsatz eines Substrats durch gebundenes HRP, ist photometrisch messbar und ist indirekt proportional zur Konzentration des PGE<sub>2</sub> in den Proben oder des mitgeführten Standards. Die Abschwächung der Farbreaktion

gilt als Indikator für eine hohe Konzentration an PGE<sub>2</sub>, da hierbei das PGE<sub>2</sub> aus den Proben die enzymmarkierten PGE<sub>2</sub>-Konjugate verdrängt.

### 3.6 Statistische Analysen

Die hier gezeigten Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism® 6.0. statistisch analysiert. Dargestellt sind im Allgemeinen die Einzelwerte zusammengefasster Experimente mit Angabe des Medians und des entsprechenden Interquartilsabstand. Sofern der Unterschied zwischen der Sham- und CLP-Gruppe bei gleicher Bedingung betrachtet wurde, erfolgte die statistische Analyse mittels ungepaartem, nicht-parametrischem *Mann-Whitney Test*. Bei vorheriger Behandlung beider Gruppen, wie z.B. einer Splenektomie und der entsprechenden Kontrolllaparotomie, oder der Verwendung verschiedener Mausstämme, wurden Unterschiede mittels nicht-parametrischem *Kruskal-Wallis Test* und nachgeschaltetem *Dunn's Test* analysiert. Zeitkinetische Unterschiede zwischen den Sham- und CLP-Gruppen innerhalb der betrachteten Zeitpunkte wurden anhand des nicht-parametrischen, ungepaarten *multiplen t-Tests* durchgeführt. Hierbei wird für jeden Zeitpunkt ein entsprechender p-Wert berechnet, der mittels Holm-Šídák-Methode bezüglich aller Zeitpunkte korrigiert wird, um falsch positive Unterschiede auszuschließen. Zytokinmengen wurden angegeben als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung und je nach Versuchsbedingung mit einem der bereits genannten statistischen Testverfahren analysiert. Vorläufige Ergebnisse wurden auf Grund zu kleiner Gruppengrößen statistisch nicht ausgewertet. Korrelationen der Zahl zweier Zellpopulationen wurden nach Spearman analysiert. Als statistisch signifikant sind p-Werte < 0,05 definiert.

## 4. Ergebnisse

Die hier untersuchte subletale Form der polymikrobiellen Sepsis führt innerhalb weniger Tage zu einer anhaltenden Immunsuppression. Vermittelt wird dies unter anderem, durch die Dysfunktion von DC, die die Polarisierung von naiven T-Zellen hin zu T<sub>H</sub>2-Zellen begünstigen. In der Lunge führen DC durch die Hemmung von NK-Zellen zu einer erhöhten Anfälligkeit für die sekundäre Lungeninfektion mit *P. aeruginosa*. Die Ursache der DC-Dysfunktion ist eine veränderte Differenzierung der DC aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Vorarbeiten weisen darauf hin, dass bisher nicht näher charakterisierte CD11c<sup>+</sup>Zellen im Knochenmark an der Differenzierung *de novo* gebildeter DC beteiligt sind [155]. Die Rolle CD11c<sup>+</sup>Zellen im Knochenmark während der akuten Phase der Sepsis ist noch unklar.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob bereits zelluläre Veränderungen des Knochenmarks in der akuten Phase der Sepsis die *de novo* Differenzierung von DC beeinflussen. Zudem wurden Einflüsse lymphoider Organe, sowie migratorischer Faktoren auf die Knochenmarkszusammensetzung untersucht.

### 4.1 Während der akuten Phase der Sepsis kommt es zu zellulären Veränderungen des Knochenmarks

Sepsis führt zu einer raschen Lympho- sowie Neutropenie, also einem Verlust von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut [81, 170]. Der Verlust von Lymphozyten manifestiert sich im Verlauf der Sepsis ebenfalls in lymphoiden sowie nichtlymphoiden Organen. In den peripheren Organen kommt es zeitgleich zum starken Einstrom von neutrophilen Granulozyten, die dort durch massive Gewebedestruktion schwere Organschäden verursachen. Vier Tage nach Induktion der subletalen Sepsis durch CLP kommt es zu einem dramatischen Verlust von Lymphozyten im Knochenmark. Zu diesem Zeitpunkt liegt bereits eine Immunsuppression vor, die sich in der erhöhten Anfälligkeit gegenüber der sekundären Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* zeigt [155].

CLP führt schnell zur Ausbreitung von Darmbakterien in den drainierenden Lymphknoten des Peritoneums und des Intestinal Trakts und nach wenigen Stunden lassen sich diese auch in peripheren lymphoiden und nicht lymphoiden Organen nachweisen (nicht gezeigt). Die akute Phase der Sepsis ist charakterisiert durch die klinischen Parameter des SIRS. Anzeichen, wie eine erhöhte Herz- und Atemfrequenz, sowie eine generelle Verschlechterung des Habitus und der Motilität

wurden zwischen zwölf und 48 Stunden nach Sepsisinduktion durch CLP beobachtet. Teilweise kam es zu diesem Zeitpunkt zum Versterben der Versuchstiere (nicht gezeigt). Bereits 24 Stunden nach Sepsisinduktion zeigen DC der Milz eine verminderte Fähigkeit zur Produktion  $T_H1$ -polarisierender Zytokine [61]. Die folgenden Untersuchungen wurden, wenn möglich, 3, 12, 96 und vornehmlich 24 und 36 Stunden nach Sepsisinduktion durch CLP durchgeführt. Hierbei wurden zelluläre Veränderungen des Knochenmarks charakterisiert, die womöglich die Neubildung von Immunzellen während der akuten Phase der Sepsis beeinflussen.

Vierundzwanzig Stunden nach CLP enthielt das Knochenmark septischer Tiere eine verringerte Zahl an Leukozyten, im Vergleich zur Kontrollgruppe der Sham-Tiere (Abb. 4.1). Der Verlust an Knochenmarkszellen setzte sich bis 36 Stunden nach CLP fort und resultierte in einer signifikanten Reduktion der Knochenmarkszellen um etwa 33 % von durchschnittlich  $2,7 \times 10^7$  Zellen pro Sham-Tier auf durchschnittlich  $1,8 \times 10^7$  Zellen pro CLP-Tier. Um die zellulären Veränderungen näher zu charakterisieren, wurde das Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert.

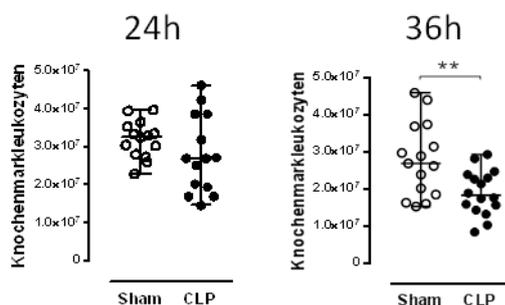


Abbildung 4. 1 **Knochenmarkleukozyten während Sepsis.** Vierundzwanzig sowie 36 Stunden nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark von Sham- sowie CLP-Mäusen isoliert und die Zahl der Leukozyten bestimmt. Dargestellt ist die Zellzahl pro Tier aus 5 (24 h) bzw. 6 (36 h) Experimenten mit jeweils 1-4 Mäusen pro Gruppe und deren Median mit Interquartilsabstand. Statistische Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Test ermittelt; \*\*,  $p < 0,01$ .

#### 4.1.1 Reduktion von B-Zellen und Granulozyten im Knochenmark während akuter Sepsis

Sechsdreißig Stunden nach Sepsisinduktion zeigte sich eine starke Reduktion von B-Zellen im Knochenmark, um durchschnittlich 60 %, verglichen mit der Sham-Gruppe (Abb. 4.2B). Diese Reduktion betraf vornehmlich die Population der B-Zell-Vorläufer, die durch eine mittlere Expression des Oberflächenmoleküls B220 charakterisiert werden. B-Zellen reifen im Knochenmark und exprimieren dabei verstärkt B220 (Abb. 4.2C) [29]. Sie lassen sich somit durchflusszytometrisch von B-Zell-Vorläuferzellen abgrenzen. Parallel zur Reduktion der Population der B-Zell-Vorläufer lagen vermehrt reife B-Zellen im Knochenmark vor (Abb. 4.2C). Dabei

zeigte sich ein Anstieg der reifen B-Zellen von durchschnittlich  $1,2 \times 10^6$  Zellen im Knochenmark der Sham-Gruppe auf durchschnittlich  $2,5 \times 10^6$  Zellen der CLP-Gruppe. Es entstand dadurch ein relativer Anstieg reifer B-Zellen an der Gesamtzahl von B-Zellen im Knochenmark von 10 % in der Sham-Gruppe auf 60 % nach CLP.

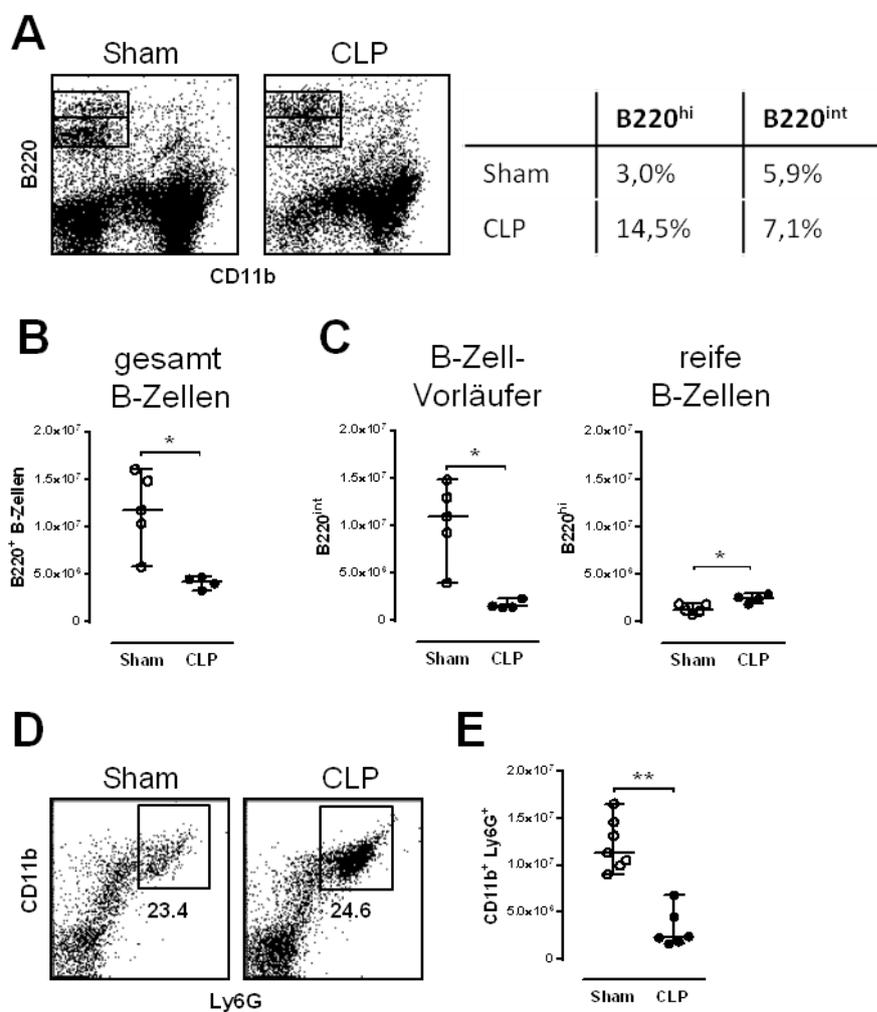


Abbildung 4. 2 **B-Zellen und Granulozyten im Knochenmark während Sepsis.** Sechsenddreißig Stunden nach CLP bzw. Sham-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch mittels B220, CD11b und Ly6G charakterisiert. Die Abbildungen zeigen die Gating-Strategie für die Unterscheidung  $CD11b^+B220^{hi}$  bzw.  $B220^{int}$  exprimierender B-Zellen nach Sham- oder CLP-OP (A). Die nebenstehende Tabelle gibt die prozentualen Zahlen der betrachteten Populationen an. Gezeigt sind die absoluten Zahlen aller  $CD11b^+B220^+$  B-Zellen im Knochenmark (B), der  $CD11b^+B220^{int}$  B-Zell-Vorläufer, sowie der  $CD11b^+B220^{hi}$  reifen B-Zellen (C). Die Daten zeigen den Median mit Interquartilsabstand der Werte der einzelnen Tiere aus 2 Experimenten mit jeweils  $n=1-4$  Mäusen. Die exemplarische Gating-Strategie (D), sowie die Absolutzahlen der  $CD11b^+Ly6G^+$  Granulozyten pro Tier sind dargestellt als Einzelwerte und Median mit Interquartilsabstand aus 2 Experimenten mit jeweils 3-4 Mäusen pro Gruppe (E). Statistische Unterschiede wurden jeweils mittels Mann-Whitney Test ermittelt; \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ .

Das Knochenmark stellt unter anderem ein wichtiges Reservoir für Granulozyten dar [190]. Sechszwanzig Stunden nach CLP war die Zahl der Granulozyten um etwa 80 % im Vergleich zu den Sham-Tieren verringert (Abb. 4.2E).

#### **4.1.2 Sepsis-assoziierte Akkumulation von T-Zellen im Knochenmark**

Entgegen den früheren Untersuchungen der postseptischen Phase (4 Tage nach CLP), war die Anzahl der T-Zellen im Knochenmark 24 Stunden nach CLP um etwa das Dreifache im Vergleich zu den T-Zellen in Sham-Tieren gestiegen. Nach 36 h war der Anteil der T-Zellen im Knochenmark der septischen Tiere nur noch leicht gegenüber den Kontrolltieren erhöht (Abb. 4.3D).

Von 24 auf 36 Stunden nach Sham-OP zeigte sich eine Reduktion der T-Zellzahl um 80 %, wobei die Reduktion innerhalb der CLP-Gruppe nur etwa 30 % betrug. Vierundzwanzig Stunden nach CLP setzten sich in beiden Gruppen die Hälfte der T-Zellen aus CD4<sup>+</sup>T-Zellen zusammen. Sechszwanzig Stunden nach CLP- oder Sham-OP entsprach die Zahl der CD4<sup>+</sup>T-Zellen in beiden Gruppen der Gesamt-T-Zellzahl und war nach CLP erhöht (Abb. 4.3E). Hierbei handelt es sich jedoch um zwei unabhängige Messungen, wodurch leichte, messbedingte Schwankungen der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. T-Zellen expandieren während ihrer Reifung im Thymus. Um zu untersuchen, ob es sich bei den akkumulierenden T-Zellen im Knochenmark um reife T-Zellen handelte wurden diese, in einem einmaligen Experiment, intrazellulär auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Über 75% der CD4<sup>+</sup>T-Zellen, 24 Stunden nach CLP- oder Sham-OP, waren Ki-67<sup>+</sup> (Abb. 4.3F).

NK-Zellen zeigten 24 Stunden nach CLP einen leichten aber nicht signifikanten Anstieg im Vergleich zur Sham-Gruppe, der jedoch 36 Stunden nach CLP nicht mehr vorhanden war (Abb. 4.3G). Der allgemeine Verlust von Knochenmarkszellen betrifft somit nicht die T-Zellen oder NK-Zellen.

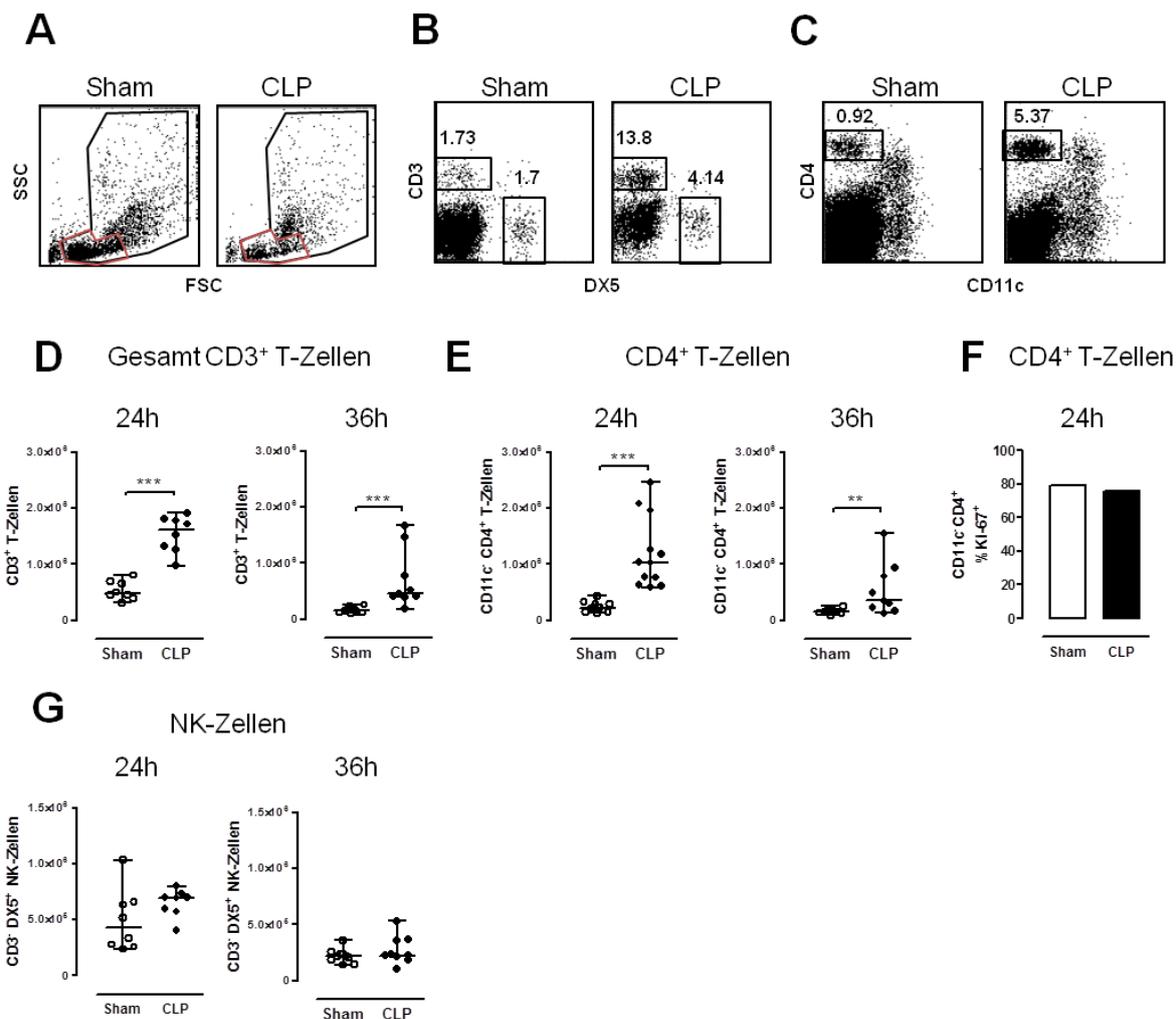


Abbildung 4. 3 T- und NK-Zellen im Knochenmark während Sepsis. Vierundzwanzig sowie 36 h nach Sham- bzw. CLP Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch mittels CD3, DX5, CD4, CD11c und Ki-67 charakterisiert. Die Abbildungen zeigen die Gating-Strategie für Lymphozyten (rot markierter Bereich) im Knochenmark (A), sowie für CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>T-Zellen und CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>NK-Zellen 36 h nach Sham- oder CLP-OP (B) und für CD11c<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen 24 h nach Sham- oder CLP-OP mit Angabe der jeweiligen prozentualen Anteile (C). Dargestellt ist die absolute Zahl der CD3<sup>+</sup>T-Zellen (D), sowie die absolute Zahl CD11c<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (E) pro Maus 24 h und 36 h nach Sham- oder CLP-OP. Die Abbildungen zeigen die Einzelwerte mit entsprechendem Median und Interquartilsabstand aus jeweils 3 Experimenten mit jeweils 1-4 Mäusen pro Gruppe. Der prozentuale Anteil Ki-67<sup>+</sup> proliferierender CD4<sup>+</sup>T-Zellen 24 h nach Sham- oder CLP-OP ist dargestellt als Balkendiagramm eines Experiments mit dem vereinigten Knochenmark von n=4 Mäusen pro Gruppe (F). Die Zahl CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>NK Zellen aus 3 Experimenten mit jeweils 1-4 Mäusen pro Gruppe ist dargestellt als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand (G). Statistische Unterschiede wurden jeweils mittels Mann-Whitney Test ermittelt; \*\*\*, p<0,005; \*\*, p<0,01.

#### 4.1.3 Einfluss der polymikrobiellen Sepsis auf Monozytenpopulationen im Knochenmark

Unter inflammatorischen Bedingungen werden vermehrt Ly6C<sup>hi</sup>Monozyten gebildet [194]. Während der Differenzierung in MoDC exprimieren Monozyten CD11c. Zwischen zwölf und 96 Stunden nach Sepsisinduktion wurden Monozytenpopulationen im Knochenmark untersucht. Bei den betrachteten Populationen handelte es sich um CD11c<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> patrouillierende Monozyten,

CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> inflammatorische Monozyten, sowie CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>hi</sup> und CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>int</sup> inflammatorische MoDC. Die Gruppe der CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen wurde nicht näher charakterisiert, aber in die Untersuchungen mit einbezogen (Abb. 4.4A). Bereits zwölf Stunden nach CLP verringerte sich der prozentuale Anteil aller Monozytenpopulationen, ausgenommen, die der Ly6C<sup>hi</sup>MoDC im Vergleich zu Sham-Tieren (Abb. 4.4B). Die Zahl patrouillierender Monozyten reduzierte sich zwölf Stunden nach CLP stark im Vergleich zur Sham-Gruppe von  $1,2 \times 10^7$  Zellen auf  $0,35 \times 10^7$  Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach CLP- oder Sham-OP war die Zahl dieser Population in beiden Gruppen vermindert, die prozentuale Differenz blieb jedoch gleich. Ab 36 bis 96 Stunden nach Versuchsbeginn stieg die Zahl patrouillierender Monozyten in beiden Gruppen wieder an, bis die Sham Gruppe etwa wieder die Monozytenzahl von zwölf Stunden nach OP erreichte. Die Differenz zwischen der Sham- und der CLP-Gruppe reduzierte sich dabei um etwa die Hälfte. Diese transienten Veränderungen ließen sich auch innerhalb der weiteren Monozytenpopulationen, mit Ausnahme der Ly6C<sup>hi</sup>MoDC, feststellen (Abb. 4.4C). Sechsendneunzig Stunden nach Versuchsbeginn wurde jedoch eine generelle Erhöhung der Zahl inflammatorischer Monozyten und eine generelle Erniedrigung der Zahl Ly6C<sup>int</sup>MoDC und CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen im Vergleich mit den Zellzahlen zwölf Stunden nach CLP- oder Sham-OP festgestellt (Abb. 4.4C). Zwölf Stunden nach Sepsisinduktion war die Zahl Ly6C<sup>hi</sup>MoDC doppelt so hoch, verglichen mit Sham-Tieren. Diese Differenz blieb bis 36 Stunden nach Versuchsbeginn bestehen, wobei sich jedoch eine generelle Steigerung der Zahl Ly6C<sup>hi</sup>MoDC in beiden Gruppen um etwa das 6-Fache des zwölf-Stunden-Wertes einstellte (Abb. 4.4B). Zum Zeitpunkt der postseptischen Immunsuppression, 96 Stunden nach CLP, reduzierte sich die Zahl Ly6C<sup>hi</sup>MoDC in beiden Gruppen auf die Zellzahl, die zwölf Stunden nach Versuchsbeginn im Knochenmark der Sham Gruppe festgestellt wurde (Abb. 4.4C).

Patrouillierende Monozyten im Blut sind unter *steady-state* Bedingungen nicht proliferativ [229]. Um zu untersuchen, ob die Monozytendifferenzierung aus Vorläuferzellen im Knochenmark durch Sepsis gestört war und ob es dort im Zuge der Inflammation zur Differenzierung in inflammatorische MoDC kam, wurden 36 Stunden nach Sepsisinduktion die betrachteten Monozytenpopulationen anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht (Abb. 4.5A-B).

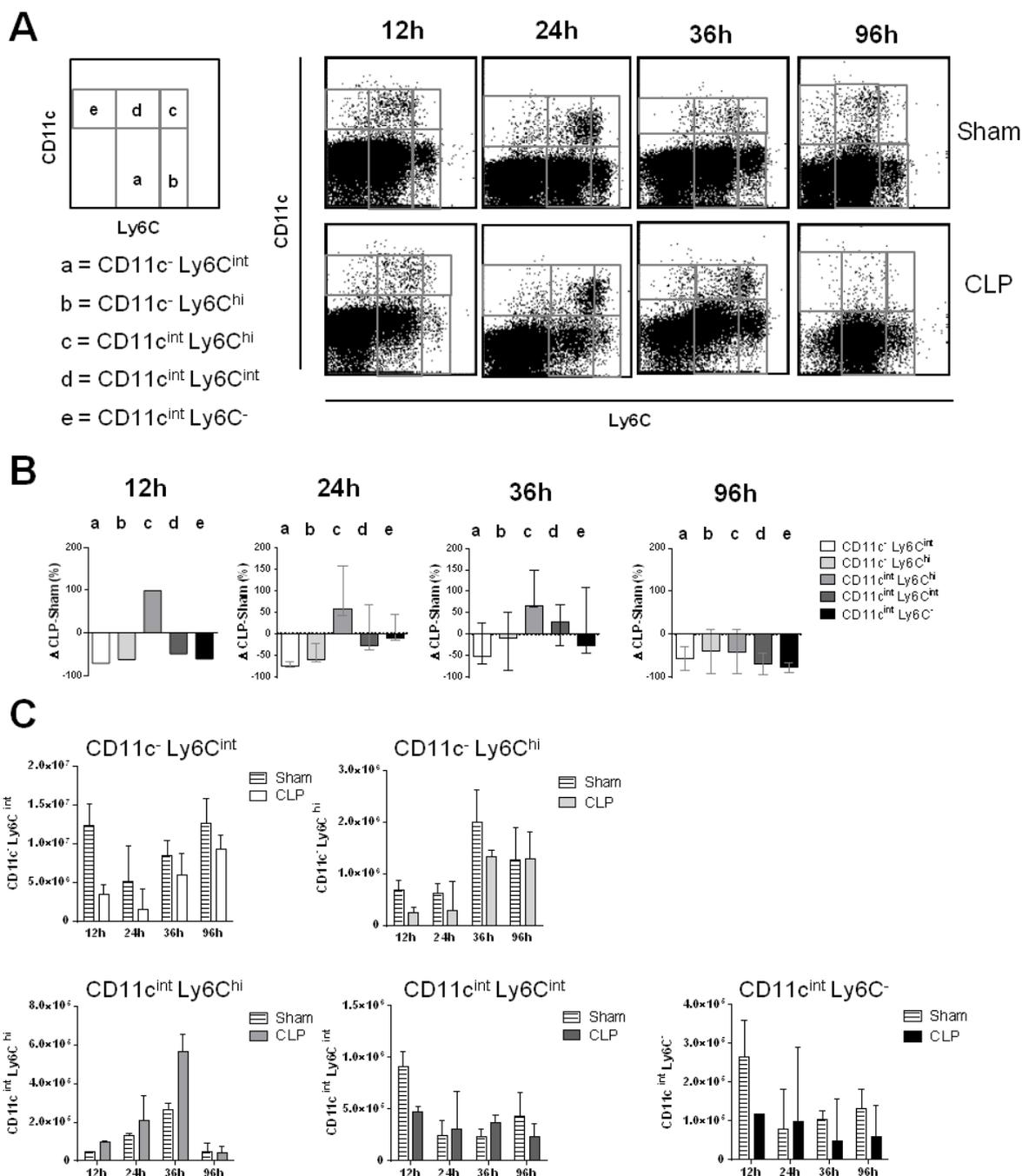


Abbildung 4. 4 Monozytenpopulationen im Knochenmark während Sepsis. Zwölf, 24, 36 und 96 Stunden nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch mittels CD11c und Ly6C charakterisiert. Dargestellt ist die Gating-Strategie der einzelnen Monozytenpopulationen im Knochenmark nach CLP- bzw. Sham-OP als exemplarische Dot-Plots pro Zeitpunkt (A). Die Populationen werden definiert als patrouillierende (a) und inflammatorische (b) Monozyten, sowie Ly6C<sup>hi</sup>MoDC (c), Ly6C<sup>int</sup>MoDC (d) und CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen (e). Die Abbildungen zeigen, die prozentuale Differenz der Absolutzahlen (B) zwischen Sham und CLP aus 1 (12 h), 2 (96 h) oder 3 (24 und 36 h) Experimenten mit jeweils 1-4 Tieren pro Gruppe.  $\Delta > 0$  = größer als Sham;  $\Delta < 0$  = kleiner als Sham,  $\Delta = 0$  = CLP gleich Sham. Dargestellt ist zudem der Median der Absolutzahlen mit Range der einzelnen Populationen (C).

Bei allen Ki-67<sup>+</sup> Monozyten handelte es sich vorwiegend um MHCII<sup>-</sup> Zellen. Lediglich MoDC und CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen exprimierten MHCII, jedoch führte die Sepsisinduktion zu keiner verstärkten Expression. Die höchste Ki-67-Expression konnte mit 75 % innerhalb der Sham-Gruppe und einer Steigerung um 20 % nach CLP in der Gruppe der patrouillierenden CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>int</sup> Monozyten festgestellt werden. In der Gruppe der inflammatorischen Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten erzeugte die Sepsisinduktion eine Steigerung der proliferativen Zellen von durchschnittlich 36 % der Sham-Gruppe auf durchschnittlich 78 % der CLP-Gruppe.

Ly6C<sup>hi</sup>MoDC und CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen exprimierten wenig Ki-67 und es konnte keine wesentliche Steigerung nach Sepsisinduktion festgestellt werden. Ein Drittel der Ly6C<sup>int</sup>MoDC exprimierte unter Kontrollbedingungen Ki-67. Nach Sepsisinduktion erhöhte sich dieser Wert unwesentlich um 15 %. Da es sich bei den gezeigten Ergebnissen, zur Veränderung der Monozytenpopulationen im Knochenmark während Sepsis, teilweise um einmalig durchgeführte Experimente handelt, kann zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage zum Einfluss der Sepsis auf Monozyten im Knochenmark getroffen werden.

Die akute Phase der Sepsis führt zu einem lokalen Zellverlust im Knochenmark, insbesondere durch eine Reduktion von B-Zellen, Granulozyten und klassischen CD11c<sup>-</sup> Monozyten. Es kommt jedoch auch zur Reifung von B-Zellen und zu einer transienten Akkumulation von CD4<sup>+</sup>T-Zellen und Ly6C<sup>hi</sup>MoDC.

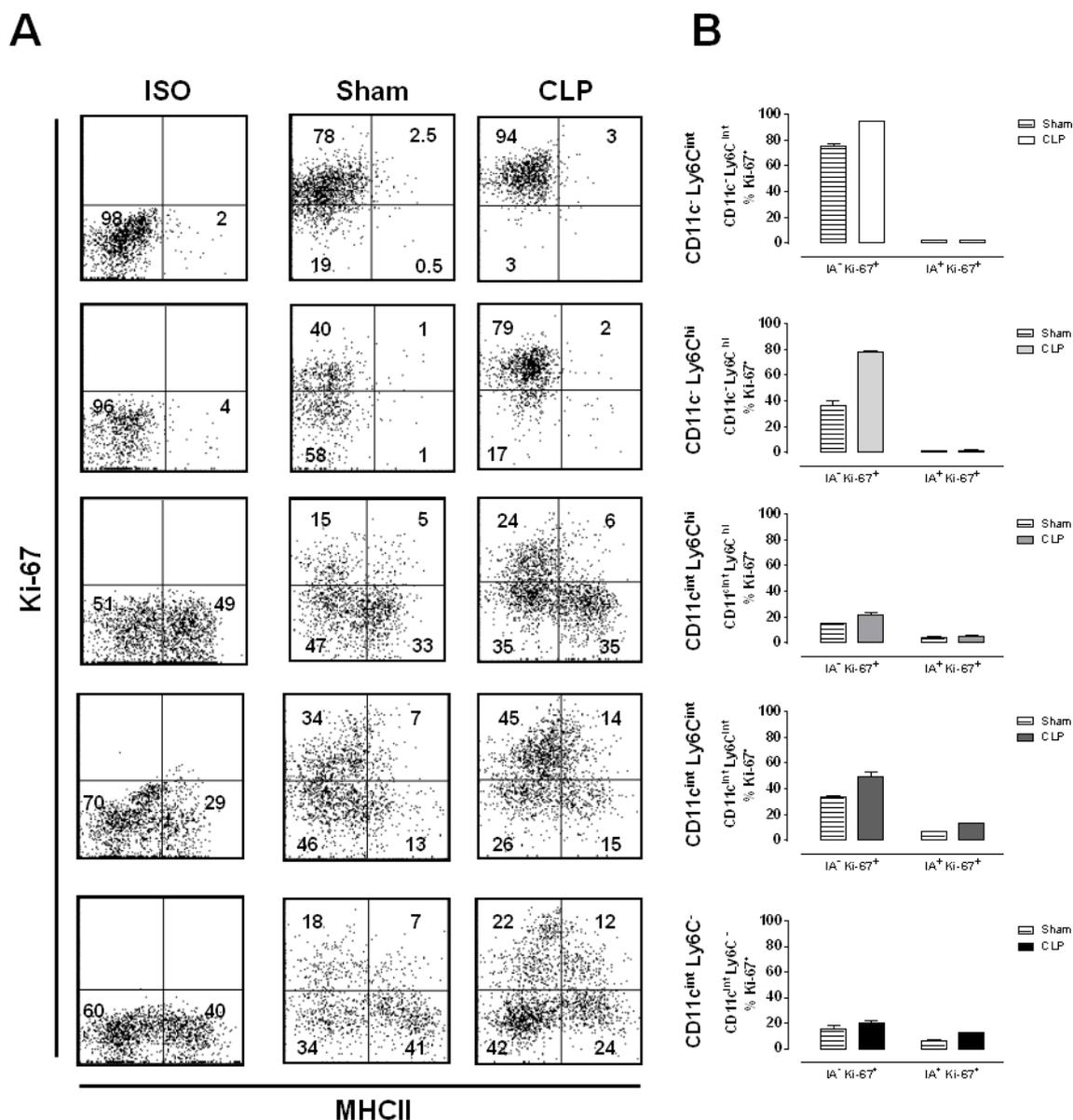


Abbildung 4. 5 **Proliferation und Aktivierung von Monozyten im Knochenmark während Sepsis.** Sechszwanzig Stunden nach Sham- oder CLP Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch mittels CD11c, Ly6C, MHCII und dem Proliferationsmarker Ki-67 charakterisiert. Dargestellt, sind die Expression von MHCII und Ki-67 der einzelnen Monozytenpopulationen im Knochenmark (siehe Abb. 1.4) nach CLP- bzw. Sham-OP und eine Isotyp-Kontrolle für Ki-67 als exemplarische Dot-Plots mit Angabe der prozentualen Verteilung (A). Die Abbildungen zeigen den prozentualen Anteil Ki-67<sup>+</sup> proliferierender Zellen entsprechend Ihrer MHC-Expression als Median der Einzelwerte mit Range eines Experiments mit n=2 Tieren (B)

#### 4.2 CD4<sup>+</sup>DC erscheinen in der akuten Phase der Sepsis im Knochenmark

Sepsis führte zu einem peripheren Verlust von DC, der sich 4 Tage nach CLP auch im Knochenmark manifestierte (Daten nicht gezeigt). In der akuten Phase der Sepsis, 24 bis 36 Stunden nach CLP, stieg die Zahl von DC im Knochenmark an. So verdoppelte sich die Zahl der CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>+</sup>DC 24 Stunden nach CLP und stieg um das 2,5-fache nach 36 Stunden im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb. 4.6B/D).

Vierundzwanzig Stunden nach CLP verdoppelte sich die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC (Abb. 4.6C) und zwölf Stunden später stieg die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC weiter von durchschnittlich  $1,99 \times 10^4$  auf  $6,78 \times 10^4$  auf das Dreifache, verglichen mit der Sham-Gruppe (Abb. 4.6E).

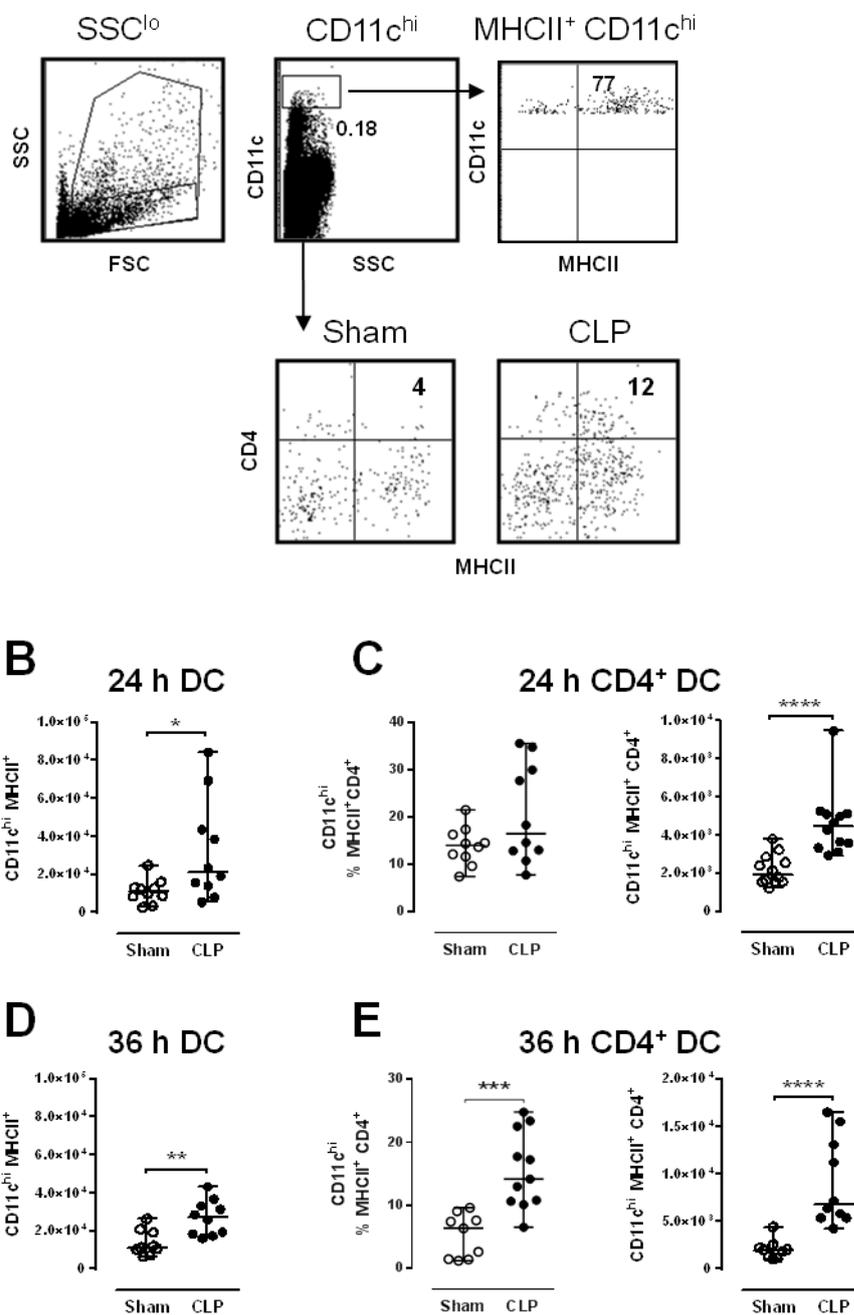


Abbildung 4. 6 **Dendritische Zellen im Knochenmark während Sepsis.** Vierundzwanzig und 36 Stunden nach Sham- bzw. CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch mittels CD11c, MHCII und CD4 charakterisiert. Dargestellt ist die Gating-Strategie  $CD11c^{hi} MHCII^+$  DC, sowie  $CD4^+$  DC innerhalb der  $CD11c^{hi}$  DC im Knochenmark 36 h nach CLP-OP (A). Die Abbildungen zeigen die absoluten Zahlen  $CD11c^{hi} MHCII^+$  DC 24 h (B) und 36 h (D) nach Sham- und CLP-OP mit entsprechendem Median und Interquartilsabstand aus 4 Experimenten, mit jeweils 1-4 Tieren pro Gruppe. Dargestellt sind der prozentuale Anteil an  $CD11c^{hi}$  DC, sowie die die absoluten Zahlen  $CD4^+$  DC im Knochenmark 24 h (C) und 36 h (E) nach Sham-oder CLP-OP mit entsprechendem Median und Interquartilsabstand (D). Statistische Unterschiede wurden jeweils mittels Mann-Whitney Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0005$ .

Zu keinem der früheren Zeitpunkte (drei bis 18 Stunden) bestand ein Unterschied in der Größe der Population der CD4<sup>+</sup>DC zwischen Sham und CLP. Im weiteren Verlauf bis zu 96 Stunden nach CLP, nahm die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC ab und zeigte schließlich die bereits bekannte Verringerung im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb. 4.7A).

Der Anstieg der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark 24 und 36 Stunden nach Sepsisinduktion korrelierte dabei mit der oben beschriebenen Akkumulation von CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Abb. 4.7B) scheint dieser jedoch nachgeschaltet zu sein.

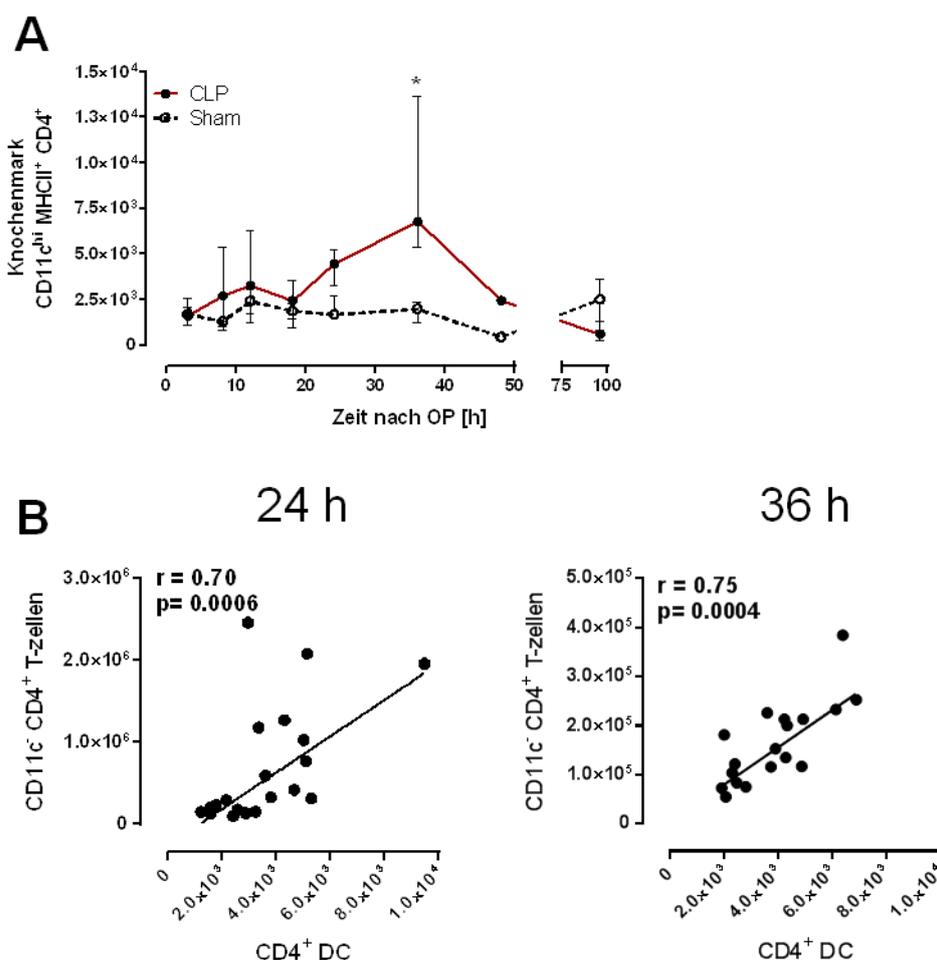


Abbildung 4. 7 **Zeitliche Änderung der Zahl CD4<sup>+</sup> DC im Knochenmark während Sepsis.** Zwischen 3 und 96 h nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch auf CD4<sup>+</sup>DC und CD11c<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen analysiert. Dargestellt ist die zeitliche Änderung der Absolutzahlen CD4<sup>+</sup>DC nach Sham- (gestrichelte Linie) bzw. CLP-OP (rote Linie) als Median und Interquartilsabstand aus 1 (18 und 48 h), 2 (3, 8, 24 und 96 h) oder 3 (12 und 36 h) mit jeweils mindestens 1 bis 5 Tieren pro Gruppe (A). Gezeigt ist zudem die Korrelation der absoluten Zahlen CD4<sup>+</sup>DC und CD11c<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen 24 h und 36 h nach CLP- bzw. Sham-OP aus 3 Experimenten mit jeweils 1-4 Tieren pro Gruppe (B). Die Zahlen CD4<sup>+</sup>T-Zellen wurden bereits in Abb. 4.3E dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mittels Holm-Sidak t-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,0005 und die Korrelation nach Spearman analysiert.

Ein charakteristisches Merkmal dysfunktionaler DC bei Sepsis ist die erhöhte Produktion von IL-10 nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen. *In vitro* mittels GM-CSF generierte BMDC aus dem Knochenmark 4 Tage nach CLP zeigen, wie DC der Milz zum gleichen Zeitpunkt, diese erhöhte IL-10 Produktion [155]. Die Produktion von IL-12 dagegen ist häufig erniedrigt. Das Verhältnis zwischen proinflammatorischem IL-12 und antiinflammatorischem IL-10 gibt dabei an, in welche Richtung die Balance der Zytokinantwort verschoben wurde.

#### **4.2.1 Das Erscheinen CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark ist assoziiert mit der Verschiebung der Zytokinbalance hin zur Antiinflammation**

Um zu untersuchen, ob die beschriebene DC-Dysfunktion bereits in der frühen Phase der Sepsis (3 bis 36 Stunden nach CLP) induziert wird, wurde das Knochenmark an den beschriebenen Zeitpunkten isoliert und über 7-10 Tage BMDC *in vitro* mittels GM-CSF generiert. Nach *in vitro* Stimulation mit CpG produzierten BMDC, die 8 Stunden nach CLP generiert wurden, bereits mehr IL-12 als Sham-BMDC. Dies verstärkte sich bis zu 36 Stunden weiter. Vierundzwanzig Stunden nach CLP sezernierten CLP-BMDC zudem vermehrt IL-10 und dies verstärkte sich innerhalb der folgenden 12 Stunden. Im Zeitverlauf bis 36 Stunden nach Sepsisinduktion wurde der Wechsel von der anfänglichen inflammatorischen hin zur regulierenden Immunantwort mit einem verringerten IL-12/IL10-Verhältnis sichtbar (Abb. 4.8A).

Die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD86 und CD40 wurde ebenfalls nach *in vitro* Stimulation der BMDC durchflusszytometrisch bestimmt und der relative Anstieg im Vergleich zum unstimulierten Zustand grafisch dargestellt. Aus dem Knochenmark septischer Tiere acht Stunden sowie zwölf Stunden nach CLP generierte BMDC, zeigten eine schwächere Expression kostimulatorischer Moleküle verglichen mit der Sham-Gruppe. BMDC aus dem Knochenmark zwölf Stunden nach Sham-Operation exprimierten deutlich höhere Level an CD86 und CD40 im Vergleich zu BMDC drei Stunden nach Sham-OP. Dies kann vermutlich auf die Sham-OP selbst zurückgeführt werden, jedoch handelt es sich bei den Ergebnissen zur CD86- und CD40-Expression zu den Zeitpunkten drei, acht und zwölf Stunden nach CLP bzw. Sham um Einzelwerte, deren Richtigkeit noch nachfolgend bestätigt werden muss. Aus dem Knochenmark 24 Stunden und 36 Stunden nach CLP generierte BMDC, zeigten eine erhöhte Aktivierbarkeit im Vergleich zu den vorhergehenden Zeitpunkten und nach 36 Stunden zusätzlich eine stärkere Reifung als BMDC der Sham-Gruppe (Abb. 4.8C).

Simultan mit dem Erscheinen von CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark kommt es zur

Differenzierung von BMDC, die nach *in vitro* Stimulation mit CpG vermehrt IL-10 aber auch IL-12 produzieren. Das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 ist jedoch hin zum anti-inflammatorischen IL-10 verschoben. Diese BMDC lassen sich, in Bezug auf die CD86- und CD40-Expression, zudem stärker aktivieren im Vergleich zu Sham-BMDC.

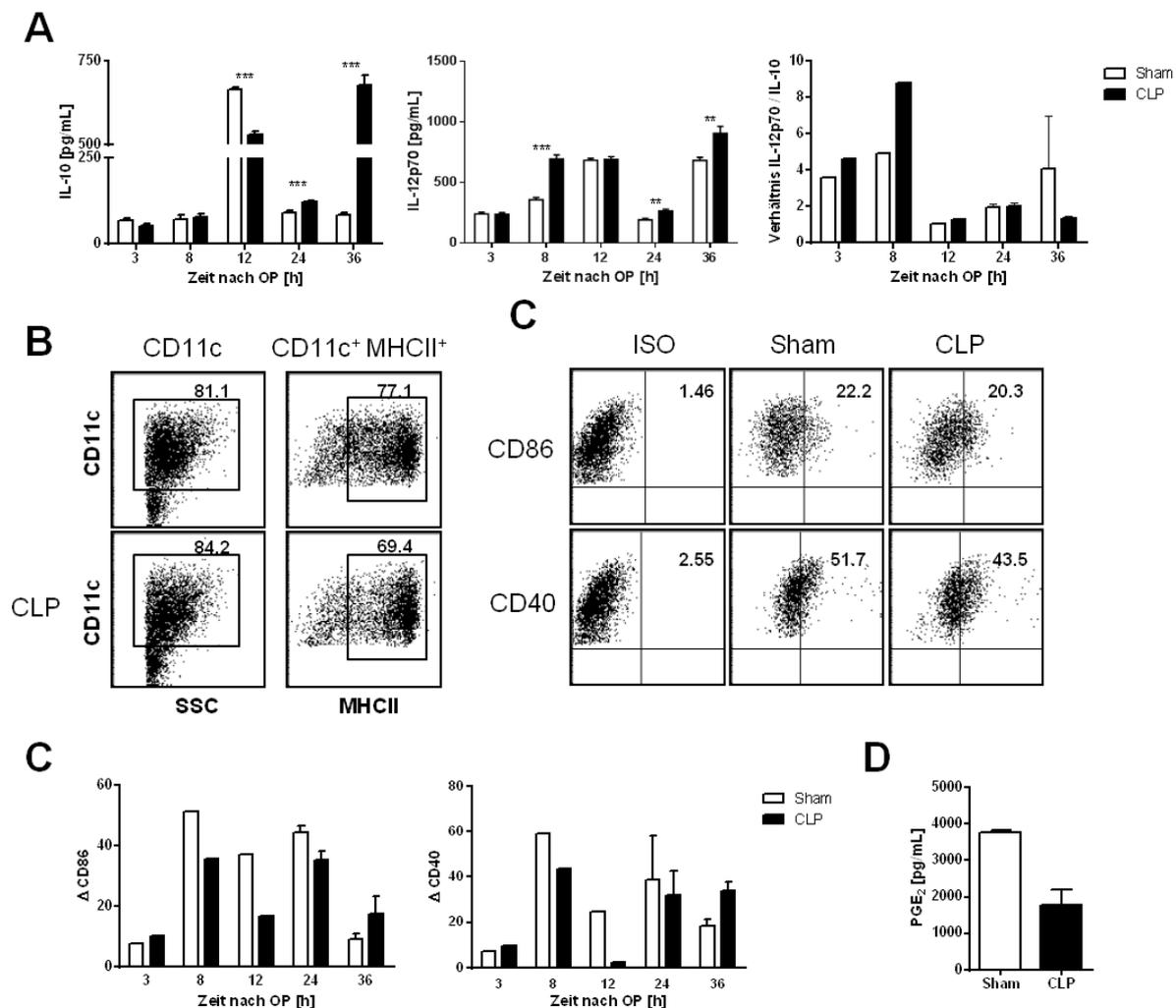


Abbildung 4. 8 Zeitlicher Einfluss der Sepsis auf die BMDC de novo Differenzierung aus Knochenmarkszellen *in vitro*. Zwischen 3 und 36 h nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und pro Gruppe vereinigt. Über 8-10 Tage wurden BMDC mittels GM-CSF generiert und diese anschließend über Nacht mit dem bakteriellen Stimulus CpG *in vitro* stimuliert. In den Überständen wurden mittels ELISA die Zytokinmengen für IL-10 und IL-12 bestimmt und das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 berechnet. Dargestellt sind IL-10- und IL-12-Mengen aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments pro Zeitpunkt, als Mittelwert mit Standardabweichung, sowie der Median mit Range der vereinigten IL-12/IL-10-Verhältnisse von 1 (3, 8 und 12 h) bzw. 2 (24 und 36 h) Experimenten (A). Statistische Unterschiede wurden mittels Holm-Sidak t-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ . Für das IL-12/IL-10-Verhältnis konnte auf Grund zu weniger Werte keine statistische Berechnung durchgeführt werden. Nach Übernacht-Stimulation wurde die Reifung der DC durchflusszytometrisch bezüglich der prozentualen Änderung der CD86- bzw. CD40-Expression von unstimuliert auf stimuliert, dargestellt als  $\Delta$  (Delta), untersucht. Gezeigt sind exemplarische Dot-Plots nach CpG-Stimulation mit Angabe der Prozentwerte (B), sowie die grafische Darstellung der Einzel- bzw. Mittelwerte mit Standardabweichung von 1-2 Experimenten pro Zeitpunkt (s. A) (C). Sechsdreißig Stunden nach CLP- oder Sham-OP wurde Knochenmark mittels Lavage der Tibia und des Femurs gewonnen und PGE<sub>2</sub> mittels ELISA im Überstand bestimmt. Gezeigt sind vorläufige Ergebnisse eines Experiments als Balkendiagramm mit 1-2 Tieren pro Gruppe (C).

Die Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen, kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Im Zuge des frühen Zytokinsturms werden große Mengen PGE<sub>2</sub> produziert. PGE<sub>2</sub> beeinflusst die Reifung und Zytokinproduktion myeloider Zellen. Es fördert die Differenzierung von DC, die vermehrt IL-10 und weniger IL-12 produzieren und begünstigt damit die Induktion einer T<sub>H</sub>2-Antwort [106, 195]. Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cell*, MSC) im Knochenmark sind in der Lage große Mengen PGE<sub>2</sub> zu produzieren. Ein vorläufiges Experiment zeigte jedoch keine erhöhten, sondern eher erniedrigten PGE<sub>2</sub>-Mengen in der Knochenmarklavage septischer Tiere im Vergleich zu Sham-Tieren (Abb 4.8D).

#### **4.2.2 Einfluss von CD4<sup>+</sup> DC im Knochenmark auf die *de novo* Differenzierung von DC während der Sepsis**

Der Anstieg der Zahl an CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark 36 Stunden nach CLP war mit einer *in vitro* Differenzierung von BMDC assoziiert, die vermehrt IL-10 sezernierten. Um einen möglichen Einfluss dieser akkumulierenden CD4<sup>+</sup>DC auf die Differenzierung von BMDC zu untersuchen, wurden diese vor BMDC-Generierung mittels FACS-Sortierung weitestgehend aus dem Knochenmark entfernt und die so isolierten CD4<sup>+</sup>DC optisch mittels Cytospin-Giemsa-Färbungen charakterisiert. Der Anteil noch vorliegender CD4<sup>+</sup>DC lag unter 0,1% nach Depletion. CD4<sup>+</sup>DC wurden lediglich mit einer Reinheit von mindestens 50 % angereichert (Abb. 4.9B).

Anhand der Giemsa-Färbungen ließen sich die CD4<sup>+</sup>DC als runde, zwischen 10-15 µm große Zellen darstellen. Sie zeigten wenige stellare Ausläufer, aber eine regelmäßig gewölbte Form und einen großen Zellkern (Abb. 4.9C).

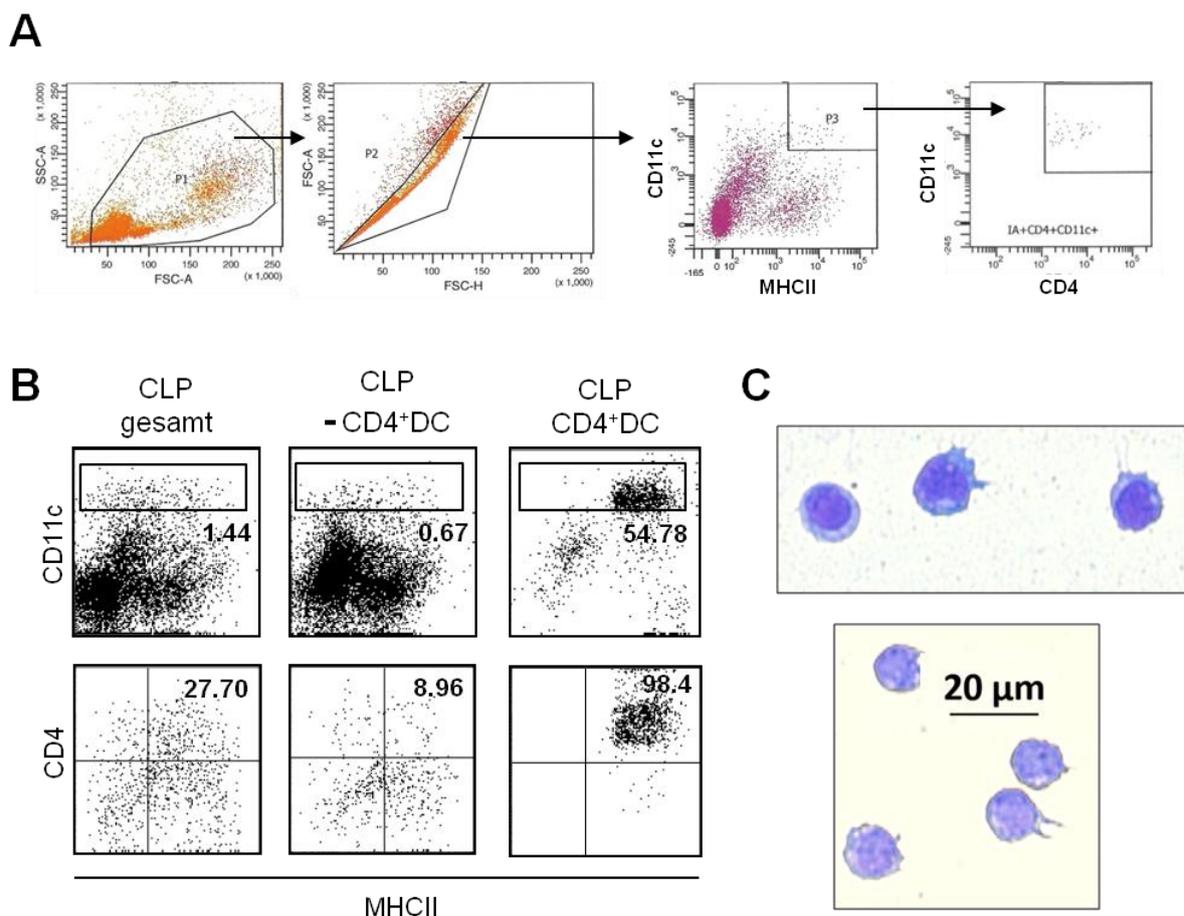
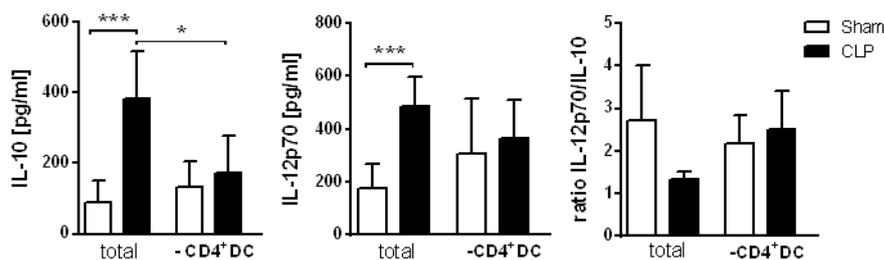


Abbildung 4. 9 **Depletion bzw. Isolation von  $CD4^+DC$  aus dem Knochenmark septischer Mäuse.** Sechsendreißig Stunden nach CLP wurde das Knochenmark isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, MHCII und CD11c gefärbt. Mittels FACS-Sortierung wurden die  $CD4^+DC$  aus dem Knochenmark depletiert. Die exemplarischen Abbildungen zeigen die Sortierungs-Strategie (A), sowie den prozentualen Anteil  $CD11c^{hi}DC$ , sowie  $CD4^+DC$  im Knochenmark vor und nach Depletion und der angereicherten  $CD4^+DC$  als exemplarische Dot-Plots (B). Die angereicherten  $CD4^+DC$  wurden anschließend mittels Cytospin-Technik auf Objektträgern fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Gezeigt sind exemplarische Bilder bei 20facher Vergrößerung aus  $n=5$  Experimenten (C).

Wie vorherige Experimente zeigten, produzierten CLP-BMDC, generiert aus Gesamtknochenmark vermehrt IL-10. Die Depletion  $CD4^+DC$  vor Generierung der BMDC hatte keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion von Sham-BMDC. Jedoch war die IL-10-Produktion von CLP-BMDC nach Depletion  $CD4^+DC$  reduziert. Die IL-12-Produktion von BMDC beider Gruppen wurde nicht signifikant beeinflusst. Hierdurch erhöhte sich das IL-12/IL-10-Verhältnis der CLP-BMDC auf etwa den Wert der Sham-BMDC (Abb. 4.10A). Der Anteil reifer  $MHCII^+DC$  war unter allen Kulturbedingungen mit durchschnittlich 70 % gleichwertig (Abb. 4.10B). Die Aktivierbarkeit der BMDC bezüglich der CD86- und CD40-Expression nach *in vitro* Stimulation mit CpG wurde nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

A



B

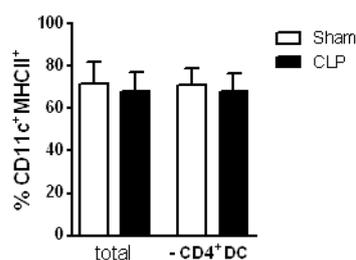


Abbildung 4. 10 Einfluss CD4<sup>+</sup>DC auf die *in vitro* Generierung von BMDC aus dem Knochenmark während Sepsis. Sechsendreißig Stunden nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, MHCII und CD11c gefärbt. Mittels FACS-Sorting wurden die CD4<sup>+</sup>DC aus dem Knochenmark depletiert. Anschließend wurden das unbehandelte, sowie depletierte Knochenmark über 8-10 Tage mit GM-CSF kultiviert und die BMDC anschließend über Nacht *in vitro* mit dem bakteriellen Stimulus CpG stimuliert. Mittels ELISA wurden die Zytokinmengen von IL-10 und IL-12 gemessen und das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 berechnet. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung der Triplikate von 3 vereinigten Experimenten. Gezeigt ist zudem der Mittelwert mit Standardabweichung des Verhältnisses von IL-12 zu IL-10 aus 3 Experimenten. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005.

Sechsendreißig Stunden nach CLP akkumulierten CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark, deren Depletion *in vitro* generierte BMDC förderte, die weniger IL-10 sezernieren und eine ausgeglichene Immunantwort, in Bezug auf das IL-12/IL-10-Verhältnis zeigen.

#### 4.2.3 Phänotyp und Herkunft der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark

DC haben ihren Ursprung im Knochenmark, wo aus multipotenten Stammzellen DC-Vorläufer, die pre-DC, gebildet werden. Diese wandern über die Blutzirkulation in periphere lymphoide, sowie nichtlymphoide Organe, wo es zur finalen Differenzierung in die verschiedenen DC-Subpopulationen unter der Ausbildung spezifischer Oberflächenmoleküle kommt. Um die im Knochenmark akkumulierenden CD4<sup>+</sup>DC mit cDC aus lymphoiden Organen zu vergleichen wurden 36 Stunden nach CLP diese durchflusszytometrisch auf verschiedene Oberflächenmoleküle untersucht. CD4<sup>+</sup>cDC in lymphoiden Organen exprimieren verstärkt CD11b und SIRP- $\alpha$ . Die CD11b-Expression der CLP-Gruppe war mit durchschnittlich 82 % leicht erhöht zur Sham-Gruppe, mit durchschnittlich 71 %. CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark

waren mit durchschnittlich 98% SIRP- $\alpha$ -positiv. Migratorische und interstitielle DC in nichtlymphoiden Geweben exprimieren die charakteristischen Oberflächenmoleküle CD103 oder E-Cadherin. Die betrachteten CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark septischer Tiere zeigten keine Expression von CD103. Im Knochenmark findet sich ein geringer Prozentsatz E-Cadherin<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>DC, der sich von durchschnittlich 27,5% auf 8% verglichen mit der CLP Gruppe verringert. Der hohe Prozentuale Anteil E-Cadherin<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark liegt hierbei an der sehr geringen Zahl CD4<sup>+</sup>DC. Eine eindeutige Population konnte nicht festgestellt werden. Außer cDC können DC auch monozytären Ursprungs sein. Der charakteristische Marker für moDC ist Ly6C. CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark der Sham-Gruppe sind durchschnittlich zu 32 % positiv für Ly6C und dies verstärkt sich in der CLP-Gruppe auf durchschnittlich 51 % (Abb. 4.11A-B).

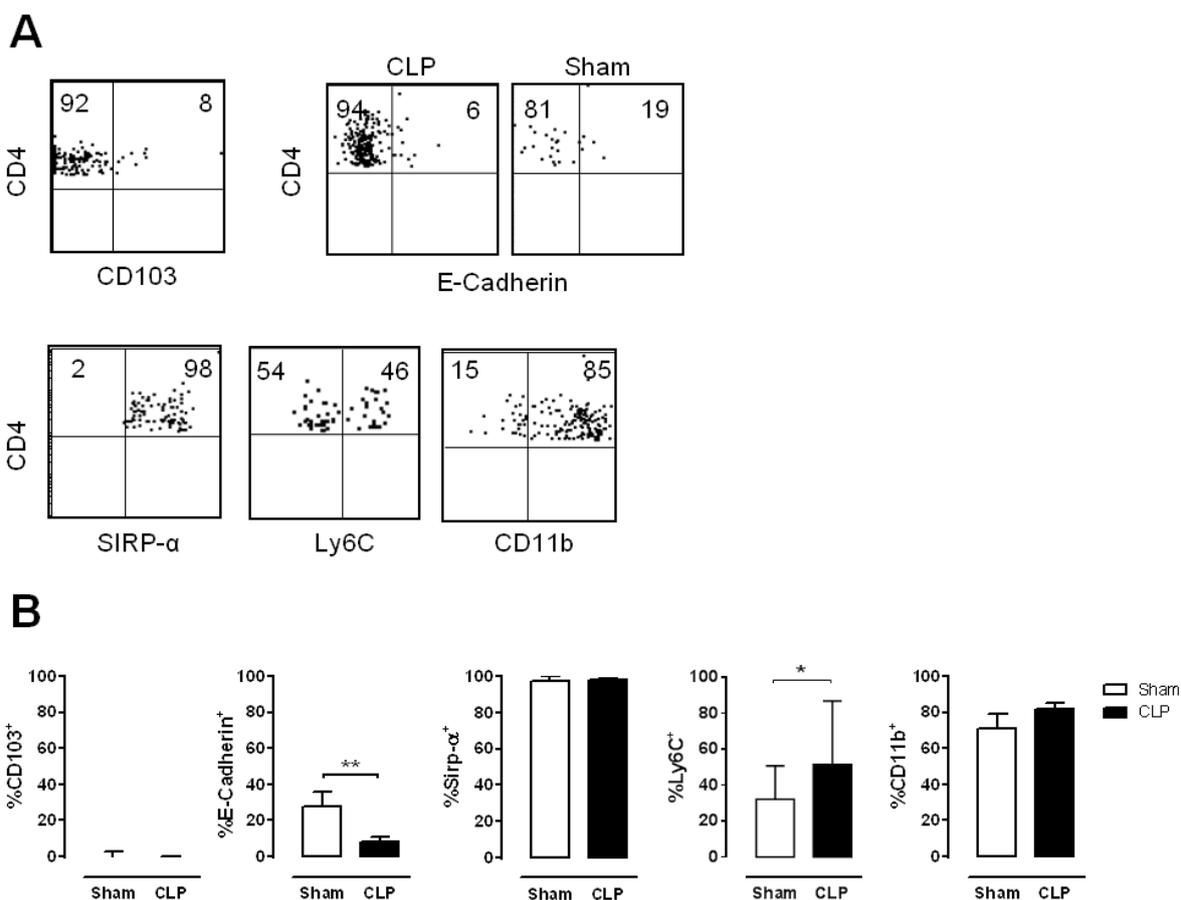


Abbildung 4. 11 **Charakterisierung CD4<sup>+</sup>DC aus dem Knochenmark während Sepsis.** Sechsendreißig Stunden nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und die CD4<sup>+</sup>DC durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmoleküle SIRP- $\alpha$ , CD11b, CD103, E-Cadherin und Ly6C untersucht. Dargestellt sind exemplarische Dot-Plots 36 h nach CLP- bzw Sham-OP (nur E-Cadherin) mit Angabe der Prozentwerte. Zur Abgrenzung positiver Zellen wurden Isotypkontrollen verwendet (nicht gezeigt). Die Zahlen in den oberen Quadranten geben den prozentualen Anteil der betrachteten Oberflächenmoleküle an CD4<sup>+</sup>DC an (A). Die Daten stellen jeweils den Median des prozentualen Anteils mit Interquartilsabstand aus 2 (CD11b und E-Cadherin), 4 (CD103), bzw. 5 (SIRP- $\alpha$  und Ly6C) Experimenten mit jeweils 1-4 Tieren pro Gruppe dar (B). Statistische Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01.

Sechsendreißig Stunden nach Sepsisinduktion akkumulieren CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark, die anhand ihrer Oberflächenmarker Ähnlichkeiten mit cDC aus sekundären lymphoiden Organen, als auch mit monozytären DC aufweisen.

#### **4.2.4 CD4<sup>+</sup> DC erscheinen früh in den mesenterialen Lymphknoten während Sepsis**

Auf Grund der Ähnlichkeit zu cDC wurde vermutet, dass CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark septischer Tiere zum Teil aus sekundären lymphoiden Organen stammen. Im CLP-Modell beginnt die initiale Infektion im Peritoneum und breitet sich innerhalb der ersten Stunden über das Blut im gesamten Organismus aus, bis hin zum Knochenmark. In der frühen Phase der Sepsis wurde nun untersucht, ob es in den peripheren lymphoiden Organen und dem Blut zu Veränderungen, hinsichtlich der Zahl CD4<sup>+</sup>DC kommt.

Bereits 6 Stunden nach CLP akkumulierten CD4<sup>+</sup>DC in den mesenterialen Lymphknoten. Hier kam es zu einem Anstieg von durchschnittlich  $2,2 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup>DC in den Lymphknoten der Sham-Gruppe auf durchschnittlich  $3,95 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup>DC der CLP-Gruppe. Bereits zwei Stunden später reduzierte sich die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC wieder auf die Zellzahl der Sham-Gruppe (Abb. 4.12A). Unter inflammatorischen Bedingungen migrieren CD103<sup>+</sup>DC aus dem Intestinaltrakt in die mesenterialen Lymphknoten. Durchschnittlich 55 % der CD4<sup>+</sup>DC in den mesenterialen Lymphknoten exprimierten unter Sham-Bedingungen CD103. Nach Sepsisinduktion erhöhte sich dieser Anteil um 10 % (Abb. 4.12C). Ein vorläufiges Experiment zeigte 6 Stunden nach Sepsisinduktion einen Anstieg von CD103<sup>+</sup> als auch von CD103<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>DC (Abb. 4.12D). Vergleichbar mit der CD103-Expression schien die Expression von SIRP- $\alpha$  auf den CD4<sup>+</sup>DC zu sein und auch hier scheint es zu einem Anstieg SIRP- $\alpha$ <sup>+</sup>, sowie SIRP- $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>DC zu kommen (Abb. 4.12E/F). Hierbei handelt es sich um jeweils unabhängige Experimente. CD4<sup>+</sup>DC, die sowohl CD103 als auch SIRP- $\alpha$  exprimieren können somit nicht nachgewiesen werden.

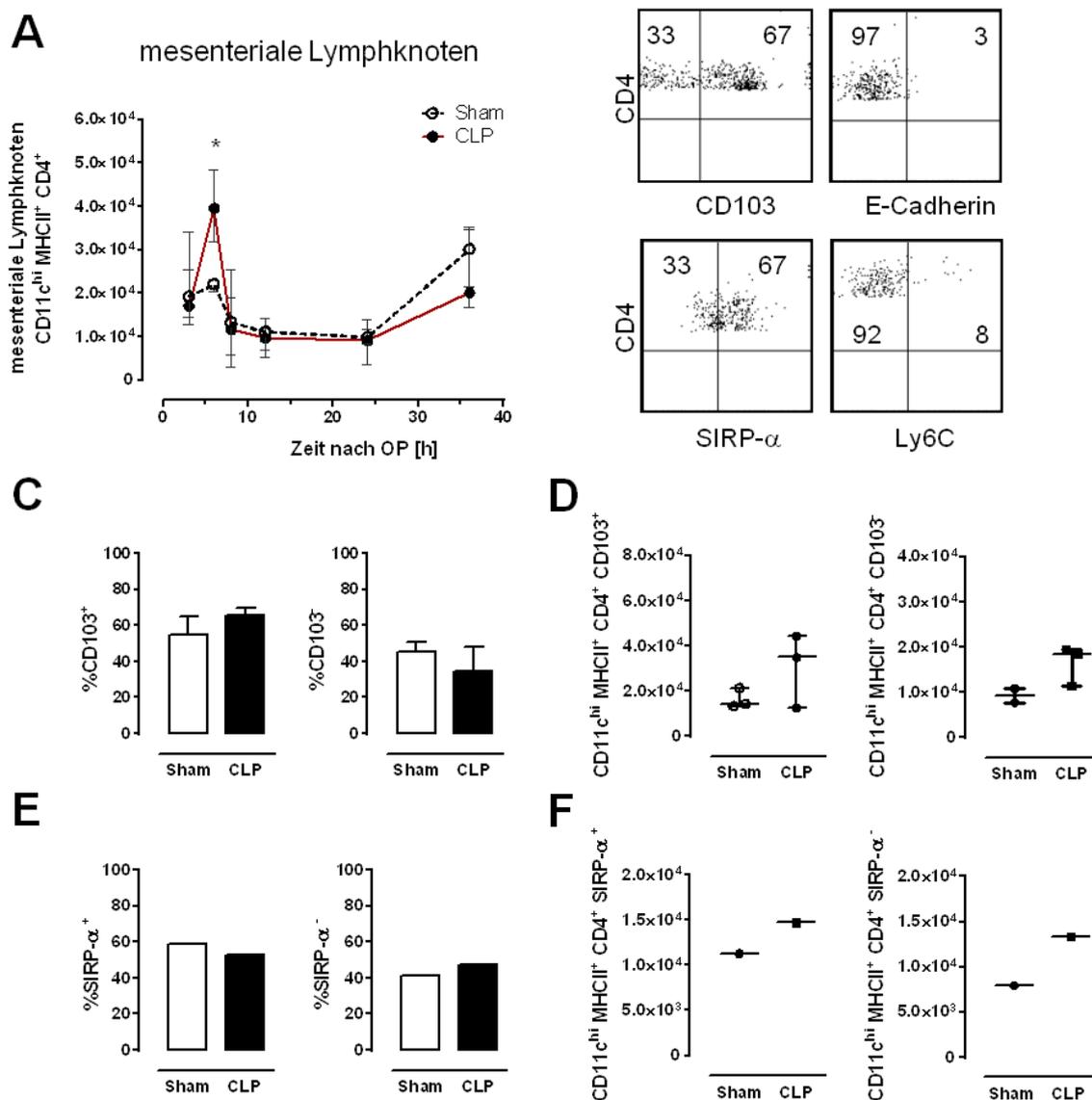


Abbildung 4. 12 **Zeitliche Änderung der Zahl  $CD4^+DC$  in den mesenterialen Lymphknoten während Sepsis.** Zwischen 3 h und 96 h nach Sham- bzw. CLP-Operation (OP) wurden die mesenterialen Lymphknoten durchflusszytometrisch auf  $CD4^+DC$  und deren Expression von SIRP- $\alpha$ , CD103, E-Cadherin und Ly6C analysiert. Dargestellt ist die Zahl  $CD4^+DC$  pro Maus nach Sham - (gestrichelte Linie) bzw. CLP-OP (rote Linie) als Median der Einzeltiere und Interquartilsabstand aus 2 (3, 6, 12 und 24 h) bzw. 3 (8 und 36 h) Experimenten mit jeweils 1-5 Tieren pro Gruppe (A). Statistische Unterschiede wurden mittels Holm-Sidak-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ . Weitere Abbildungen beziehen sich auf  $CD4^+DC$  in den mesenterialen Lymphknoten 6 h nach CLP- oder Sham-OP. Exemplarische Dot-Plots zeigen die prozentuale Expression von CD103, E-Cadherin, SIRP- $\alpha$  und Ly6C auf  $CD4^+DC$  (B). Der prozentuale Anteil  $CD103^+$  und  $CD103^-$  Zellen von allen  $CD4^+DC$  aus 2 Experimenten mit  $n=1-2$  Versuchstieren ist dargestellt als Balkendiagramm des Medians mit Interquartilsabstand (C). Die absoluten Zellzahlen der  $CD103^+CD4^+DC$ , sowie der  $CD103^-CD4^+DC$  sind dargestellt als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 2 Experimenten mit  $n=1-2$  Versuchstieren (D). In einem anderen Experiment wurden 6 h nach CLP- oder Sham OP der prozentuale Anteil (E) und die absoluten Zellzahlen (F) der SIRP- $\alpha^+$  und SIRP- $\alpha^-$  Zellen von allen  $CD4^+DC$  bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Wert einer vereinigten Messung eines vorläufigen Experimentes ( $n=2$  Tiere).

#### **4.2.5 Frühe Akkumulation von CD4<sup>+</sup> DC in der Milz und dem Blut gefolgt von einem starken Zellverlust in der Milz**

Die Milz beherbergt ein großes Reservoir an CD4<sup>+</sup>cDC und könnte möglicherweise mit dem Erscheinen der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark in Verbindung stehen. Die Analyse der Zahl der CD4<sup>+</sup>DC im Verlauf der Sepsis zeigte, dass es sechs Stunden nach CLP einen tendenziellen Anstieg CD4<sup>+</sup>DC von durchschnittlich  $5,6 \times 10^5$  Zellen in der Sham-Gruppe auf  $7,5 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>DC in der CLP-Gruppe gab. Die Sham-OP beeinflusste die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC in der Milz nicht wesentlich. Der frühe tendenzielle Anstieg der CD4<sup>+</sup>DC während der Sepsis war zum nächsten Zeitpunkt (acht Stunden) nicht mehr vorhanden. Vierundzwanzig Stunden nach CLP sank die Anzahl der CD4<sup>+</sup>DC deutlich ab und entsprach vier Tage nach CLP nur noch 6,5% der DC-Zahl der Sham-Gruppe (Abb. 4.13A). Die starke Reduktion CD4<sup>+</sup>DC in der Milz zwischen 24 Stunden und 36 Stunden erfolgte simultan mit der Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark septischer Tiere. Die CD4<sup>+</sup>DC in der Milz waren SIRP- $\alpha^+$  und exprimierten nahezu kein CD103, E-Cadherin, oder Ly6C (Abb. 4.13B). Im Blut septischer Tiere ließ sich zwölf Stunden nach CLP ein durchschnittlicher prozentualer Anstieg der CD4<sup>+</sup>DC von 0,008% der Sham-Gruppe auf 0,06% der zellulären Bestandteile des Blutes feststellen. Nachfolgend blieb der durchschnittliche Anteil CD4<sup>+</sup>DC im Blut bei durchschnittlich 0,03% erhöht (Abb. 4.13C).

In der frühen Phase der Sepsis (sechs Stunden bis zwölf Stunden nach CLP) kam es zu einer transienten Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC, mit ähnlichem Phänotyp, wie die im Knochenmark identifizierten DC, in den mesenterialen Lymphknoten, dem Blut und der Milz. Die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark wurde von der drastischen Reduktion dieser Population in der Milz begleitet.

#### **4.3 Herkunft zirkulierender CD4<sup>+</sup> DC**

Die transiente Akkumulation von CD4<sup>+</sup>DC unterstützt die Annahme, dass es während der akuten Phase der Sepsis zur Migration CD4<sup>+</sup>DC, ausgehend von lymphoiden Organen, hin zum Knochenmark kommt.

Der frühe Anstieg der CD4<sup>+</sup>DC in den mesenterialen Lymphknoten könnte auf eine Passage der CD4<sup>+</sup>DC durch diese sekundären lymphoiden Organe auf dem Weg in das Knochenmark hinweisen. Um diese Annahme zu prüfen wurde 3 Wochen vor Sham- bzw. CLP-Operation eine Adenektomie der mesenterialen Lymphknoten oder als Kontrolle eine Laparotomie durchgeführt.

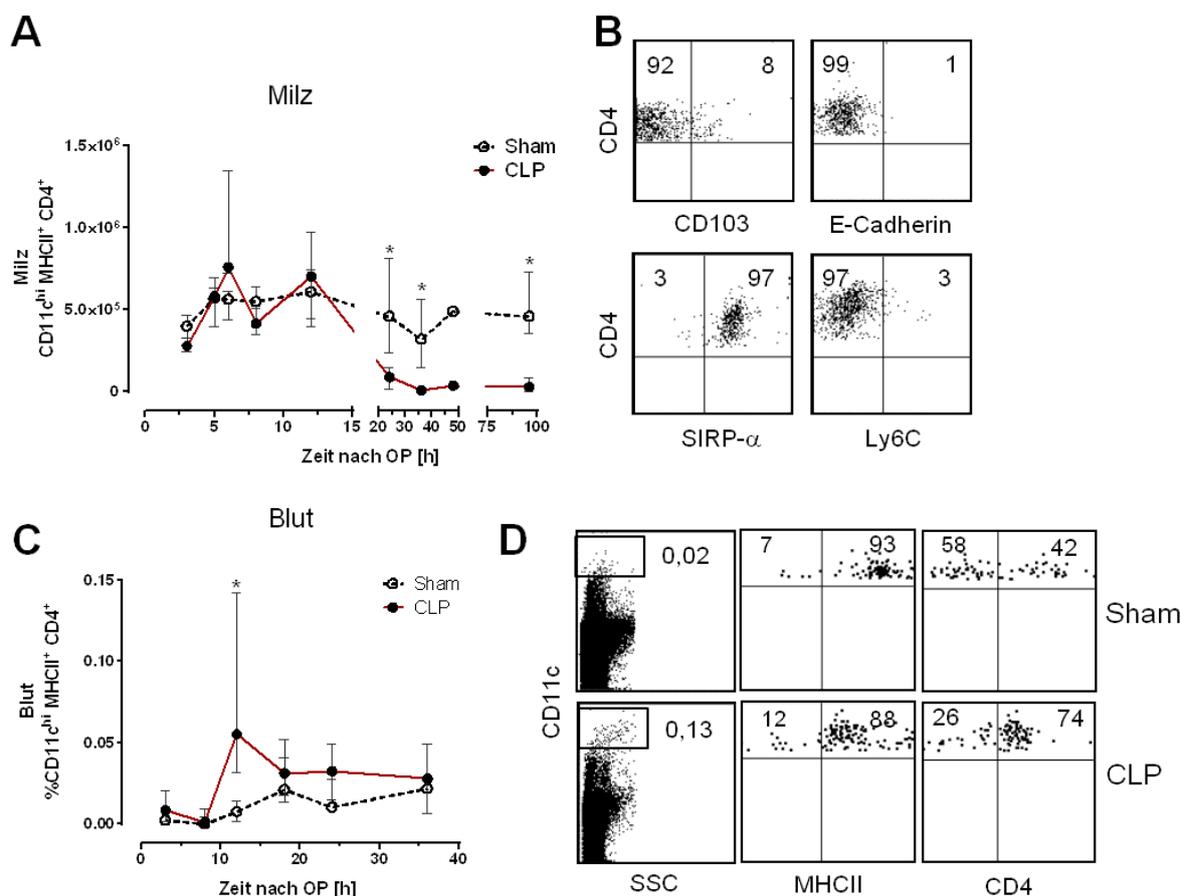


Abbildung 4. 13 **Zeitliche Änderung der Zahl CD4<sup>+</sup>DC in der Milz und im Blut während Sepsis.** Zwischen 3 h und 96 h nach Sham- bzw. CLP-Operation (OP) wurden die Milz sowie das Blut durchflusszytometrisch auf CD4<sup>+</sup>DC hin untersucht. Die CD4<sup>+</sup>DC der Milz wurden zusätzlich auch bzgl. ihrer Expression von SIRP- $\alpha$ , CD103, E-Cadherin und Ly6C analysiert. Dargestellt ist die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC in der Milz nach Sham- (gestrichelte Linie) bzw. CLP-OP (rote Linie). Gezeigt ist der entsprechendem Median der Einzelwerte und Interquartilsabstand aus 1 Experiment mit n=1 Versuchstier (48h), sowie 2 (3, 5, 6 und 96 h), 3 (8 und 12h), bzw. 4 (36 h) Experimenten mit 2-5 Tieren pro Gruppe (A). Exemplarische Dot-Plots zeigen die Expression von CD103, E-Cadherin, SIRP- $\alpha$  und Ly6C auf CD4<sup>+</sup>DC 6 h nach CLP in der Milz (B) Zur Abgrenzung positiver Zellen wurden Isotypkontrollen verwendet (nicht gezeigt). Der prozentuale Anteil an Gesamtleukozyten im Blut ist dargestellt als Median mit Interquartilsabstand aus 1 (3, 18 und 36 h), 2 (24 h), bzw. 3 (8 und 12 h) Experimenten mit 2-5 Tieren pro Gruppe (C). Die Abbildungen zeigen die Gating-Strategie mit Angabe der Prozentwerte CD4<sup>+</sup>DC im Blut nach Sham- oder CLP-OP (D). Statistische Unterschiede wurden mittels Holm-Sidak-Test ermittelt; \*, p<0,05.

Das hier gezeigte, einmalige Experiment zeigte im Gegensatz zu anderen Experimenten nur einen leichten Anstieg der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark in der septischen Laparotomie-Gruppe. Beide CLP-Gruppen zeigten jedoch große Schwankungen. Dadurch lassen sich keine eindeutigen Aussagen bezüglich dieses Versuchsergebnisses treffen. Prozentual war jedoch ein Anstieg CD4<sup>+</sup> Zellen der Adenektomiegruppe von 12 % auf 19 % und der Laparotomiegruppe von 13 % auf 17 % messbar, bezogen auf die Population der MHCII<sup>+</sup>DC (Abb. 4.14A). In der Gruppe der Kontrolllaparotomie kam es zur bereits beschriebenen Verdopplung der Anzahl an CD4<sup>+</sup>T-Zellen nach CLP. Nach Adenektomie zeigte sich nur ein leichter Anstieg

von durchschnittlich  $1,13 \times 10^5$  auf  $1,74 \times 10^5$   $CD4^+$ T-Zellen, ebenfalls mit großen Schwankungen der Einzelwerte (Abb. 4.14B). Dies weist darauf hin, dass die Stärke der ausgelösten Sepsis unterschiedlich innerhalb der Einzeltiere ausfiel. Zeitgleich kam es in beiden CLP-Gruppen zu einer signifikanten Reduktion  $CD4^+$ DC in der Milz. Zudem reduzierte sich auch die Zahl  $CD4^+$ DC der Sham-Gruppe von  $4 \times 10^5$  Zellen der Kontrolllaparotomie auf  $0,9 \times 10^5$  Zellen nach Adenektomie (Abb. 4.14C). Bei diesem gezeigten Experiment handelt es sich um ein vorläufiges Ergebnis, das keine eindeutige Einschätzung der Messergebnisse zulässt. Tendenziell scheint die Entfernung der mesenterialen Lymphknoten jedoch keinen direkten Einfluss auf die Akkumulation der  $CD4^+$ DC im Knochenmark während Sepsis zu haben.

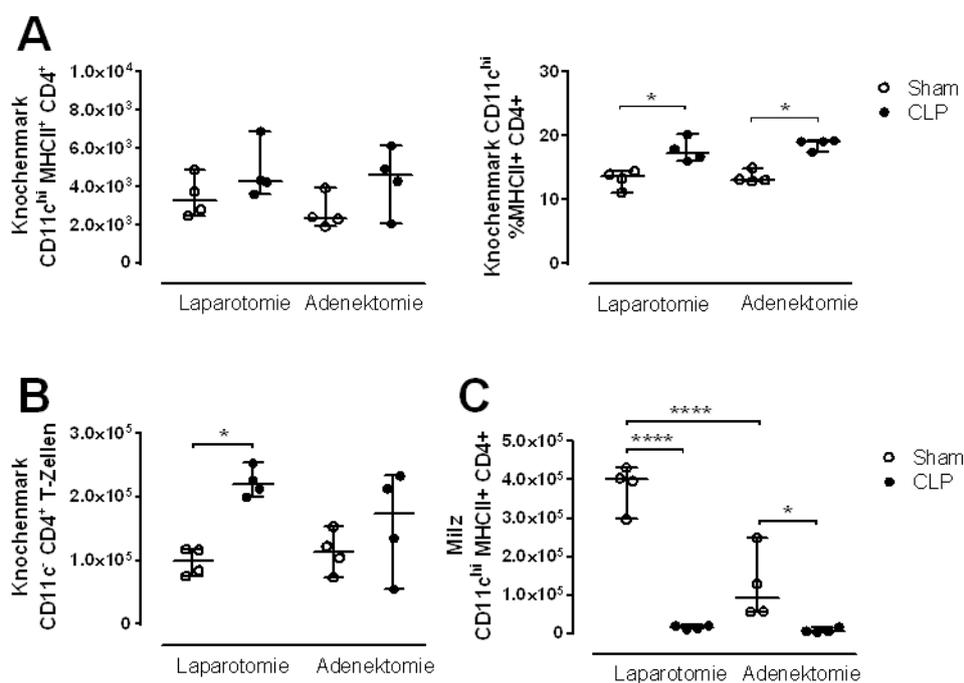


Abbildung 4. 14 **Einfluss der mesenterialen Lymphknoten auf die Akkumulation der  $CD4^+$ DC im Knochenmark während Sepsis.** Vier Wochen vor Sepsisinduktion wurden die mesenterialen Lymphknoten chirurgisch entfernt oder eine Kontrolllaparotomie durchgeführt. Sechsendreißig Stunden nach Sham- bzw. CLP-Operation (OP) beider Gruppen wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch bezüglich  $CD4^+$ DC und  $CD4^+$ T-Zellen charakterisiert. Gezeigt sind die absoluten Zahlen der  $CD4^+$ DC und der prozentuale Anteil an  $CD4^+$ DC an der Gesamtheit der DC (A), sowie die Zahl  $CD4^+$ T-Zellen im Knochenmark (B) und der Milz (C) Dargestellt sind der Median der Einzeltierwerte mit Interquartilsabstand eines vorläufigen Experiments mit 4 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,001$ .

Die mesenterialen Lymphknoten hatten keinen Einfluss auf das Erscheinen der  $CD4^+$ DC im Knochenmark, könnten aber nach Passage der Lymphknoten einen Einfluss auf die Differenzierung der DC im Knochenmark nehmen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die mesenterialen Lymphknoten chirurgisch entfernt oder eine Kontrolllaparotomie durchgeführt. Vier Wochen später wurden Tiere jeder Gruppen einer Sham- bzw. CLP-Operation unterzogen. Nach vier Tagen

wurden Zellen des Knochenmarks und der Milz durchflusszytometrisch untersucht. Aus dem Knochenmark über acht Tage mittels GM-CSF generierte BMDC wurden zudem nach *in vitro* Stimulation mit CpG, auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht. Vier Tage nach OP ließ sich im Knochenmark der Sham-Gruppe nach Adenektomie eine leicht verringerte Zahl CD4<sup>+</sup>DC, im Vergleich zur Sham-Gruppe nach Kontrolllaparotomie feststellen. Die Tiere nach Adenektomie, sowie Kontrolllaparotomie zeigten vier Tage nach Sepsisinduktion im Vergleich zu der jeweiligen Sham-Gruppe eine Verringerung der Zahl CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark (Abb. 4.15A). Begleitet wurde dies von der starken Reduktion CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Abb. 4.15B). Auch hier gab es innerhalb der Einzelwerte der Sham-Gruppe nach Adenektomie große Schwankungen.

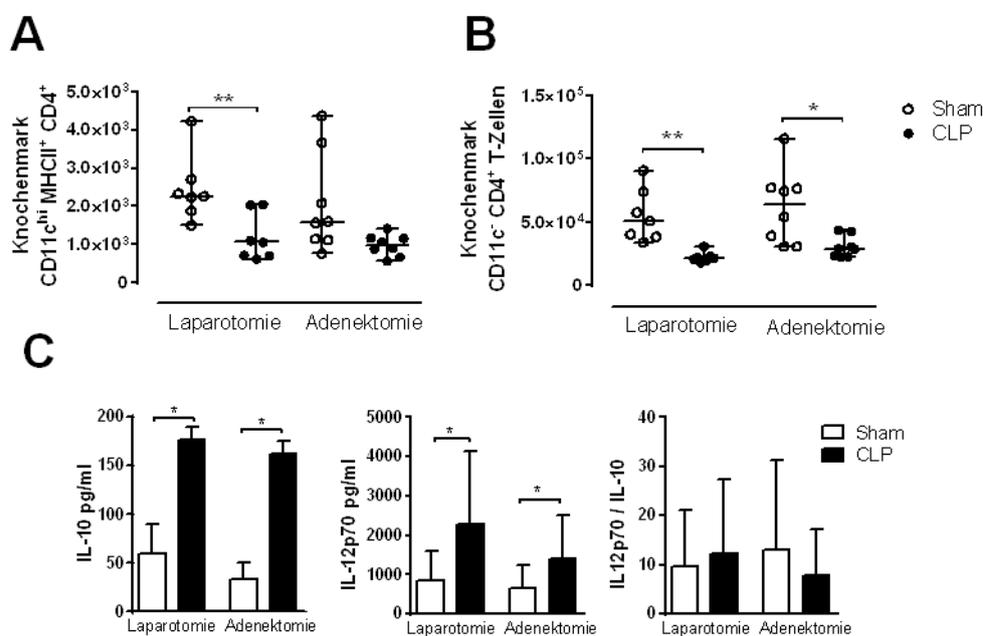


Abbildung 4. 15 **Einfluss der Entfernung der mesenterialen Lymphknoten auf die post-septische DC-Differenzierung.** Vier Wochen vor Sepsisinduktion wurden die mesenterialen Lymphknoten chirurgisch entfernt oder eine Kontrolllaparotomie durchgeführt. Vier Tage nach Sham- bzw. CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch bezüglich CD4, MHCII und CD11c charakterisiert. Dargestellt sind die Absolutzahlen CD4<sup>+</sup>DC (A), sowie die Zahl CD4<sup>+</sup>T-Zellen (B) im Knochenmark als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 2 Experimenten mit 3-4 Tieren pro Gruppe. Das Knochenmark wurde pro Gruppe vereinigt und BMDC über 8 Tage mittels GM-CSF generiert und über Nacht mit CpG *in vitro* stimuliert. Im Überstand wurden die Zytokinmengen von IL-10 und IL-12 mittels ELISA bestimmt, sowie das Verhältnis zwischen IL-12 und IL-10 berechnet. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01.

Vier Tage nach CLP generierte BMDC produzierten sowohl nach Adenektomie, als auch nach Kontrolllaparotomie, charakteristisch, postseptisch erhöhte Mengen IL-10. Starke Schwankungen innerhalb beider CLP-Gruppen bezüglich der IL-12-Produktion lassen jedoch keine eindeutige Beschreibung des Verhältnisses von IL-12 zu IL-10 und damit keine eindeutige Aussage zu, ob es zu einer Verschiebung der

Zytokinbalance kam (Abb. 4.15C).

Vier Tage nach Sepsisinduktion reduzierte sich die Zahl  $CD4^+DC$  in der Milz sowohl in der Gruppe der Lymphadenektomie als auch nach Kontrolllaparotomie (Abb. 4.16A). Die Gruppe der Lymphadenektomie zeigte nach Sepsisinduktion große Schwankungen in der Zahl  $CD4^+T$ -Zellen, die jedoch nach Kontrolllaparotomie signifikant reduziert waren (Abb. 4.16B). Lymphozyten der Milz sind postseptisch supprimiert in der Produktion des Inflammatorischen Zytokins  $IFN-\gamma$ . Die Adenektomie der mesenterialen Lymphknoten führte zudem zu einer tendenziellen Beeinträchtigung der  $IFN-\gamma$ -Produktion innerhalb der Sham-Gruppe (Abb. 4.16C)

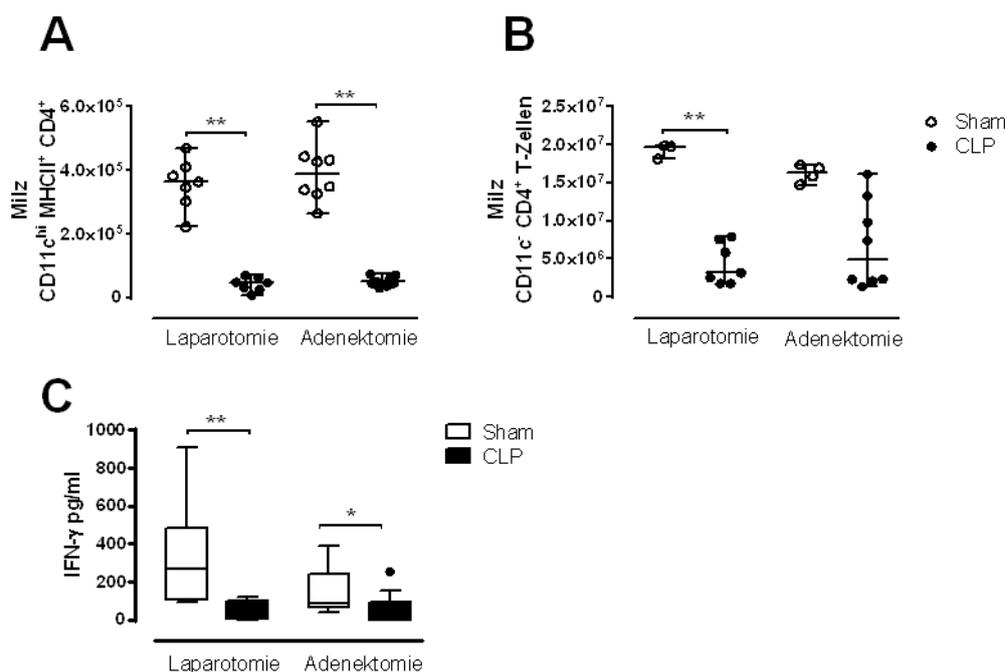
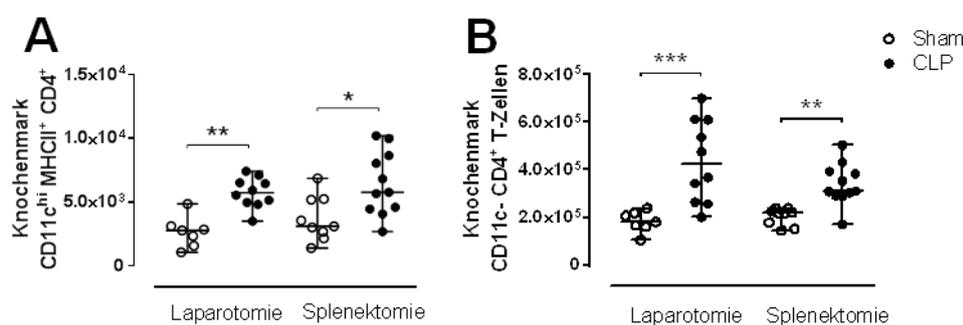


Abbildung 4. 16 **Einfluss der Entfernung der mesenterialen Lymphknoten auf die postseptische Immunsuppression von Leukozyten in der Milz.** Vier Wochen vor Sham- oder CLP-Operation (OP) wurden die mesenterialen Lymphknoten chirurgisch entfernt oder eine Kontrolllaparotomie durchgeführt. Vier Tage nach Sham- oder CLP-OP wurden die Milzzellen isoliert und durchflusszytometrisch bezüglich CD4, MHCII und CD11c charakterisiert. Dargestellt sind die Absolutzahlen  $CD4^+DC$  (A), sowie die Zahl  $CD4^+T$ -Zellen (B) der Milz nach Adenektomie oder Kontrolllaparotomie und jeweiliger Sepsisinduktion oder Sham-OP. Gezeigt sind die Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 2 Experimenten mit 3-4 Tieren pro Gruppe. Die Milzzellen wurden über Nacht in vitro mit CpG stimuliert. Im Überstand wurde  $IFN-\gamma$  mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Triplikate pro Versuchstier mit Standardabweichung eines Experiments mit 3-4 Tieren pro Gruppe (C). Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

Der Einfluss der mesenterialen Lymphknoten auf die Wanderung  $CD4^+DC$  und deren Einfluss auf die Differenzierung dysfunktionaler DC nach polymikrobieller Sepsis kann nicht eindeutig definiert werden, da die Ergebnisse große Schwankungen aufwiesen. Tendenziell scheint die Entfernung der mesenterialen Lymphknoten jedoch keinen Einfluss auf die Wanderung  $CD4^+DC$ , oder die Ausbildung der DC-

Dysfunktion zu haben. Die Milz ist ein großes Reservoir  $CD4^+DC$ . Um festzustellen, ob  $CD4^+DC$  während Sepsis aus der Milz in das Knochenmark wandern wurde diese vier Wochen vor Sham- oder CLP-OP durch Splenektomie chirurgisch entfernt.

Sowohl in der Gruppe der Kontrolllaparotomie als auch in der Gruppe der Splenektomie verdoppelte sich im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe die Zahl der  $CD4^+DC$  im Knochenmark 36 Stunden nach CLP (Abb. 4.17A). In beiden Versuchsgruppen, die einer CLP unterzogen wurden, kam es auch zur Akkumulation der  $CD4^+T$ -Zellen, jedoch war diese in der Gruppe der splenektomierten Mäuse tendenziell etwas schwächer ausgeprägt (Abb. 4.17B).



Abbildungung 4. 17 **Einfluss der Milz auf die Akkumulation  $CD4^+DC$  im Knochenmark während Sepsis.** Vier Wochen vor Sham- bzw. CLP-Operation (OP) wurde die Milz chirurgisch entfernt oder eine Kontrolllaparotomie durchgeführt. Sechsendreißig Stunden nach der anschließenden Sham- bzw. CLP-OP wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch bezüglich  $CD4^+DC$  und  $CD4^+T$ -Zellen charakterisiert. Dargestellt sind die Zahlen der  $CD4^+DC$  (A) sowie die Zahlen der  $CD4^+T$ -Zellen (B) im Knochenmark nach Splenektomie oder Kontrolllaparotomie und entsprechender Sham- oder CLP-OP. Gezeigt sind die Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 2 Experimenten mit 3-6 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ .

Durch die Untersuchung der akuten Phase der Sepsis in splenektomierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es trotz Fehlens dieses Organs zu einer Akkumulation  $CD4^+DC$  im Knochenmark kam. Die Milz kann somit als Ursprungsort der  $CD4^+DC$  im Knochenmark während Sepsis ausgeschlossen werden.

#### 4.4 TLR-abhängige Verteilung $CD4^+DC$ und $CD4^+T$ -Zellen in lymphoiden Organen

Die Auslöser der polymikrobiellen Sepsis sind gram-positive und gram-negative Bakterien. Diese werden vornehmlich über TLR2 und TLR4 erkannt. Die Signaltransduktion des TLR4 wird vermittelt über die Adaptermoleküle MyD88 und TRIF und bezüglich des TLR2 ausschließlich über MyD88. Um den Einfluss der TLR-abhängigen Pathogenerkennung auf die Akkumulation der  $CD4^+DC$  im Knochenmark zu untersuchen, wurden TLR4-, TLR2-, TLR2/4-, sowie MyD88-defiziente Mäuse einer CLP- oder Sham-Operation unterzogen und nach 24 Stunden das

Knochenmark sowie die Milz durchflusszytometrisch untersucht.

Die Sepsisinduktion in TLR4-defizienten Mäusen führte nach 24 Stunden, ähnlich wie bei Wildtypmäusen, zur signifikanten Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC, sowie CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark, sowie der Depletion beider Zellpopulationen in der Milz

(Abb.4.18A-C). Die Zahlen der CD4<sup>+</sup>DC sowie der CD4<sup>+</sup>T-Zellen in den TLR2- sowie TLR2/4-defizienten Mäusen wiesen starke Schwankungen auf und erlaubten daher keine eindeutige Aussage. Die Sepsisinduktion in MyD88-defizienten Mäusen führte zu keiner Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark. Der Anstieg der CD4<sup>+</sup>T-Zellen bliebe in diesem Stamm jedoch unbeeinflusst. In der Milz der MyD88-defizienten Mäuse konnte eine tendenzielle aber nicht signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup>DC aber nicht der CD4<sup>+</sup>T-Zellen festgestellt werden. Jedoch unterlagen die Einzelwerte in den Experimenten auch hier großen Schwankungen.

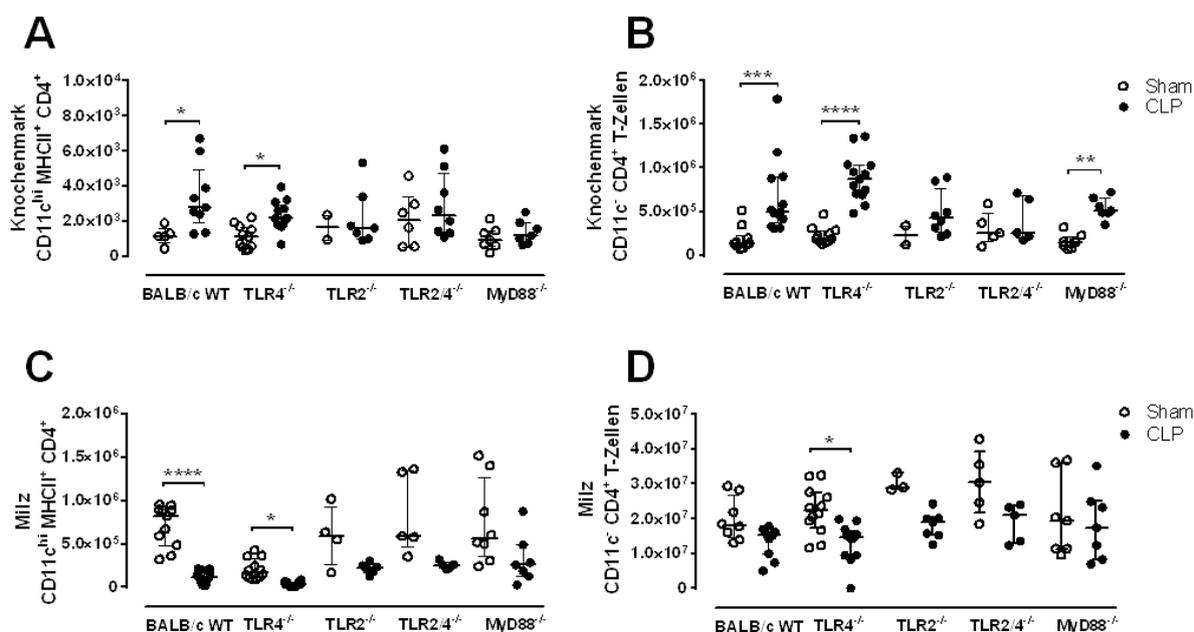


Abbildung 4. 18 **Einfluss der TLR-Signaltransduktion auf die Akkumulation von CD4<sup>+</sup> DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark und in der Milz.** BALB/c WT-, TLR4<sup>-/-</sup> -, TLR2<sup>-/-</sup> -, TLR2/4<sup>-/-</sup> - und MyD88<sup>-/-</sup> -Mäuse wurden einer Sham- bzw. CLP-Operation unterzogen. Sechszunddreißig Stunden später wurden Knochenmark und Milzen isoliert und durchflusszytometrisch anhand der CD11c-, MHCII-, sowie CD4-Expression charakterisiert. Gezeigt ist die Anzahl CD4<sup>+</sup>DC (A) und CD4<sup>+</sup>T-Zellen (B) im Knochenmark sowie die Anzahl der CD4<sup>+</sup>DC (C), und CD4<sup>+</sup>T-Zellen (D) in der Milz. Dargestellt ist der Median der Einzelwerte mit Interquartilsabstand aus 3 (TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR2/4<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>) Experimenten mit 1-4 Tieren bzw. 5 (BALB/c WT) Experimenten mit 1-2 Tieren. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,005 \*\*\*\*, p<0,001.

Die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark 36 Stunden nach Sepsisinduktion scheint MyD88-abhängig und teilweise TLR2-vermittelt zu sein. MyD88 und TLR2 haben jedoch keinen Einfluss auf den Anstieg der CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

#### 4.5 S1P-vermittelte Wanderung von CD4<sup>+</sup>DC während Sepsis

Unter inflammatorischen Bedingungen wandern migratorische DC über die Lymphbahn CCR7-abhängig in die nächst gelegenen Lymphknoten. Lymphozyten sind in der Lage sich über den S1P-Gradienten im Blut über die Blutbahn im Organismus zu verteilen. Auch DC exprimieren die S1P-Rezeptoren, 1-5 [41]. Es wurde untersucht, ob auch DC während polymikrobieller Sepsis, S1P-abhängig über die Blutbahn wandern und über diesen Weg im Knochenmark akkumulieren können. Die S1P-Rezeptoren 1,3,4 und 5 können über die Applikation des S1P-Analogons FTY720 blockiert werden. Im Falle des S1PR1 kommt es zur langanhaltenden Internalisierung und Degradation des Rezeptors [5]. Dies bewirkt eine langanhaltende Lymphopenie. Sechs Stunden nach CLP und vorheriger Applikation des S1P-Analogons FTY720 blieb die Zahl der CD4<sup>+</sup>DC in der Milz unverändert im Vergleich zur FTY-behandelten Sham-Gruppe. Jedoch zeigt diese eine leicht erhöhte CD4<sup>+</sup>DC-Zahl im Vergleich zur Sham-Gruppe ohne FTY720-Applikation (Abb. 4.19A).

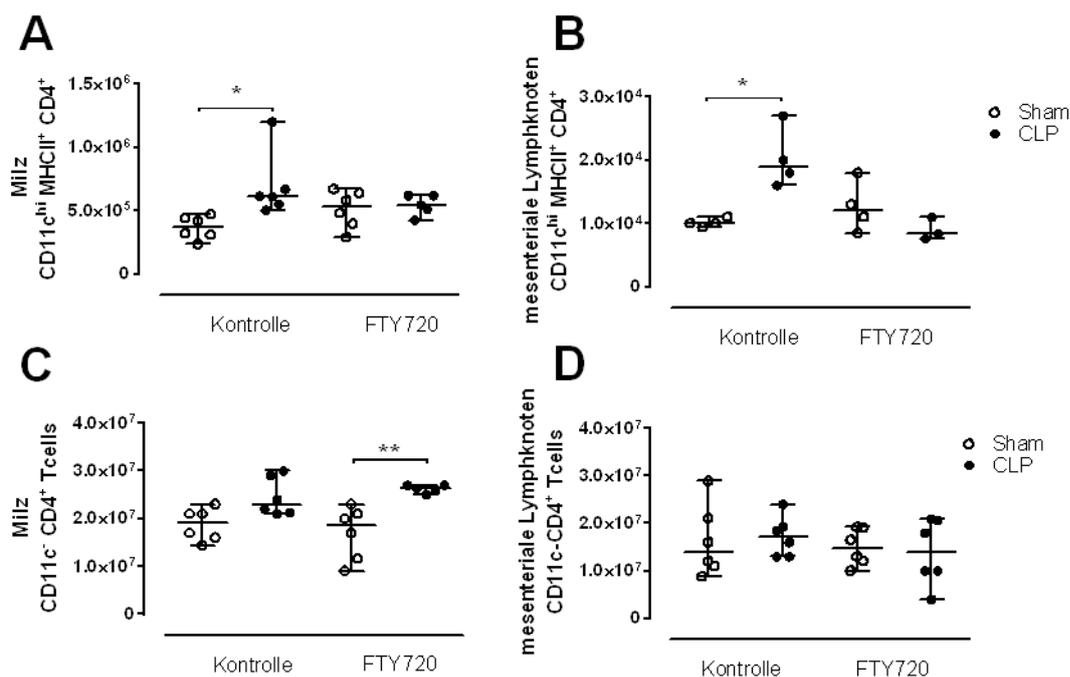


Abbildung 4. 19 **Systemische Blockade von S1PR verhindert die frühe transiente Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten.** Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrolllaparotomie wurden 2 mg/kg-Körpergewicht des S1PR-Blockers FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Sechs Stunden nach Sepsisinduktion wurden Milz und mesenteriale Lymphknoten isoliert und durchflusszytometrisch anhand CD11c-, MHCII-, sowie CD4-Expression charakterisiert. Dargestellt sind die Zahl CD4<sup>+</sup>DC (A/C), sowie die Zahl CD4<sup>+</sup>T-Zellen (B/D) der Milz und der mesenterialen Lymphknoten als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 3 Experimenten mit 2 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01.

Zeitgleich führte die Sepsisinduktion in der Kontrollgruppe, wie bereits beschrieben zur Erhöhung der CD4<sup>+</sup>DC in der Milz (Abb. 4.19C). In den mesenterialen Lymphknoten wurde ebenfalls der Anstieg CD4<sup>+</sup>DC durch FTY720-Applikation verhindert (Abb. 4.19B). Zeitgleich verstärkte sich der, bei den Kontrolltieren leicht auftretende Anstieg CD4<sup>+</sup>T-Zellen durch FTY720-Gabe, wohingegen es zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Zahl CD4<sup>+</sup>T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten gibt (Abb. 4.19D). Sechszwanzig Stunden nach Sepsisinduktion konnte die Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark durch zweimalige Applikation von FTY720 verhindert werden (Abb. 4.20A). Zeitgleich tritt eine verstärkte Lymphopenie, also die drastische Reduktion CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Blut auf (Abb. 4.20E). Die Reduktion CD4<sup>+</sup>DC in Milz, sowie den mesenterialen Lymphknoten konnte durch FTY720-Applikation nicht verhindert werden (Abb. 4.20.B-C) Durch die Blockade der S1P-Rezeptoren kam es in den Kontrolltieren zur tendenziellen Akkumulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark (Abb. 4.20D). Hierbei führte die Sepsisinduktion nicht zu einer Verstärkung der Akkumulation, sondern zu einem Verlust von T-Zellen. Dies weist darauf hin, dass unter normalen Bedingungen die Wanderung von neugebildeten T-Zellen aus dem Knochenmark ins Blut durch FTY720 verhindert wird und es während Sepsis bei fehlender Akkumulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark auch zum Fehlen des Anstiegs CD4<sup>+</sup>DC kommt.

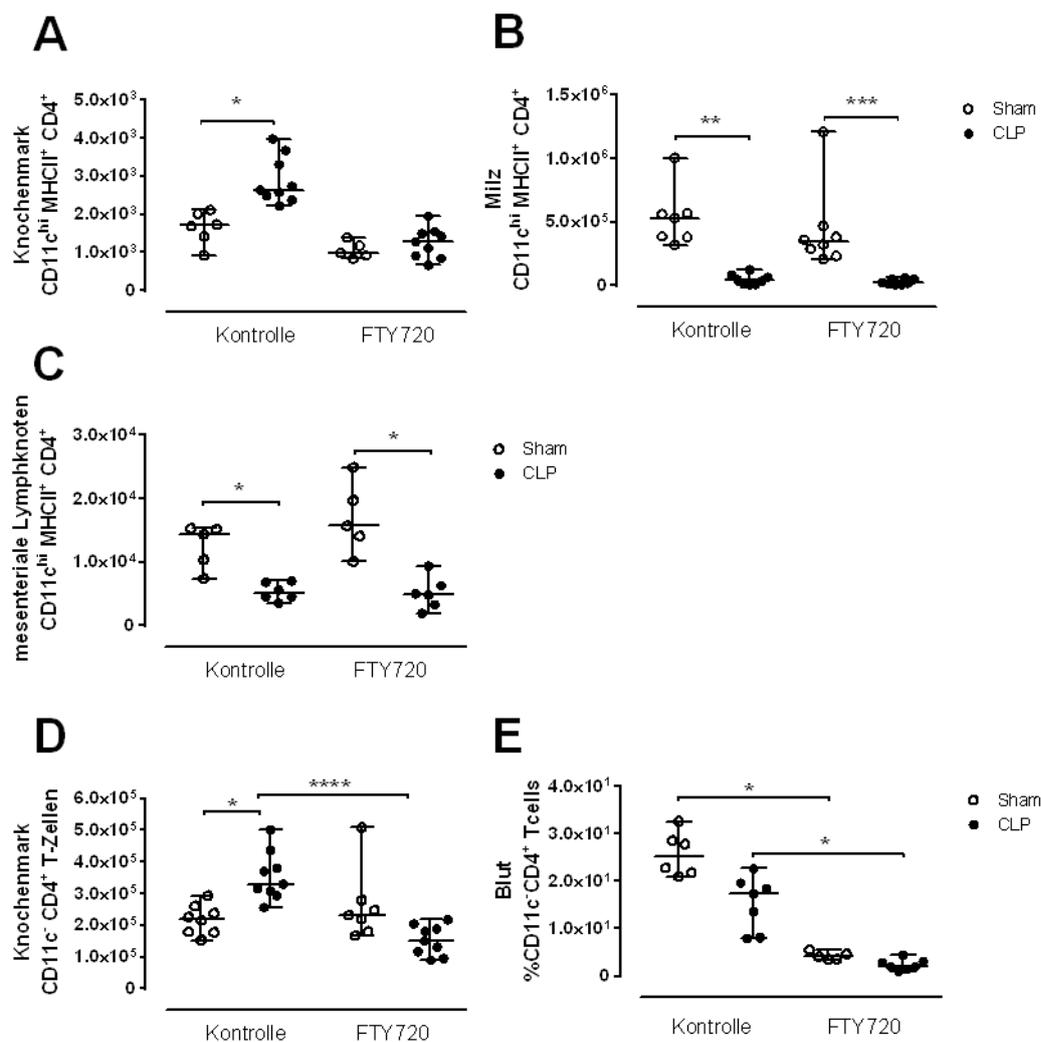


Abbildung 4. 20 **Systemische Blockade von S1PR verhindert die Akkumulation CD4<sup>+</sup> DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark.** Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrolllaparotomie und 12 h später wurden 2 mg/kg-Körpergewicht des S1PR-Blockers FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Sechsdreißig Stunden nach CLP- oder Sham-Operation (OP) wurden Knochenmark, Milz, mesenteriale Lymphknoten und Blut isoliert und durchflusszytometrisch anhand CD11c-, MHCII-, sowie CD4-Expression charakterisiert. Dargestellt sind die Zahl CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark (A), der Milz (B) und den mesenterialen Lymphknoten (C), sowie die Zahl CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark (D) und deren prozentualer Anteil im Blut (E). Dargestellt sind die Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 3 Experimenten mit 1-5 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001.

Simultan zur Blockade der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark wurden auch alle betrachteten Subtypen von Monozyten im Knochenmark durch FTY720-Gabe während Sepsis verringert (Abb.4.21A-D). Unter Kontrollbedingungen führt die Blockade von S1PR zur tendenziellen Akkumulation patroulierender Monozyten, sowie Ly6C<sup>int</sup>MoDC (Abb. 4.21A/D). Hierbei handelte es sich jedoch nur um ein vorläufiges Experiment, dessen Aussage durch Wiederholung bestätigt werden muss.

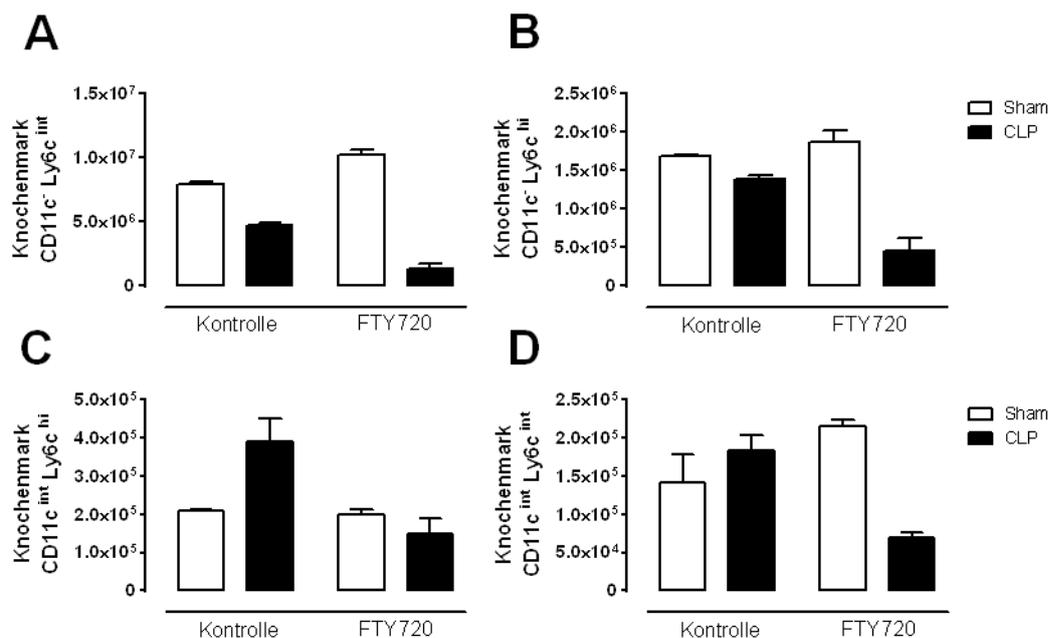


Abbildung 4. 21 **Einfluss der systemischen Blockade von S1PR auf Monozytenpopulationen im Knochenmark.** Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrolllaparotomie und 12h später wurden 2 mg/kg-Körpergewicht des S1PR-Blockers FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Sechszwanzig Stunden nach Sham- oder CLP-Operation (OP) wurde das Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch anhand CD11c- und Ly6C-Expression charakterisiert. Dargestellt sind die Absolutzahlen CD11c<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> (A) und CD11c<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten, (B) sowie CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (C) und CD11c<sup>int</sup>Ly6C<sup>int</sup> MoDC (D) im Knochenmark als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand eines Experiments mit 2 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden auf Grund zu kleiner Gruppengrößen nicht untersucht.

Die Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark ist verbunden mit der Ausbildung dysfunktionaler DC, die 4d nach Sepsisinduktion zur Vermittlung der Immunsuppression durch verstärkte IL-10 Produktion beitragen.

Um die Auswirkung der Blockade der S1P-abhängigen Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark auf die Ausbildung der DC-Dysfunktion zu untersuchen, wurden das Knochenmark und die Milz 4 Tage nach Sepsisinduktion durchflusszytometrisch untersucht. Hier konnte sowohl mit, als auch ohne vorherige Applikation des FTY720 ein Verlust CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark sowie der Milz festgestellt werden (Abb. 4.22A/B). FTY720 führte zu einer tendenziellen Reduktion der CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark innerhalb der Sham-Gruppe (Abb. 4.22C). Beide betrachteten CLP-Gruppen reduzierten die Zahl der CD4<sup>+</sup>T-Zellen auf das gleiche Niveau, somit konnte in diesem Fall keine Auswirkung durch die S1P-Blockade festgestellt werden. In der Milz kam es nach Sepsisinduktion zum Verlust CD4<sup>+</sup>T-Zellen in beiden betrachteten Gruppen und keiner Beeinträchtigung der Zellzahl unter Sham-Bedingungen und FTY720-Gabe (Abb. 4.22D).

Die Applikation des S1P-Analogons FTY-720 führte 4 Tage nach Sepsisinduktion zu keiner Beeinträchtigung der Depletion von CD4<sup>+</sup>DC und CD4<sup>+</sup>T-Zellen in

Knochenmark und der Milz, jedoch zu einem generellen Verlust von T-Zellen im Knochenmark unter Sham-Bedingungen.

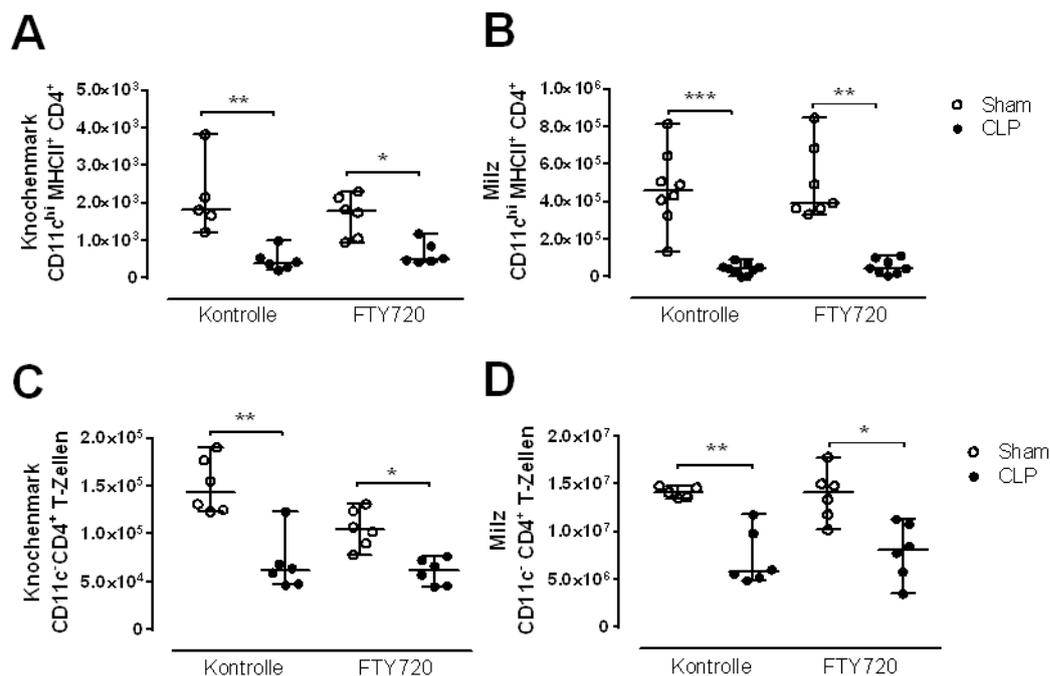


Abbildung 4. 22 **Einfluss systemischer Blockade von S1PR auf die Zahl CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark und der Milz 4 Tage nach Sepsisinduktion.** Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrolllaparotomie und 24 h später wurden 2 mg/kg des S1PR-Blocker FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Vier Tage nach Sepsisinduktion wurden Knochenmark und Milz isoliert und durchflusszytometrisch anhand CD11c-, MHCII- und CD4-Expression charakterisiert. Dargestellt sind die Zahl CD4<sup>+</sup>DC (A/B) und die Zahl CD4<sup>+</sup>T-Zellen (C/D) im Knochenmark und der Milz als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 3 Experimenten mit jeweils 2-3 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01.

Postseptische Infektionen betreffen häufig die Atemwege. Sepsis führte in der Lunge nach 4 Tage zu einem Anstieg von Granulozyten (nicht gezeigt) und dem leichten Verlust von NK-Zellen, ohne Auswirkung der vorherigen FTY720-Applikation. Jedoch reduzierte sich die Zahl der CD3<sup>+</sup>T-Zellen in der Gruppe der FTY720-behandelten Sham- sowie CLP-Tiere drastisch um 85 % bzw. 82 %. Die Kontroll-CLP ohne FTY720-Applikation führte dagegen nur zu einem leichten Verlust von durchschnittlich 30 % (Abb. 4.23B). Auf Grund der drastischen Reduktion von T-Zellen 4 Tage nach FTY720-Applikation in der Lunge, wurde zur Untersuchung der postseptischen Immunsuppression keine direkte Sekundärinfektion postseptischer Tiere durchgeführt. Es wurde bereits beschrieben, dass *in vitro* generierte BMDC aus dem Knochenmark postseptischer Tiere die postseptische Immunsuppression auf naive Tiere übertragen und diese dann anfälliger gegenüber der Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* sind [155].

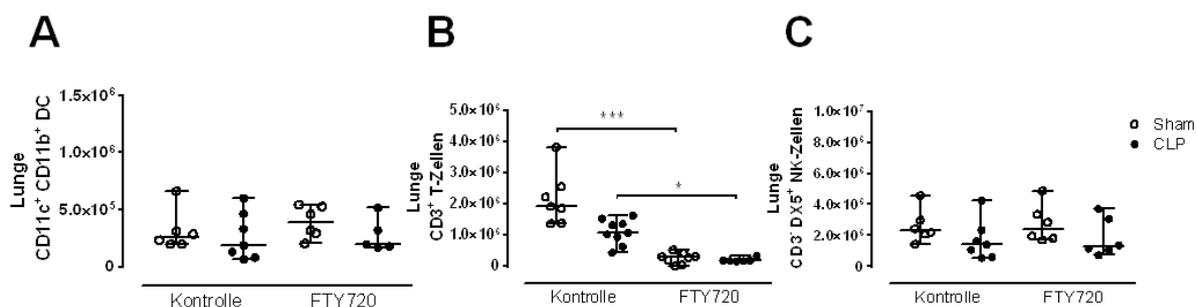


Abbildung 4. 23 **Zelluläre Veränderungen der Lunge nach systemischer Blockade von S1PR 4 Tage nach Sepsisinduktion.** Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrollaparotomie und 24 h später wurden 2 mg/kg des S1PR-Blockers FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Vier Tage nach Sepsisinduktion wurde die Lunge isoliert und durchflusszytometrisch anhand CD11c-, CD11b-, CD3- und DX5-Expression charakterisiert. Dargestellt sind die Zahl CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>DC (A), CD3<sup>+</sup>T-Zellen (B), sowie die Zahl CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> NK-Zellen (C) der Lunge als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand aus 3 Experimenten mit 2-3 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom „Dunn’s multiple comparison“ Test ermittelt; \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005.

Vier Tage nach Sepsisinduktion und zweimaliger Applikation des FTY720 oder der Solvent-Kontrolle wurde das Knochenmark isoliert und über 8 Tage BMDC mittels GM-CSF *in vitro* generiert. Teilweise wurden diese *in vitro* mit CpG stimuliert und anschließend die Zytokinproduktion gemessen, oder zusammen mit einer Infektionsdosis *P. aeruginosa i.n.* in naive Tiere appliziert. Nach *in vitro* Stimulation produzierten BMDC aus FTY720 behandelten, als auch Kontrolltieren 4 Tage nach Sepsisinduktion, gesteigerte Mengen IL-10 im Vergleich zu beiden Sham Gruppen. FTY720-Applikation führte zu postseptischen BMDC die weniger IL-12 produzieren, als nach Kontroll-CLP. Das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 verschob sich dadurch noch weiter, aber nicht signifikant, in Richtung des anti-inflammatorischen IL-10 (Abb. 4.24A). *In vivo* verstärkte FTY720 die Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *P. aeruginosa*, vermittelt durch CLP-BMDC, mit einer durchschnittlichen bakteriellen Beladung der Lungen von  $1,9 \times 10^6$  CFU im Vergleich zu  $7 \times 10^4$  CFU der Tiere, die BMDC generiert aus Tieren mit Kontroll-CLP bekamen. Auch Sham-BMDC nach FTY-720 Applikation führten zu einer höheren bakteriellen Beladung der Lungen von durchschnittlich  $4,5 \times 10^5$  CFU im Vergleich zu durchschnittlich  $1 \times 10^2$  der Sham BMDC der Kontrolltiere (Abb. 4.24B).

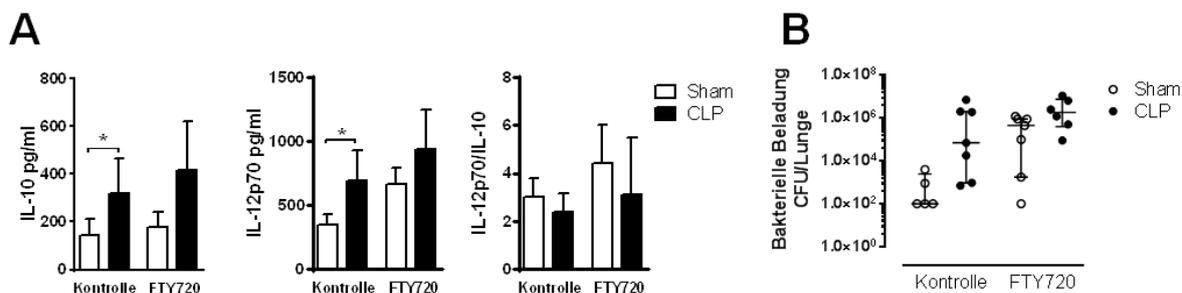


Abbildung 4. 24 Einfluss der systemischen Blockade von S1PR auf die BMDC-Differenzierung im Knochenmark 4 Tage nach Sepsisinduktion. Kurz vor Sepsisinduktion oder Kontrollaparotomie und 24 h später wurden 2 mg/kg des S1PR-Blockers FTY720 oder eine Solvent-Kontrolle intra venös appliziert. Vier Tage nach Sepsisinduktion wurde Knochenmark isoliert und BMDC über 8-10 Tage mittels GM-CSF generiert. Nach in vitro Stimulation über Nacht mit CpG wurden in den Überständen die Zytokinmengen von IL-10 und IL-12 mittels ELISA gemessen und das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 berechnet. Dargestellt sind zusammengefügte Triplikate je Experiment, dreier Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung (A). In naive Tiere wurden  $5 \times 10^8$  CFU *P. aeruginosa* zusammen mit  $1 \times 10^8$  unstimulierten BMDC pro Tier appliziert. Nach 24 h wurden die Lungen isoliert und die bakterielle Beladung bestimmt. Dargestellt ist die bakterielle Beladung pro Lunge in Einzelbestimmung mit Median und Interquartilsabstand zweier Experimente mit  $n=2-4$  Versuchstiere pro Gruppe (B). Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

Die systemische Blockade der S1P-Rezeptoren in vivo scheint die DC-Differenzierung im Knochenmark zu beeinflussen, indem die postseptische DC-Dysfunktion verstärkt wird und auch BMDC generiert aus Sham-Tieren eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *P. aeruginosa* vermitteln.

## 5. Diskussion

Eine effektive Immunantwort resultiert aus dem ausgewogenen Verhältnis von pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen. Sepsis führt zu einer überschießenden Proinflammation, durch starke Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Zeitgleich kommt es zur Entwicklung einer langanhaltenden Immunsuppression. DC sind über die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, der reduzierten Fähigkeit zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und der Hemmung der IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen an der Vermittlung der Immunsuppression beteiligt [155, 156].

Als akute Phase der Sepsis wird der Zeitraum bezeichnet, in dem sich eine systemische bakterielle Beladung nachweisen lässt. Zu diesem Zeitpunkt liegt bereits eine Immunsuppression vor, jedoch überwiegen hier die klinischen Parameter des SIRS. Durch schwere Gewebeschäden auf Grund der Hyperinflammation kommt es hier zu einem frühen Multi-Organversagen und damit verbundener Sterblichkeit.

Die späte post-septische Phase ist charakterisiert durch den starken Verlust von Immunzellen im Blut und lymphoiden Organen. Durch eine fehlerhafte Hämatopoese kommt es vornehmlich zur Neubildung unreifer oder dysfunktionaler Immunzellen, die eine anhaltende Immunsuppression vermitteln. [170]

Die postseptische DC Dysfunktion resultiert aus der veränderten Differenzierung aus Vorläuferzellen im Knochenmark [155]. Vorarbeiten zeigten, dass residente CD11c<sup>+</sup>Zellen im Knochenmark, nach Überstehen der initialen Infektion, einen Einfluss auf die *de novo* Synthese von DC im Knochenmark haben. Hier scheint die im späten Verlauf der Sepsis auftretende Depletion von CD11c<sup>+</sup>Zellen im Knochenmark mit der Ausbildung dysfunktionaler DC assoziiert zu sein [155]. In dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit zelluläre Veränderungen des Knochenmarks in der akuten Phase der Sepsis die DC-Differenzierung im Knochenmark beeinflussen. Dabei kam das Modell der subletalen polymikrobiellen Sepsis (CLP) zum Einsatz.

### 5.1 Sepsis führt rasch zu einer Veränderung der Knochenmark-zusammensetzung

In der späten immunsuppressiven Phase der CLP-induzierten Sepsis wurde bereits ein starker Verlust von T-Zellen und DC im Knochenmark beschrieben [155]. Die akute Phase der Sepsis ließ sich von Beginn bis 36 Stunden nach Sepsisinduktion nachweisen (nicht gezeigt). Zwischen 24 Stunden und 36 Stunden zeigte sich eine

Reduktion der Gesamtknochenmarkzellen, insbesondere von Granulozyten, B-Zellen und klassischen Monozyten (Abb. 4.2; 4.4). Während einer Sepsis werden neutrophile Granulozyten schnell aus dem Knochenmark ausgeschwemmt und wandern zu den Infektionsherden. Ihre Neubildung ist jedoch gestört und führt lediglich zu unreifen Vorläufern. Sechsenddreißig Stunden nach CLP kommt es zu einer Reduktion von Granulozyten im Knochenmark. Die Reduktion der Gesamtknochenmarkzellzahl resultierte, neben dem Verlust von Granulozyten, zudem aus dem Verlust von B-Zellen. (Abb. 4.2) Innerhalb der B-Zellpopulation kam es jedoch zum Anstieg reifer B-Zellen. (Abb. 4.2C) Untersuchungen an Patienten mit schwerer Sepsis zeigten, dass es im Blut zur Apoptose-induzierten Reduktion von B-Zellen kommt und diese verstärkt aktiviert sind [140]. In der hier vorgelegten Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, ob der Verlust von B-Zellen im Knochenmark durch Apoptose hervorgerufen wurde. Des Weiteren wurde auch nicht untersucht, ob es sich bei den stark B220-exprimierenden, reifen B-Zellen um eingewanderte periphere B-Zellen handelt, oder es zu einer verstärkten Reifung von B-Zellen im Knochenmark kam. Chronische, T-Zell-vermittelte Infektionen, wie die entzündliche Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*, IBD), führen, neben der starken Reduktion von B-Zell-Vorläufern, zum verstärkten Einwandern reifer peripherer B-Zellen ins Knochenmark. Dies ist assoziiert mit der Produktion des Makrophagen-Migrations-inhibierenden Faktors (*macrophage migratory inhibiting factor*, MIF) durch perivaskuläre DC im Knochenmark [216]. Die Akkumulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark septischer Tiere könnte somit mit der Einwanderung reifer peripherer B-Zellen in Zusammenhang stehen.

Unter *steady-state*-Bedingungen wandern naive T-Zellen ins Knochenmark und treten dort, in engen Clustern, in Kontakt mit residenten CD11c<sup>+</sup>DC. Diese nehmen Antigene aus dem Blut auf und präsentieren sie über MHC-Antigen-Komplexe den einwandernden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Dabei differenzieren hauptsächlich zytotoxische CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Diese, von sekundären lymphoiden Organen unabhängige, Aktivierung naiver T-Zellen ist sehr effektiv, wobei jedoch keine Toleranz erzeugt wird [57]. Da in der akuten Phase der Sepsis die Mehrheit der CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark den Zellteilungsmarker Ki-67 exprimierte scheint es sich um reife T-Zellen zu handeln. T-Zellen reifen im Thymus und bilden dort einen Pool aus CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>T-Zellen und Tregs, die sich übers Blut im Organismus verteilen. Unter inflammatorischen Bedingungen führt, unter anderem die Produktion von löslichen Mediatoren, wie PGE<sub>2</sub> und TGF-β, zur direkten, aber auch indirekten

Expansion von Tregs. Über die Aktivierung von APC, wie Makrophagen und DC, induziert z.B. PGE<sub>2</sub> indirekt die Differenzierung von Tregs [203]. Trifft dies auf die akute Phase der Sepsis zu, könnte es sich bei den akkumulierenden CD4<sup>+</sup>T-Zellen um Tregs handeln. Weitere Untersuchungen der CD4<sup>+</sup>T-Zell-Population im Knochenmark während Sepsis sollten klären, ob und um welche Art von T-Zell-population es sich hierbei handelt.

T-Zellen haben ihrerseits einen Einfluss auf die DC-Differenzierung. In Mäusen, die eine gestörte Hämatopoese (SCID-Maus) oder eine fehlerhafte Reifung (RAG2<sup>-/-</sup>-Maus) von B- und T-Zellen aufweisen, konnte nachgewiesen werden, dass die Zahl peripherer DC, wie die der Langerhans Zellen der Haut und der DC in den drainierenden Lymphknoten, bei Fehlen der T-Zellen vermindert ist und die vorhandenen DC eine verminderte Fähigkeit zur Antigenpräsentation aufweisen. Dieser Phänotyp konnte jedoch nach Rekonstitution der Tiere mit reifen T-Zellen aufgehoben werden [197]. Unter anderem, durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , tragen vor allem CD4<sup>+</sup>T-Zellen zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese im Knochenmark bei [142]. Untersuchungen von IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass *in vitro* generierte DC trotz normaler Reifung verstärkt IL-12 nach Stimulation mit LPS produzieren und effektiver in der Aktivierung von T-Zellen sind, als aus Wildtypmäusen isolierte DC [245].

Die Expansion CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark 24 Stunden nach CLP geht der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC 36 Stunden nach CLP voran. Die regulatorische Fähigkeit der IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Zellen im Knochenmark könnte die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC und die *de novo* Differenzierung von DC beeinflussen. Die Menge an IFN- $\gamma$  in der Knochenmarklavage wurde nicht bestimmt. Eine erhöhte IL-12-Produktion nach *in vitro* Stimulation von BMDC, die 36 Stunden nach Sepsisinduktion aus dem Knochenmark generiert wurden, lässt reduzierte IFN- $\gamma$ -Mengen im Knochenmark in der akuten Phase der Sepsis vermuten.

Starke Infektionen führen zur sogenannten Notfall-Myelopoese, wobei die Bildung von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten im Knochenmark gegenüber Lymphozyten bevorzugt wird. [222, 223] Sechsenddreißig Stunden nach CLP war die Zahl patrouillierender und inflammatorischer Monozyten im Knochenmark reduziert (Abb. 4.4; 4.5), diese zeigten jedoch eine verstärkte Proliferation. Zeitgleich akkumulierten wenig proliferative inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>MoDC im Knochenmark. Während der akuten Phase der CLP-induzierten Sepsis kam es im Knochenmark, nach dem Ausschwemmen von Monozyten ins Blut wahrscheinlich zu einer verstärkten Bildung von patrouillierenden und inflammatorischen Monozyten aus

HSC. Zudem akkumulierten inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>MoDC im Knochenmark. Die Anzahl von NK-Zellen blieb dabei weitestgehend unberührt. (Abb. 4.3)

## 5.2 Akkumulierende CD4<sup>+</sup>DC vermitteln die Sepsis-assoziierte Differenzierung dysfunktionaler DC

Sechsenddreißig Stunden nach Sepsisinduktion ist die Zahl CD4<sup>+</sup>DC in der Milz erniedrigt. Zeitgleich akkumulieren DC, im Besonderen die CD4<sup>+</sup>DC, im Knochenmark. (Abb. 4.6) Dieser Anstieg war der Expansion der CD4<sup>+</sup>T-Zellen nachgeschaltet und war mit der verstärkten IL-10-Produktion *de novo* differenzierter BMDC nach *in vitro* Stimulation assoziiert. (Abb. 4.8) Es wäre möglich, dass CD4<sup>+</sup>T-Zellen den Einstrom CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark beeinflussen.

Die Differenzierung von DC wird von vielen Faktoren beeinflusst. Inflammatorische Mediatoren, wie PGE<sub>2</sub> [227], zirkulierendes LPS [124], oder die Aktivierung von DC-SIGN, einem C-Typ-Lektin auf der Oberfläche von DC führen zur *in vitro* Differenzierung von IL-10-produzierenden DC, die eine verminderte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung zeigen [208].

Neben den HSC bilden auch MSC einen Teil des Knochenmarks. MSC produzieren PGE<sub>2</sub>, das z.B. die B-Zell-Reifung unterstützt [94]. Auf myeloide Vorläufer im Knochenmark übt PGE<sub>2</sub> einen lang anhaltenden Effekt aus und inhibiert die Migration, sowie die Produktion von IL-12 durch myeloide Zellen [187, 227]. T-Zellen sind in der Lage die PGE<sub>2</sub>-Produktion von MSC zu stimulieren [73]. Sechsenddreißig Stunden nach Sepsisinduktion wurden bislang jedoch keine erhöhten PGE<sub>2</sub>-Mengen in der Knochenmarkklavage der CLP-Tiere, im Vergleich zu den Sham-Tieren, festgestellt. Die Induktion der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch akkumulierende T-Zellen, sowie eine durch PGE<sub>2</sub> veränderte Myelopoese sind daher eher unwahrscheinlich.

Die Depletion der CD4<sup>+</sup>DC aus dem Knochenmark septischer Tiere 36 Stunden nach CLP führte zu der Differenzierung von BMDC, die eine verringerte Fähigkeit zur IL-10-Produktion aufwies. Die Reifung und Aktivierbarkeit der generierten BMDC unterschied sich nicht von BMDC generiert aus Gesamtknochenmark (Abb. 4.10). Somit ist die verringerte IL-10-Produktion nicht auf eine reduzierte Differenzierung IL-10-produzierender BMDC zurückzuführen. Dies deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark und der veränderten DC-Differenzierung *in vitro* hin. Die aufgereinigten CD4<sup>+</sup>DC zeigen nur wenige kleine dendritische Ausläufer, dagegen vielmehr verteilte Wölbungen auf ihrer Zelloberfläche. Nach Aktivierung kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts von DC, was die Wanderung in den drainierenden Lymphknoten unterstützt. Um im

Lymphknoten den effektiven Kontakt mit T-Zellen zu gewährleisten werden dort die charakteristischen Dendriten der DC verstärkt ausgebildet [12, 118]. CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark nach CLP ähneln vielmehr unreifen DC. Untersuchungen der CD40- und CD86-Expression könnten einen Hinweis auf die Reifung der DC geben.

In vitro mittels IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimulierte MoDC zeigen lange Dendriten und eine drastische Vergrößerung ihrer Zelloberfläche [150, 251]. Unstimuliert ähneln sie jedoch CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark während Sepsis [150]. pDC exprimieren keine Dendriten und werden eher als klein, mit gleichmäßig runder Oberfläche beschrieben [210]. Nach optischer Beurteilung lassen sich diese CD4<sup>+</sup>DC als cDC oder unstimulierte MoDC einordnen.

### **5.3 CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark teilen Oberflächenmarker mit cDC aus lymphoiden Organen**

DC bilden eine heterogene Gruppe von Immunzellen, die sich je nach Lokalisation und Grad der Reifung in der Expression diverser Oberflächenmarker unterscheiden. Zwischen 24 und 36 Stunden nach Sepsisinduktion akkumulieren CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark und scheinen an der Differenzierung von dysfunktionalen DC beteiligt zu sein. Das Knochenmark hat keinen Anschluss an die Lymphbahn, die unter inflammatorischen Bedingungen von DC auf dem Weg in drainierende Lymphknoten durchquert wird. Die Wanderung reifer DC übers Blut ist bislang nicht bekannt. Aufgrund der Ähnlichkeit zu cDC und dem starken Verlust von CD4<sup>+</sup>DC in der Milz zum gleichen Zeitpunkt der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark wurde die Herkunft aus sekundären lymphoiden Organen vermutet. Die DC wurden daraufhin anhand der Expression verschiedener cDC-typischer Oberflächenmarker charakterisiert. Es zeigte sich eine starke Expression von SIRP- $\alpha$  und CD11b. (Abb.4.11) Diese klassischen cDC-Marker werden hauptsächlich von residenten DC in lymphoiden Organen exprimiert. SIRP- $\alpha$  ist bereits auf den DC-Vorläufern, den pre-DC zu finden und unterstützt über die Bindung an seinen Liganden CD47 die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>cDC in der Milz [175].

Ein Teil der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark zeigte zudem den Monozyten-Marker Ly6C auf ihrer Oberfläche. (Abb. 4.11) Bis einschließlich 36 Stunden nach CLP ist die Zahl von klassischen Monozyten im Knochenmark reduziert und es lassen sich vermehrt inflammatorische MoDC nachweisen. (Abb.4.4) Sechszwanzig Stunden nach CLP waren die verbliebenen Monozyten stark proliferativ. (Abb.4.5) Der Großteil patrouillierender, sowie inflammatorischer Monozyten scheint somit durch Proliferation von myeloiden Vorläuferzellen entstanden zu sein.

Unter nicht inflammatorischen Bedingungen kommt es zur Rezirkulation inflammatorischer Monozyten aus der Blutbahn ins Knochenmark [229]. Da nur ein geringer Teil dieser Population innerhalb der Sham-Gruppe Ki-67 exprimiert, scheint der prominente Anstieg im Knochenmark nach 36 Stunden im Vergleich zu 12 Stunden nach Sham-OP eher aus der Rezirkulation von Monozyten, aus der Blutbahn ins Knochenmark zu resultieren. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht. Unter inflammatorischen Bedingungen differenzieren Monozyten unter Wirkung von GM-CSF zu inflammatorischen MoDC. Innerhalb der MoDC führte die Sepsisinduktion vermutlich zu keiner Proliferation, jedoch kann die Differenzierung von klassischen Monozyten in MoDC nicht ausgeschlossen werden.

Die Akkumulation von Ly6C<sup>hi</sup>MoDC ist bereits 12 Stunden nach CLP sichtbar und geht somit dem Erscheinen von CD4<sup>+</sup>DC voran. Eine Differenzierung in CD4<sup>+</sup>DC wäre somit möglich.

Monozyten sind in inflammatorischen Geweben oft mit T-Helferzellen kolokalisiert. Letztere haben das Potential, die Differenzierung von DC aus Monozyten zu beeinflussen [3]. Bisher konnte nicht festgestellt werden, ob und unter welchen Bedingungen die akkumulierenden CD4<sup>+</sup>DC aus Monozyten hervorgehen. Mögliche experimentelle Ansätze zur Klärung der Rolle der T-Zellen bei Sepsis gestalten sich schwierig: Da das Fehlen von T-Zellen *in vivo* zur Störung der klassischen Hämatopoese von DC führt [197], würden durch Sepsisinduktion in z.B. RAG2<sup>-/-</sup>-Mäusen keine cDC, sondern ausschließlich MoDC im Knochenmark akkumulieren können. Sofern die Interaktion von Monozyten und T-Zellen im Knochenmark jedoch zur Differenzierung von CD4<sup>+</sup>MoDC führt, würde auch diese gestört sein. Um den generellen Effekt des Fehlens von T-Zellen auf DC von den Effekten der Sepsis unterscheiden zu können, müssten hierzu jedoch Kontrollen verwendet werden, bei denen RAG2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit naiven T-Zellen rekonstituiert werden würden. Ohne Beeinträchtigung der T-Zellpopulation könnte die Differenzierung von MoDC unter vorheriger Depletion von cDC z.B. unter Verwendung von CD11cDTR-Mäusen untersucht werden.

Sofern es sich bei den CD4<sup>+</sup>DC um periphere cDC handelt könnten diese während Sepsis aus der Milz oder auch dem Intestinaltrakt stammen. Sechs Stunden nach CLP ergab sich eine transiente Akkumulation von CD4<sup>+</sup>DC, in den mesenterialen Lymphknoten (Abb. 4.12) und teilweise in der Milz (Abb. 4.13), die einen ähnlichen Phänotyp wie die, im Knochenmark nach 36 Stunden akkumulierenden, CD4<sup>+</sup>DC aufwiesen. Diese DC zeigten jedoch keine Ly6C-Expression. Nach 12 Stunden

ließen sich CD4<sup>+</sup>DC auch im Blut lokalisieren (Abb. 4.13), jedoch kann zurzeit keine Aussage über charakteristische Oberflächenmoleküle getroffen werden, da zu wenig Material für weitere Analysen z.B. von Ly6C fehlten.

Die transiente Akkumulation von CD4<sup>+</sup>DC, zunächst in sekundären lymphoiden Organen (mesenteriale Lymphknoten und Milz), dann in der Blutbahn und letztendlich im Knochenmark, könnte auf eine Wanderung der CD4<sup>+</sup>DC hinweisen. Eine Zirkulation aktivierter DC unter inflammatorischen Bedingungen über das Blut in das Knochenmark wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte daher eine neue Eigenschaft bestimmter DC darstellen.

Die im Knochenmark akkumulierenden CD4<sup>+</sup>DC ähnelten morphologisch und bzgl. der Oberflächenmoleküle SIRP- $\alpha$ , CD11b und des Fehlens von CD103, den in der Milz residenten cDC. Vierundzwanzig Stunden nach CLP zeigte sich eine starke Reduktion CD4<sup>+</sup>DC in der Milz. Der dramatische Verlust von DC in der Milz steht in Verbindung mit erhöhter Sterblichkeit bei Sepsis, so findet sich in den *post mortem* gewonnen Milzen septischer Patienten eine stark reduzierte DC-Zahl [85, 214]. Die Milz, als großes Reservoir an CD4<sup>+</sup>cDC hätte als Ursprungsort der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark in Frage kommen können. Diese Annahme ließ sich jedoch nicht bestätigen, da eine Splenektomie vor Induktion der Sepsis die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark nicht verhindern konnte (Abb.4.17).

CD103<sup>+</sup>DC wandern unter inflammatorischen Bedingungen aus dem Darm in die mesenterialen Lymphknoten. Diese DC haben unter *steady-state*-Bedingungen eine tolerogene Wirkung auf T-Zellen, durch die Induktion von Tregs, jedoch geht diese während einer Inflammation verloren [46, 110, 186]. In den mesenterialen Lymphknoten konnte 6 Stunden nach CLP der Anstieg CD103<sup>+</sup>DC beobachtet werden.

Kürzlich wurden CD103<sup>+</sup>DC beschrieben, die unter inflammatorischen Bedingungen aus dem Darm über die Lymphbahn in die mesenterialen Lymphknoten wandern und dort die Differenzierung von T-Zellen in IFN- $\gamma$ -, sowie IL-17-produzierende Effektor-T-Zellen beeinflussen. Diese DC exprimieren zudem CD11b, CD4 und SIRP- $\alpha$  und lassen sich mittels FLT3-L expandieren. Morphologisch zeigen sie nur kurze Dendriten und vorwiegend gleichmäßig verteilte Wölbungen. Ein charakteristisches Merkmal dieser DC ist die Expression des Chemokinrezeptors CX<sub>3</sub>CR1 [31]. Es bleibt zu prüfen, ob CD4<sup>+</sup>DC, die 36 Stunden nach CLP im Knochenmark erscheinen, ebenfalls diese Rezeptorexpression aufweisen und eventuell eine aus dem Darm migrierende Population darstellen.

Die Verwendung von Sepsismodellen an der Ratte haben gezeigt, dass bereits zwölf Stunden nach CLP in den mesenterialen Lymphknoten eine Verschiebung der T-Zelldifferenzierung vom  $T_H1$ - zum  $T_H2$ -Typ auftritt und der prozentuale Anteil an Tregs zunimmt [250].  $CD103^+DC$  in den mesenterialen Lymphknoten fördern hierbei die Differenzierung in iTregs [46]. Die Entfernung der mesenterialen Lymphknoten vor Induktion der Sepsis verhinderte die Akkumulation  $CD4^+DC$  im Knochenmark nicht. Die Akkumulation im Knochenmark war in diesem vorläufigen Experiment in beiden betrachteten Gruppen nur schwach ausgeprägt, daher kann zu diesem Zeitpunkt keine verlässliche Aussage über den Einfluss der mesenterialen Lymphknoten auf die Akkumulation  $CD4^+DC$  im Knochenmark getroffen werden. Dies war nach Adenektomie und Sepsisinduktion von einem nur schwachen Anstieg  $CD4^+T$ -Zellen begleitet, bei vergleichbar starker Akkumulation in der CLP-Gruppe der Kontrolltiere. Mesenteriale Lymphknoten scheinen somit keinen direkten Einfluss auf die  $CD4^+DC$ , aber wahrscheinlich auf  $CD4^+T$ -Zellen zu haben.

Auf Grund der starken Ähnlichkeit eines Teils, der während der Sepsis im Knochenmark akkumulierenden DC mit peripheren cDC aus der Milz und  $CD103^-DC$  aus dem Intestinaltrakt und auf Grund des transienten Erscheinens der  $CD4^+DC$  in den mesenterialen Lymphknoten, in der Milz und vor allem im Blut, wurde eine Wanderung von  $CD4^+DC$  aus der Peripherie in das Knochenmark vermutet.

#### **5.4 Sepsis induziert eine TLR2/MyD88-abhängige, S1P-vermittelte Wanderung der $CD4^+DC$ über die Blutzirkulation in das Knochenmark**

Jede inflammatorische Reaktion auf ein eindringendes Pathogen beginnt mit der Erkennung spezifischer PAMPS über PRR. TLR nehmen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung bei Sepsis ein und ihre verstärkte Expression auf Immun-, sowie Nichtimmunzellen ist mit einer erhöhten Sterblichkeit bei Sepsis verbunden [241]. Vorarbeiten zeigten bereits, dass vornehmlich Lipopeptide, also die Signaltransduktion über TLR2, an der Ausbildung der post-septischen DC-Dysfunktion beteiligt sind [25]. Die Akkumulation  $CD4^+DC$  im Knochenmark war bedingt durch die Signalübertragung über MyD88 und schien zudem TLR2-vermittelt zu sein. Im Gegensatz zu den  $CD4^+DC$  wurde die Sepsis assoziierte Akkumulation der  $CD4^+T$ -Zellen in MyD88-defizienten Mäusen nicht beeinflusst. Somit scheint das Erscheinen  $CD4^+T$ -Zellen unabhängig von den DC zu sein.

Unklar bleibt, warum die Akkumulation der  $CD4^+T$ -Zellen in  $TLR2^{-/-}$ - sowie  $TLR2/4^{-/-}$ -Mäusen verringert schien, da die Signaltransduktion von TLR2 ausschließlich über MyD88 vermittelt wird. Aktivierte T-Zellen exprimieren vermehrt TLR2 [103]. In

Wildtypmäusen wird die postseptische DC-Dysfunktion über TLR2 Liganden vermittelt [25]. Die Akkumulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen scheint jedoch unabhängig von der TLR2-induzierten, MyD88-vermittelten Signaltransduktion zu sein. MyD88 ist zudem das Schlüsselmolekül der Signaltransduktion des IL-1- und des IL-18-Rezeptors (IL-1R bzw. IL-18R). Im Mausmodell einer kutanen *S. aureus* Infektion ist die Signaltransduktion über IL-1R und MyD88 essentiell für die Bekämpfung der Bakterien, da sie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt. TLR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen dagegen nur eine leichte Beeinträchtigung der Bakterienabwehr [138]. Eine Beeinträchtigung der Akkumulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen in TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/4<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte durch das Überwiegen der IL-1-Stimulation möglich sein.

Wie bereits bekannt, kam es 24 Stunden nach Sepsisinduktion zur Reduktion der DC in der Milz. Es wird vermutet, dass die Ursache der Zelltod durch Apoptose ist [7]. Diese Reduktion der CD4<sup>+</sup>DC Population schien in TLR2<sup>-/-</sup>-, TLR2/4<sup>-/-</sup>-, sowie MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen, jedoch nicht TLR4<sup>-/-</sup>-Mäusen leicht beeinträchtigt zu sein. Es scheint, dass der hier beschriebene Zellverlust in der Milz nicht vorwiegend durch Apoptose vermittelt wurde. Es wurde bereits beschrieben, dass TLR4 und TLR2 während polymikrobieller Sepsis verantwortlich sind für die Reifung und den Apoptose bedingten Verlust von DC der Milz. So konnte der Verlust von CD8α<sup>+</sup>DC in der Milz teilweise in TLR2- oder TLR4-defizienten und vollständig in TLR2/4-defizienten Mäusen verhindert werden [158]. Die Experimente jener Studie fokussierten sich jedoch nicht auf CD4<sup>+</sup>DC und es wurden Mausstämme auf dem Hintergrund von C57Bl/6 verwendet. Dies kann einen Spezies-bedingten Unterschied darstellen.

TLR2 und MyD88 scheinen maßgeblich an der Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark beteiligt zu sein. Unklar bleibt jedoch, ob es sich hierbei um einen direkten Effekt auf die CD4<sup>+</sup>DC handelt, oder diese Akkumulation über einen Mediator vermittelt wird (z.B. CCL2 oder SDF-1α), der MyD88-abhängig von anderen Immunzellen gebildet wird. In einem Infektionsmodell mit *Trypanosoma brucei* wurde die MyD88-bedingte Differenzierung von MoDC aus dem Knochenmark in TipDC beschrieben [21]. Monozytenpopulationen im Knochenmark MyD88-defizienter Mäuse wurden innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht untersucht, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der regulatorische Effekt in MyD88-defizienten Mäusen in der Unterdrückung der Monozytendifferenzierung besteht.

Hämatopoetische-Vorläufer aus dem Knochenmark verteilen sich unter normalen Bedingungen S1P-abhängig über die Blutbahn in periphere lymphoide und nichtlymphoide Organe [65]. Kurz nach Sepsisinduktion akkumulieren CD4<sup>+</sup>DC S1P-

abhängig in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten (Abb. 4.19). Sechsendreißig Stunden nach CLP konnte die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC, sowie der CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Knochenmark durch Blockade der S1PR1,3,4 und 5 inhibiert werden (Abb. 4.20). Die Gabe des S1P-Agonisten FTY720 führte dabei zu einer Lymphopenie, da es die Wanderung naiver und aktivierter T-Zellen über die Blutbahn blockiert [246]. FTY720 scheint zudem die Zahl aller betrachteten Monozytenpopulationen während Sepsis zu verringern. Unter normalen Bedingungen inhibiert FTY720 zirkulierende Monozyten und führt zur Akkumulation im Knochenmark und der Milz [116]. Dies wurde hier jedoch nicht beobachtet. Die FTY720-vermittelte Reduktion von MoDC unter septischen Bedingungen lässt vermuten, dass diese S1P-abhängig im Knochenmark akkumulieren. Das Erscheinen CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark scheint somit mit der S1P-abhängigen Akkumulation von MoDC verknüpft zu sein. Auch in der Milz befinden sich Monozyten, die während einer Infektion mobilisiert werden können [66]. Die mögliche Differenzierung von Monozyten der Milz in CD4<sup>+</sup>MoDC und deren Wanderung über die Blutbahn ins Knochenmark sollte nachfolgend untersucht werden.

Die post-septische Reduktion von T-Zellen und DC im Knochenmark und der Milz wird durch S1P-Blockade nicht beeinträchtigt. Jedoch führt FTY720 zu einer generellen Depletion von T-Zellen in der Lunge. (Abb. 4.22; 4.23)

Charakteristisch für die post-septische Immunsuppression ist die verstärkte Empfänglichkeit gegenüber einer nosokomialen Sekundärinfektion, wie z.B. eine *P. aeruginosa* Infektion. Aus dem Knochenmark von postseptischen Tieren generierte BMDC übertragen die Immunsuppression auf naive Tiere [155]. BMDC, die aus dem Knochenmark von FTY720-behandelten Tieren generiert wurden zeigten, außer einer tendenziell erhöhten IL-12-Produktion, keine signifikante Veränderung der Zytokinproduktion im Vergleich zu BMDC, die aus unbehandelten Tieren generiert wurden. (Abb. 4.24) Untersuchungen an SphK1-defizienten Mäusen zeigten, dass S1P die LPS-induzierte IL-12-Produktion von DC in der Milz unterdrückt [182]. Die Blockade der S1PR verhindert diesen Effekt und induziert eine verstärkte IL-12-Produktion.

Aus post-septischen, mit FTY720-behandelten Tieren generierte BMDC übertragen die Immunsuppression auf naive Tiere, jedoch führte hier die Applikation von BMDC, die aus mit FTY720 behandelten Kontrolltieren, generiert worden waren, ebenfalls zu einer schlechteren Elimination der Bakterien in der Lunge, vergleichbar mit CLP-BMDC. (Abb. 4.24) FTY720 führt zum langanhaltenden Abbau von S1PR, welche

ebenfalls von HSC exprimiert werden [68, 97]. BMDC, die über acht Tage mittels GM-CSF und IL-4 in Anwesenheit von FTY720 *in vitro* generiert wurden, zeigen nach LPS Stimulation eine verminderte Bildung von S1P1. Diese BMDC vermitteln zudem durch Induktion von Tregs eine reduzierte IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen *in vivo* und *in vitro* [74]. Innerhalb dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob die *in vivo* Behandlung mit FTY720 vor *in vitro* Generierung der BMDC Auswirkungen auf deren S1PR-Expression, sowie S1P-Produktion hat. Sollten diese verringert sein, kann dies die S1P-vermittelte Immunreaktion der BMDC in Bezug auf die *P. aeruginosa* Infektion in der Lunge beeinträchtigen.

Die Blockade der S1P-abhängigen Migration von DC führte zur Beeinträchtigung der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC, sowie CD4<sup>+</sup>T-Zellen in sekundären lymphoiden Organen und im Knochenmark. Die *in vivo* Applikation des S1P-Analogons FTY720 scheint einen generellen Einfluss auf die Differenzierung von DC zu haben. Daher konnte mithilfe dieses Versuchsansatzes nicht geklärt werden, ob die Beeinträchtigung der S1P-abhängigen DC-Akkumulation im Knochenmark nachfolgend die *de novo* Differenzierung der DC beeinflusst. S1P ist ein bioaktives Lysophospholipid, das von vielen Zellen gebildet werden kann [171]. Unter inflammatorischen Bedingungen wird S1P vermehrt im Gewebe produziert [135]. So zeigen z.B. Peritonealmakrophagen von Patienten mit schwerer Sepsis eine erhöhte Sphk1-Bildung, die zu verstärkter S1P-Produktion führt. Dies ist zudem durch die Bildung von PGE<sub>2</sub> mit der Inhibierung der TLR-induzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert [160, 162].

Hauptproduzenten des S1P sind jedoch Erythrozyten und Endothelzellen [69, 154]. Im Verlauf der Sepsis ist die Neubildung von Erythrozyten im Knochenmark gestört, so dass septische Patienten eine Anämie entwickeln [105]. Die Entwicklung einer Anämie in den septischen Tieren wurde nicht näher untersucht, jedoch zeigten Femur und Tibia gewonnen von Mäusen 36 Stunden nach CLP eine stärkere Rotfärbung als Knochen von Sham-Mäusen. Dies lässt auf eine verstärkte Erythropoese schließen. Eine verstärkte Bildung von Erythrozyten könnte zu einer Erhöhung der S1P-Konzentration im Knochenmark führen und somit eine Migration ins Knochenmark fördern. Dies erklärt jedoch nicht das frühe S1P-abhängige Erscheinen von CD4<sup>+</sup>DC in den mesenterialen Lymphknoten und der Milz. Allerdings fördert die Aktivierung von S1PR1 und 3 auch die Expression von CCR7, was die CCL19-abhängige Wanderung in die Lymphknoten fördert [41]. Auf Grund der vielseitigen S1P-vermittelten Effekte könnte es sich bei der Akkumulation CD4<sup>+</sup>DC in

den verschiedenen Organen auch um verschiedene S1P-abhängige Mechanismen handeln.

In der akuten Phase der Sepsis kommt es zu einer S1P-vermittelten Migration von CD4<sup>+</sup>DC über die Blutzirkulation in das Knochenmark. Diese steht, möglicherweise mit CD4<sup>+</sup>T-Zellen, die zusammen mit Ly6C<sup>hi</sup>MoDC etwas früher als die CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark erscheinen, in Verbindung. Die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC und der T-Zellen ist mit einer veränderten DC-Differenzierung assoziiert. Die Akkumulation der CD4<sup>+</sup>DC im Knochenmark erfolgt in Abhängigkeit von TLR2 und dem Adaptermolekül MyD88. Phänotypische Ähnlichkeiten zu cDC aus lymphoiden Organen lassen vermuten, dass diese CD4<sup>+</sup>DC nicht ausschließlich durch die Differenzierung inflammatorischer Monozyten gebildet werden. Die Funktion und der genaue Ursprung dieser CD4<sup>+</sup>DC sollte nachfolgend noch weiter untersucht werden, da es scheint, dass diese Population, durch Beeinflussung der DC-Differenzierung an der Vermittlung der postseptischen Immunsuppression beteiligt ist.

## 6. Zusammenfassung

Als dritthäufigste Todesursache in Deutschland handelt es sich bei der Sepsis um eine lebensbedrohliche Immunkomplikation. Neben schweren Organschäden kommt es zur Entwicklung einer langanhaltenden Immunsuppression, die das Risiko für nosokomiale Sekundärinfektionen erhöht. Dendritische Zellen (DC) spielen eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr bei Infektionen. Sepsis führt zur Differenzierung von dysfunktionalen DC, denen die Fähigkeit fehlt eine effektive  $T_H1$ -Antwort von T-Zellen auszulösen. Dies wird vermittelt durch die verstärkte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, bei meist verminderter IL-12-Produktion. Vorarbeiten wiesen darauf hin, dass bisher nicht charakterisierte  $CD11c^+$  Zellen im Knochenmark die DC-Differenzierung beeinflussen können.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Mausmodells der „Zökalen Ligatur und Punktion“ (CLP) zelluläre Veränderungen des Knochenmarks in der akuten Phase der Sepsis, die zur Entstehung der DC-Dysfunktion führen könnten, untersucht. Bereits 24 Stunden nach CLP akkumulierten aus Monozyten differenzierte  $Ly6C^{hi}$ DC (MoDC),  $CD4^+$ T-Zellen, sowie  $CD4^+$ DC im Knochenmark. Die, im Verlauf (36 Stunden nach CLP) weiter vermehrte Anzahl  $CD4^+$ DC assoziierte mit einer Verschiebung der Zytokinbalance der aus dem Knochenmark generierten DC (BMDC) hin zum anti-inflammatorischen IL-10. Die vorhergehende Depletion  $CD4^+$ DC aus dem Knochenmark hob diese Verschiebung auf. Phänotypisch ähneln die  $CD4^+$ DC teilweise konventionellen DC aus der Milz aber auch inflammatorischen MoDC. In der frühen Phase der Sepsis (sechs bis zwölf Stunden nach CLP) wurde eine transiente S1P-abhängige Akkumulation  $CD4^+$ DC in den mesenterialen Lymphknoten, der Milz und im Blut beobachtet. Die Akkumulation  $CD4^+$ DC im Knochenmark konnte zudem durch systemische Blockade des S1P, sowie MyD88- und teilweise TLR2-abhängig verhindert werden. Diese systemische S1P-Blockade führte jedoch postseptisch zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa*.

Während der akuten Phase der Sepsis ist die Bildung IL-10-produzierender BMDC mit der Akkumulation  $CD4^+$ DC im Knochenmark assoziiert. Diese wandern vermutlich S1P-abhängig, möglicherweise unter Beteiligung von  $CD4^+$ T-Zellen und  $Ly6C^{hi}$ MoDC, über sekundäre lymphoide Organe und das Blut in das Knochenmark. Weitere Untersuchungen zur Herkunft der  $CD4^+$ DC und ihrer Wirkung auf die DC-Differenzierung könnten zu Therapieansätzen für die Vermeidung der postseptischen Immunsuppression führen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adib-Conquy, M. and J.M. Cavaillon (2009) *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*. *Thromb Haemost* 101:36-47.
2. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi (2006) *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell* 124:783-801.
3. Alonso, M.N., M.T. Wong, A.L. Zhang, D. Winer, M.M. Suhoski, L.L. Tolentino, J. Gaitan, M.G. Davidson, T.H. Kung, D.M. Galel, K.C. Nadeau, J. Kim, P.J. Utz, K. Soderstrom, and E.G. Engleman (2011) *T(H)1, T(H)2, and T(H)17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets*. *Blood* 118:3311-20.
4. An, S., E.J. Goetzl, and H. Lee (1998) *Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:147-57.
5. Arlt, O., A. Schwiebs, L. Japtok, K. Ruger, E. Katzy, B. Kleuser, and H.H. Radeke (2014) *Sphingosine-1-phosphate modulates dendritic cell function: focus on non-migratory effects in vitro and in vivo*. *Cell Physiol Biochem* 34:27-44.
6. Armstrong, L., A.R. Medford, K.J. Hunter, K.M. Uppington, and A.B. Millar (2004) *Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis*. *Clin Exp Immunol* 136:312-9.
7. Ato, M., K. Iwabuchi, S. Shimada, N. Mukaida, and K. Onoe (2002) *Augmented expression of tumour necrosis factor-alpha induced by lipopolysaccharide in spleen of human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse enhances the lipopolysaccharide sensitivity of the marginal zone macrophages*. *Immunology* 106:554-63.
8. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann (2009) *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. *Annual review of immunology* 27:669-92.
9. Ayala, A., Z.K. Deol, D.L. Lehman, C.D. Herdon, and I.H. Chaudry (1994) *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* 56:579-85.
10. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka (2000) *Immunobiology of dendritic cells*. *Annual review of immunology* 18:767-811.
11. Beaulieu, L.M. and J.E. Freedman (2010) *The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes*. *Thromb Res* 125:205-9.

12. Becker, Y. (2003) *Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells--a review*. *Virus Genes* 26:119-30.
13. Bellora, F., R. Castriconi, A. Dondero, G. Reggiardo, L. Moretta, A. Mantovani, A. Moretta, and C. Bottino (2010) *The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21659-64.
14. Benjamim, C.F., C.M. Hogaboam, and S.L. Kunkel (2004) *The chronic consequences of severe sepsis*. *Journal of leukocyte biology* 75:408-12.
15. Benjamim, C.F., C.M. Hogaboam, N.W. Lukacs, and S.L. Kunkel (2003) *Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis*. *Am J Pathol* 163:2605-17.
16. Benjamim, C.F., S.K. Lundy, N.W. Lukacs, C.M. Hogaboam, and S.L. Kunkel (2005) *Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells*. *Blood* 105:3588-95.
17. Boath, A., C. Graf, E. Lidome, T. Ullrich, P. Nussbaumer, and F. Bornancin (2008) *Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin*. *J Biol Chem* 283:8517-26.
18. Boks, M.A., J.R. Kager-Groenland, M.S. Haasjes, J.J. Zwaginga, S.M. van Ham, and A. ten Brinke (2012) *IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC*. *Clinical immunology* 142:332-42.
19. Boomer, J.S., K. To, K.C. Chang, O. Takasu, D.F. Osborne, A.H. Walton, T.L. Bricker, S.D. Jarman, 2nd, D. Kreisel, A.S. Krupnick, A. Srivastava, P.E. Swanson, J.M. Green, and R.S. Hotchkiss (2011) *Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure*. *JAMA* 306:2594-605.
20. Borrego, F., M.J. Robertson, J. Ritz, J. Pena, and R. Solana (1999) *CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor*. *Immunology* 97:159-65.
21. Bosschaerts, T., M. Guillems, B. Stijlemans, Y. Morias, D. Engel, F. Tacke, M. Herin, P. De Baetselier, and A. Beschin (2010) *Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling*. *PLoS pathogens* 6:e1001045.
22. Brasel, K., T. De Smedt, J.L. Smith, and C.R. Maliszewski (2000) *Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures*. *Blood* 96:3029-39.
23. Brinkmann, V., M.D. Davis, C.E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C.A. Foster, M. Zollinger, and K.R. Lynch (2002) *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. *The Journal of biological chemistry* 277:21453-7.

24. Brown, J.A., D.M. Dorfman, F.R. Ma, E.L. Sullivan, O. Munoz, C.R. Wood, E.A. Greenfield, and G.J. Freeman (2003) *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production*. Journal of immunology 170:1257-66.
25. Bruns, S., E. Pastille, F. Wirsdorfer, M. Frisch, and S.B. Flohe (2013) *Lipopeptides rather than lipopolysaccharide favor the development of dendritic cell dysfunction similar to polymicrobial sepsis in mice*. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 62:627-36.
26. Butte, M.J., M.E. Keir, T.B. Phamduy, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman (2007) *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity 27:111-22.
27. Carsetti, R. (2000) *The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment*. J Exp Med 191:5-8.
28. Carsetti, R. (2004) *Characterization of B-cell maturation in the peripheral immune system*. Methods Mol Biol 271:25-35.
29. Carsetti, R., G. Kohler, and M.C. Lamers (1995) *Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment*. J Exp Med 181:2129-40.
30. Cepek, K.L., S.K. Shaw, C.M. Parker, G.J. Russell, J.S. Morrow, D.L. Rimm, and M.B. Brenner (1994) *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature 372:190-3.
31. Cerovic, V., S.A. Houston, C.L. Scott, A. Aumeunier, U. Yrlid, A.M. Mowat, and S.W. Milling (2013) *Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells*. Mucosal immunology 6:104-13.
32. Chalifour, A., P. Jeannin, J.F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont, and Y. Delneste (2004) *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. Blood 104:1778-83.
33. Charles A. Janeway, P.T., Mark Walport (2005) *Immunobiology*. Journal 6. Auflage:
34. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl (2003) *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. The Journal of experimental medicine 198:1875-86.
35. Cinamon, G. (2004) *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone*. Nature Immunol. 5:713-720.
36. Coffman, R.L. and J. Carty (1986) *A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma*. Journal of immunology 136:949-54.

37. Cravens, P.D. and P.E. Lipsky (2002) *Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases*. Immunology and cell biology 80:497-505.
38. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill (2006) *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends in immunology 27:352-7.
39. Crotty, S. (2011) *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annual review of immunology 29:621-63.
40. Czeloth, N., G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth, and R. Forster (2005) *Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells*. J Immunol 175:2960-7.
41. Czeloth, N., G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth, and R. Forster (2005) *Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells*. Journal of immunology 175:2960-7.
42. Daubeuf, B., J. Mathison, S. Spiller, S. Hugues, S. Herren, W. Ferlin, M. Kosco-Vilbois, H. Wagner, C.J. Kirschning, R. Ulevitch, and G. Elson (2007) *TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock*. J Immunol 179:6107-14.
43. de Pablo, R., J. Monserrat, E. Reyes, D. Diaz-Martin, M. Rodriguez Zapata, F. Carballo, A. de la Hera, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon (2011) *Mortality in patients with septic shock correlates with anti-inflammatory but not proinflammatory immunomodulatory molecules*. J Intensive Care Med 26:125-32.
44. de Pablo, R., J. Monserrat, C. Torrijos, M. Martin, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon (2012) *The predictive role of early activation of natural killer cells in septic shock*. Crit Care 16:413.
45. De Smedt, T., M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser (1997) *Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function*. European journal of immunology 27:1229-35.
46. del Rio, M.L., G. Bernhardt, J.I. Rodriguez-Barbosa, and R. Forster (2010) *Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells*. Immunological reviews 234:268-81.
47. Delano, M.J., P.O. Scumpia, J.S. Weinstein, D. Coco, S. Nagaraj, K.M. Kelly-Scumpia, K.A. O'Malley, J.L. Wynn, S. Antonenko, S.Z. Al-Quran, R. Swan, C.S. Chung, M.A. Atkinson, R. Ramphal, D.I. Gibrilovich, W.H. Reeves, A. Ayala, J. Phillips, D. Laface, P.G. Heyworth, M. Clare-Salzler, and L.L. Moldawer (2007) *MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)/CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis*. J Exp Med 204:1463-74.

48. Dellinger, R.P., M.M. Levy, J.M. Carlet, J. Bion, M.M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D.C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J.F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J.J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B.T. Thompson, S. Townsend, J.S. Vender, J.L. Zimmerman, J.L. Vincent, C. International Surviving Sepsis Campaign Guidelines, N. American Association of Critical-Care, P. American College of Chest, P. American College of Emergency, S. Canadian Critical Care, M. European Society of Clinical, D. Infectious, M. European Society of Intensive Care, S. European Respiratory, F. International Sepsis, M. Japanese Association for Acute, M. Japanese Society of Intensive Care, M. Society of Critical Care, M. Society of Hospital, S. Surgical Infection, I. World Federation of Societies of, and M. Critical Care (2008) *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008*. Crit Care Med 36:296-327.
49. Dong, C. (2008) *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. Nature reviews. Immunology 8:337-48.
50. Engel, C., F.M. Brunkhorst, H.G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart (2007) *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med 33:606-18.
51. Erb, K.J., J.W. Holloway, and G. Le Gros (1996) *Mast cells in the front line. Innate immunity*. Current biology : CB 6:941-2.
52. Ertel, W., J.P. Kremer, J. Kenney, U. Steckholzer, D. Jarrar, O. Trentz, and F.W. Schildberg (1995) *Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients*. Blood 85:1341-7.
53. Esmon, C.T. (2005) *The interactions between inflammation and coagulation*. British journal of haematology 131:417-30.
54. Falk, K., O. Rotzschke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, and H.G. Rammensee (1991) *Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast*. The Journal of experimental medicine 174:425-34.
55. Fearon, D.T. and R.M. Locksley (1996) *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science 272:50-3.
56. Ferguson, N.R., H.F. Galley, and N.R. Webster (1999) *T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis*. Intensive Care Med 25:106-9.
57. Feuerer, M., P. Beckhove, N. Garbi, Y. Mahnke, A. Limmer, M. Hommel, G.J. Hammerling, B. Kyewski, A. Hamann, V. Umansky, and V. Schirmmayer (2003) *Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen*. Nature medicine 9:1151-7.

58. Fink, M.P. (2001) *Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis*. Crit Care Clin 17:219-37.
59. Fitzgerald, K.A., E.M. Palsson-McDermott, A.G. Bowie, C.A. Jefferies, A.S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M.T. Harte, D. McMurray, D.E. Smith, J.E. Sims, T.A. Bird, and L.A. O'Neill (2001) *Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction*. Nature 413:78-83.
60. Flechner, E.R., P.S. Freudenthal, G. Kaplan, and R.M. Steinman (1988) *Antigen-specific T lymphocytes efficiently cluster with dendritic cells in the human primary mixed-leukocyte reaction*. Cellular immunology 111:183-95.
61. Flohe, S.B., H. Agrawal, D. Schmitz, M. Gertz, S. Flohe, and F.U. Schade (2006) *Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response*. J Leukoc Biol 79:473-81.
62. Geijtenbeek, T.B., A. Engering, and Y. Van Kooyk (2002) *DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology*. Journal of leukocyte biology 71:921-31.
63. Geijtenbeek, T.B., D.J. Krooshoop, D.A. Bleijs, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk (2000) *DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking*. Nature immunology 1:353-7.
64. Gogos, C., A. Kotsaki, A. Pelekanou, G. Giannikopoulos, I. Vaki, P. Maravitsa, S. Adamis, Z. Alexiou, G. Andrianopoulos, A. Antonopoulou, S. Athanassia, F. Baziaka, A. Charalambous, S. Christodoulou, I. Dimopoulou, I. Floros, E. Giannitsioti, P. Gkanas, A. Ioakeimidou, K. Kanellakopoulou, N. Karabela, V. Karagianni, I. Katsarolis, G. Kontopithari, P. Kopterides, I. Koutelidakis, P. Koutoukas, H. Kranidioti, M. Lignos, K. Louis, K. Lymberopoulou, E. Mainas, A. Marioli, C. Massouras, I. Mavrou, M. Mpalla, M. Michalia, H. Mylona, V. Mytas, I. Papanikolaou, K. Papanikolaou, M. Patrani, I. Perdios, D. Plachouras, A. Pistiki, K. Protopapas, K. Rigaki, V. Sakka, M. Sartzi, V. Skouras, M. Souli, A. Spyridaki, I. Strouvalis, T. Tsaganos, G. Zografos, K. Mandragos, P. Klouva-Molyvdas, N. Maggina, H. Giamarellou, A. Armaganidis, and E.J. Giamarellos-Bourboulis (2010) *Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection*. Crit Care 14:R96.
65. Golan, K., Y. Vagima, A. Ludin, T. Itkin, S. Cohen-Gur, A. Kalinkovich, O. Kollet, C. Kim, A. Schajnovitz, Y. Ovadya, K. Lapid, S. Shvitiel, A.J. Morris, M.Z. Ratajczak, and T. Lapidot (2012) *S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release*. Blood 119:2478-88.
66. Goncalves, R., X. Zhang, H. Cohen, A. Debrabant, and D.M. Mosser (2011) *Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection*. J Exp Med 208:1253-65.

67. Graeler, M. and E.J. Goetzl (2002) *Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells*. FASEB J 16:1874-8.
68. Graler, M.H. and E.J. Goetzl (2004) *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18:551-3.
69. Hanel, P., P. Andreani, and M.H. Graler (2007) *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 21:1202-9.
70. Hanel, P., P. Andreani, and M.H. Graler (2007) *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood*. FASEB J 21:1202-9.
71. Hathcock, K.S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, and R.J. Hodes (1994) *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*. The Journal of experimental medicine 180:631-40.
72. Hauss, P., F. Selz, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer (1995) *Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ T cells*. European journal of immunology 25:2285-94.
73. Hegyi, B., G. Kudlik, E. Monostori, and F. Uher (2012) *Activated T-cells and pro-inflammatory cytokines differentially regulate prostaglandin E2 secretion by mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun 419:215-20.
74. Heng, Y., Y. Ma, H. Yin, L. Duan, P. Xiong, Y. Xu, W. Feng, M. Fang, Z. Tan, Y. Chen, F. Zheng, and F. Gong (2010) *Adoptive transfer of FTY720-treated immature BMDCs significantly prolonged cardiac allograft survival*. Transpl Int 23:1259-70.
75. Hla, T. (2001) *Sphingosine 1-phosphate receptors*. Prostaglandins 64:135-142.
76. Hoesel, L.M., T.A. Neff, S.B. Neff, J.G. Younger, E.W. Olle, H. Gao, M.J. Pianko, K.D. Bernacki, J.V. Sarma, and P.A. Ward (2005) *Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis*. Shock 24:40-7.
77. Hoffmann, J.A. (1995) *Innate immunity of insects*. Current opinion in immunology 7:4-10.
78. Horng, T., G.M. Barton, R.A. Flavell, and R. Medzhitov (2002) *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature 420:329-33.
79. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov (2001) *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. Nature immunology 2:835-41.
80. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl (2003) *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med 348:138-50.

81. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl (2003) *The pathophysiology and treatment of sepsis*. The New England journal of medicine 348:138-50.
82. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson (2006) *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol 6:813-22.
83. Hotchkiss, R.S., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, and I.E. Karl (1999) *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction*. Critical care medicine 27:1230-51.
84. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, K.C. Chang, J.P. Cobb, T.G. Buchman, S.J. Korsmeyer, and I.E. Karl (1999) *Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14541-6.
85. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, M.H. Grayson, D.F. Osborne, T.H. Wagner, J.P. Cobb, C. Coopersmith, and I.E. Karl (2002) *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis*. Journal of immunology 168:2493-500.
86. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, M.H. Grayson, D.F. Osborne, T.H. Wagner, J.P. Cobb, C. Coopersmith, and I.E. Karl (2002) *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis*. J Immunol 168:2493-500.
87. Hubbard, W.J., M. Choudhry, M.G. Schwacha, J.D. Kerby, L.W. Rue, 3rd, K.I. Bland, and I.H. Chaudry (2005) *Cecal ligation and puncture*. Shock 24 Suppl 1:52-7.
88. Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.J. Hodes, and R.M. Steinman (1994) *The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro*. The Journal of experimental medicine 180:1849-60.
89. Inlay, M.A., D. Bhattacharya, D. Sahoo, T. Serwold, J. Seita, H. Karsunky, S.K. Plevritis, D.L. Dill, and I.L. Weissman (2009) *Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development*. Genes & development 23:2376-81.
90. Janeway, C. (2005) *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed, New York:Garland Science,
91. Janeway, C.A., Jr. (1989) *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 54 Pt 1:1-13.
92. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov (2002) *Innate immune recognition*. Annual review of immunology 20:197-216.
93. Jean-Baptiste, E. (2007) *Cellular mechanisms in sepsis*. J Intensive Care Med 22:63-72.

94. Ji, Y.R., Z.X. Yang, Z.B. Han, L. Meng, L. Liang, X.M. Feng, S.G. Yang, Y. Chi, D.D. Chen, Y.W. Wang, and Z.C. Han (2012) *Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells*. *Cell Physiol Biochem* 30:1526-37.
95. Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J.A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman (2007) *Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation*. *Immunity* 27:610-24.
96. Jiang, L.N., Y.M. Yao, and Z.Y. Sheng (2012) *The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication*. *J Interferon Cytokine Res* 32:341-9.
97. Juarez, J.G., N. Harun, M. Thien, R. Welschinger, R. Baraz, A.D. Pena, S.M. Pitson, M. Rettig, J.F. DiPersio, K.F. Bradstock, and L.J. Bendall (2012) *Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice*. *Blood* 119:707-16.
98. Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira (2001) *Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells*. *Journal of immunology* 166:5688-94.
99. Kalinski, P., J.H. Schuitemaker, C.M. Hilkens, and M.L. Kapsenberg (1998) *Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation*. *Journal of immunology* 161:2804-9.
100. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira (1999) *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity* 11:115-22.
101. Kawai, T. and S. Akira (2007) *TLR signaling*. *Seminars in Immunology* 19:24-32.
102. Khor, C.C., S.J. Chapman, F.O. Vannberg, A. Dunne, C. Murphy, E.Y. Ling, A.J. Frodsham, A.J. Walley, O. Kyrieleis, A. Khan, C. Aucan, S. Segal, C.E. Moore, K. Knox, S.J. Campbell, C. Lienhardt, A. Scott, P. Aaby, O.Y. Sow, R.T. Grignani, J. Sillah, G. Sirugo, N. Peshu, T.N. Williams, K. Maitland, R.J. Davies, D.P. Kwiatkowski, N.P. Day, D. Yala, D.W. Crook, K. Marsh, J.A. Berkley, L.A. O'Neill, and A.V. Hill (2007) *A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis*. *Nat Genet* 39:523-8.
103. Komai-Koma, M., L. Jones, G.S. Ogg, D. Xu, and F.Y. Liew (2004) *TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3029-34.
104. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi (1997) *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. *Cell* 91:661-72.
105. Korczowska, E. and A. Pluta (2004) *[Anemia in congestive heart failure]*. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 112:1235-9.

106. Kubo, S., H.K. Takahashi, M. Takei, H. Iwagaki, T. Yoshino, N. Tanaka, S. Mori, and M. Nishibori (2004) *E-prostanoid (EP)2/EP4 receptor-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells and induction of helper T2 polarization*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 309:1213-20.
107. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira (2009) *Pathogen recognition in the innate immune response*. The Biochemical journal 420:1-16.
108. Kunisawa, J. (2008) *Sphingosine 1-phosphate-dependent trafficking of peritoneal B cells requires functional NF[ $\kappa$ ]B-inducing kinase in stromal cells*. Blood 111:4646-4652.
109. Kveberg, L., Y. Bryceson, M. Inngjerdigen, B. Rolstad, and A.A. Maghazachi (2002) *Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases*. Eur J Immunol 32:1856-64.
110. Laffont, S., K.R. Siddiqui, and F. Powrie (2010) *Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells*. European journal of immunology 40:1877-83.
111. LeBien, T.W. and T.F. Tedder (2008) *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood 112:1570-80.
112. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann (1996) *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell 86:973-83.
113. Leng, F.Y., J.L. Liu, Z.J. Liu, J.Y. Yin, and H.P. Qu (2013) *Increased proportion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells during early-stage sepsis in ICU patients*. J Microbiol Immunol Infect 46:338-44.
114. Leon, B., G. Martinez del Hoyo, V. Parrillas, H.H. Vargas, P. Sanchez-Mateos, N. Longo, M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin (2004) *Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells*. Blood 103:2668-76.
115. Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, G. Ramsay, and Scm/Esicm/Accp/Ats/Sis (2003) *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med 31:1250-6.
116. Lewis, N.D., S.A. Haxhinasto, S.M. Anderson, D.E. Stefanopoulos, S.E. Fogal, P. Adusumalli, S.N. Desai, L.A. Patnaude, S.M. Lukas, K.R. Ryan, A.J. Slavin, M.L. Brown, and L.K. Modis (2013) *Circulating monocytes are reduced by sphingosine-1-phosphate receptor modulators independently of S1P3*. Journal of immunology 190:3533-40.
117. Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh (2007) *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature reviews. Immunology 7:678-89.

118. Lindquist, R.L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M.L. Dustin, and M.C. Nussenzweig (2004) *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. Nat Immunol 5:1243-50.
119. Liu, K. and M.C. Nussenzweig (2010) *Origin and development of dendritic cells*. Immunological reviews 234:45-54.
120. Liu, K., C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, and M. Nussenzweig (2007) *Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice*. Nature immunology 8:578-83.
121. Liu, Y.J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet (2001) *Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation*. Nature immunology 2:585-9.
122. Lorenz, E., J.P. Mira, K.L. Frees, and D.A. Schwartz (2002) *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. Arch Intern Med 162:1028-32.
123. Lunemann, A., J.D. Lunemann, and C. Munz (2009) *Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity*. Mol Med 15:352-8.
124. Lutz, M.B., N.A. Kukutsch, M. Menges, S. Rossner, and G. Schuler (2000) *Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro*. Eur J Immunol 30:1048-52.
125. Maier, S., T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Huser, B. Holzmann, A. Stier, K. Pfeffer, and C.D. Heidecke (2004) *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis*. Shock 21:505-11.
126. Martinon, F. and J. Tschopp (2005) *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends in immunology 26:447-54.
127. Matloubian, M. (2004) *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. Nature 427:355-360.
128. McCall, C.E., M. El Gazzar, T. Liu, V. Vachharajani, and B. Yoza (2011) *Epigenetics, bioenergetics, and microRNA coordinate gene-specific reprogramming during acute systemic inflammation*. J Leukoc Biol 90:439-46.
129. McDermott, A.M. (2013) *Antimicrobial compounds in tears*. Experimental eye research 117:53-61.
130. McGreal, E.P., J.L. Miller, and S. Gordon (2005) *Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors*. Current opinion in immunology 17:18-24.
131. McLellan, A.D., R.V. Sorg, L.A. Williams, and D.N. Hart (1996) *Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway*. European journal of immunology 26:1204-10.

132. Medvedev, A.E., K.M. Kopydlowski, and S.N. Vogel (2000) *Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression*. Journal of immunology 164:5564-74.
133. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. (1997) *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature 388:394-7.
134. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C.A. Janeway, Jr. (1998) *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. Molecular cell 2:253-8.
135. Melendez, A.J. and F.B. Ibrahim (2004) *Antisense knockdown of sphingosine kinase 1 in human macrophages inhibits C5a receptor-dependent signal transduction, Ca<sup>2+</sup> signals, enzyme release, cytokine production, and chemotaxis*. Journal of immunology 173:1596-603.
136. Metlay, J.P., M.D. Witmer-Pack, R. Agger, M.T. Crowley, D. Lawless, and R.M. Steinman (1990) *The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies*. The Journal of experimental medicine 171:1753-71.
137. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin (2006) *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature 442:39-44.
138. Miller, L.S., R.M. O'Connell, M.A. Gutierrez, E.M. Pietras, A. Shahangian, C.E. Gross, A. Thirumala, A.L. Cheung, G. Cheng, and R.L. Modlin (2006) *MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against Staphylococcus aureus*. Immunity 24:79-91.
139. Moens, E. and M. Veldhoen (2012) *Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours*. Immunology 135:1-8.
140. Monserrat, J., R. de Pablo, D. Diaz-Martin, M. Rodriguez-Zapata, A. de la Hera, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon (2013) *Early alterations of B cells in patients with septic shock*. Crit Care 17:R105.
141. Monserrat, J., R. De Pablo, and D. Diaz, *Cellular and Molecular Markers of Outcome in Septic Shock*, in *Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer*, R. Fernandez, Editor. 2012, Intech.
142. Monteiro, J.P., A. Benjamin, E.S. Costa, M.A. Barcinski, and A. Bonomo (2005) *Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4<sup>+</sup> T cells*. Blood 105:1484-91.
143. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz (1989) *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. Annual review of immunology 7:445-80.

144. Muenzer, J.T., C.G. Davis, B.S. Dunne, J. Unsinger, W.M. Dunne, and R.S. Hotchkiss (2006) *Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis*. Shock 26:565-70.
145. Munoz, C., J. Carlet, C. Fitting, B. Misset, J.P. Bleriot, and J.M. Cavaillon (1991) *Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis*. J Clin Invest 88:1747-54.
146. Nagai, Y., K.P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrun, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu, and P.W. Kincade (2006) *Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment*. Immunity 24:801-12.
147. Nakamura, M., Y. Shimizu, Y. Sato, Y. Miyazaki, T. Satoh, M. Mizuno, Y. Kato, Y. Hosaka, and S. Furusako (2007) *Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, M62812, suppresses endothelial cell and leukocyte activation and prevents lethal septic shock in mice*. Eur J Pharmacol 569:237-43.
148. Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, and S. Akira (2000) *Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression*. J Immunol 164:3476-9.
149. Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.H. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong (2008) *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages*. Immunity 29:138-49.
150. O'Neill, D.W., S. Adams, and N. Bhardwaj (2004) *Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer*. Blood 104:2235-46.
151. Oldenburg, M., A. Kruger, R. Ferstl, A. Kaufmann, G. Nees, A. Sigmund, B. Bathke, H. Lauterbach, M. Suter, S. Dreher, U. Koedel, S. Akira, T. Kawai, J. Buer, H. Wagner, S. Bauer, H. Hochrein, and C.J. Kirschning (2012) *TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification*. Science 337:1111-5.
152. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha (2009) *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. J Immunol 182:4499-506.
153. Otto, G.P., M. Sossdorf, R.A. Claus, J. Rodel, K. Menge, K. Reinhart, M. Bauer, and N.C. Riedemann (2011) *The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate*. Crit Care 15:R183.
154. Pappu, R., S.R. Schwab, I. Cornelissen, J.P. Pereira, J.B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y.W. Zheng, Y. Huang, J.G. Cyster, and S.R. Coughlin (2007) *Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate*. Science 316:295-8.
155. Pastille, E., S. Didovic, D. Brauckmann, M. Rani, H. Agrawal, F.U. Schade, Y. Zhang, and S.B. Flohe (2011) *Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis*. Journal of immunology 186:977-86.

156. Pastille, E., S. Pohlmann, F. Wirsdorfer, A. Reib, and S.B. Flohe (2014) *A disturbed interaction with accessory cells upon opportunistic infection with Pseudomonas aeruginosa contributes to an impaired IFN-gamma production of NK cells in the lung during sepsis-induced immunosuppression*. *Innate Immun*
157. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon (2002) *Scavenger receptors in innate immunity*. *Current opinion in immunology* 14:123-8.
158. Pene, F., E. Courtine, F. Ouaz, B. Zuber, B. Sauneuf, G. Sirgo, C. Rousseau, J. Toubiana, V. Balloy, M. Chignard, J.P. Mira, and J.D. Chiche (2009) *Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells*. *Infection and immunity* 77:5651-8.
159. Perl, T.M., L. Dvorak, T. Hwang, and R.P. Wenzel (1995) *Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis*. *JAMA* 274:338-45.
160. Pettus, B.J., J. Bielawski, A.M. Porcelli, D.L. Reames, K.R. Johnson, J. Morrow, C.E. Chalfant, L.M. Obeid, and Y.A. Hannun (2003) *The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:1411-21.
161. Pham, T.H., P. Baluk, Y. Xu, I. Grigorova, A.J. Bankovich, R. Pappu, S.R. Coughlin, D.M. McDonald, S.R. Schwab, and J.G. Cyster (2010) *Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning*. *J Exp Med* 207:17-27.
162. Puneet, P., C.T. Yap, L. Wong, Y. Lam, D.R. Koh, S. Moochhala, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, and A.J. Melendez (2010) *SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis*. *Science* 328:1290-4.
163. Quartin, A.A., R.M. Schein, D.H. Kett, and P.N. Peduzzi (1997) *Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival*. *Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group*. *JAMA* 277:1058-63.
164. Rangel-Frausto, M.S. (1999) *The epidemiology of bacterial sepsis*. *Infect Dis Clin North Am* 13:299-312, vii.
165. Ratajczak, M.Z., H. Lee, M. Wysoczynski, W. Wan, W. Marlicz, M.J. Laughlin, M. Kucia, A. Janowska-Wieczorek, and J. Ratajczak (2010) *Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex*. *Leukemia* 24:976-85.
166. Reizis, B. (2012) *Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage*. *The Journal of experimental medicine* 209:1053-6.

167. Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera (2008) *The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity*. Nat Rev Immunol 8:753-63.
168. Rock, F.L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, and J.F. Bazan (1998) *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:588-93.
169. Rodriguez-Zapata, M., I. Salmeron, L. Manzano, O.J. Salmeron, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon (1996) *Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis*. Eur J Clin Invest 26:136-40.
170. Rodriguez, S., A. Chora, B. Goumnerov, C. Mumaw, W.S. Goebel, L. Fernandez, H. Baydoun, H. HogenEsch, D.M. Dombkowski, C.A. Karlewicz, S. Rice, L.G. Rahme, and N. Carlesso (2009) *Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis*. Blood 114:4064-76.
171. Rosen, H., P.J. Gonzalez-Cabrera, M.G. Sanna, and S. Brown (2009) *Sphingosine 1-phosphate receptor signaling*. Annu Rev Biochem 78:743-68.
172. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui (2008) *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nature reviews. Immunology 8:9-21.
173. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider (2009) *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunological reviews 229:12-26.
174. Saito, T., T. Yokosuka, and A. Hashimoto-Tane (2010) *Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters*. FEBS letters 584:4865-71.
175. Saito, Y., H. Iwamura, T. Kaneko, H. Ohnishi, Y. Murata, H. Okazawa, Y. Kanazawa, M. Sato-Hashimoto, H. Kobayashi, P.A. Oldenborg, M. Naito, Y. Kaneko, Y. Nojima, and T. Matozaki (2010) *Regulation by SIRPalpha of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues*. Blood 116:3517-25.
176. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia (1995) *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. The Journal of experimental medicine 182:389-400.
177. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia (1998) *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. European journal of immunology 28:2760-9.
178. Salomao, R., M.K. Brunialti, M.M. Rapozo, G.L. Baggio-Zappia, C. Galanos, and M. Freudenberg (2012) *Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis*. Shock 38:227-42.

179. Sander, L.E., S.D. Sackett, U. Dierssen, N. Beraza, R.P. Linke, M. Muller, J.M. Blander, F. Tacke, and C. Trautwein (2010) *Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function.* J Exp Med 207:1453-64.
180. Scheeren, R.A., G. Koopman, S. Van der Baan, C.J. Meijer, and S.T. Pals (1991) *Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes.* European journal of immunology 21:1101-5.
181. Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher, and K. Reske (1992) *Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Journal of immunological methods 154:253-64.
182. Schroder, M., C. Richter, M.H. Juan, K. Maltusch, O. Giegold, G. Quintini, J.M. Pfeilschifter, A. Huwiler, and H.H. Radeke (2011) *The sphingosine kinase 1 and S1P1 axis specifically counteracts LPS-induced IL-12p70 production in immune cells of the spleen.* Molecular immunology 48:1139-48.
183. Schwab, S.R., J.P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang, and J.G. Cyster (2005) *Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients.* Science 309:1735-9.
184. Schwartz, E.L., H. Chamberlin, and A.B. Brechbuhl (1991) *Regulation of c-myc expression by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human leukemia cells.* Blood 77:2716-23.
185. Scimone, M.L., I. Aifantis, I. Apostolou, H. von Boehmer, and U.H. von Andrian (2006) *A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:7006-11.
186. Scott, C.L., A.M. Aumeunier, and A.M. Mowat (2011) *Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?* Trends in immunology 32:412-9.
187. Scott, N.M., R.L. Ng, S. Gorman, M. Norval, J. Waithman, and P.H. Hart (2014) *Prostaglandin E2 imprints a long-lasting effect on dendritic cell progenitors in the bone marrow.* J Leukoc Biol 95:225-32.
188. Scumpia, P.O., K.M. Kelly-Scumpia, M.J. Delano, J.S. Weinstein, A.G. Cuenca, S. Al-Quran, I. Bovio, S. Akira, Y. Kumagai, and L.L. Moldawer (2010) *Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling.* J Immunol 184:2247-51.
189. Seder, R.A. and W.E. Paul (1994) *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells.* Annual review of immunology 12:635-73.
190. Semerad, C.L., F. Liu, A.D. Gregory, K. Stumpf, and D.C. Link (2002) *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood.* Immunity 17:413-23.

191. Serbina, N.V., T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, and E.G. Pamer (2003) *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. *Immunity* 19:59-70.
192. Shahinian, A., K. Pfeffer, K.P. Lee, T.M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P.S. Ohashi, C.B. Thompson, and T.W. Mak (1993) *Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice*. *Science* 261:609-12.
193. Sheel, M. and C.R. Engwerda (2012) *The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases*. *Trends in parasitology* 28:408-16.
194. Shi, C. and E.G. Pamer (2011) *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. *Nature reviews. Immunology* 11:762-74.
195. Shinomiya, S., H. Naraba, A. Ueno, I. Utsunomiya, T. Maruyama, S. Ohuchida, F. Ushikubi, K. Yuki, S. Narumiya, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, and S. Oh-ishi (2001) *Regulation of TNFalpha and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists*. *Biochemical pharmacology* 61:1153-60.
196. Shortman, K. and S.H. Naik (2007) *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. *Nature reviews. Immunology* 7:19-30.
197. Shreedhar, V., A.M. Moodycliffe, S.E. Ullrich, C. Bucana, M.L. Kripke, and L. Flores-Romo (1999) *Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo*. *Immunity* 11:625-36.
198. Siddiqui, K.R., S. Laffont, and F. Powrie (2010) *E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis*. *Immunity* 32:557-67.
199. Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y.J. Liu (1999) *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. *Science* 284:1835-7.
200. Sinistro, A., C. Almerighi, C. Ciaprini, S. Natoli, E. Sussarello, S. Di Fino, F. Calo-Carducci, G. Rocchi, and A. Bergamini (2008) *Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients*. *Clin Vaccine Immunol* 15:1851-8.
201. Skrupky, L.P., P.W. Kerby, and R.S. Hotchkiss (2011) *Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects*. *Anesthesiology* 115:1349-62.
202. Spiegel, S. and S. Milstien (2000) *Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors*. *Biochim Biophys Acta* 1484:107-16.
203. Sreeramkumar, V., M. Fresno, and N. Cuesta (2012) *Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes?* *Immunology and cell biology* 90:579-86.

204. Starborg, M., K. Gell, E. Brundell, and C. Hoog (1996) *The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression*. Journal of cell science 109 ( Pt 1):143-53.
205. Steinhauser, M.L., C.M. Hogaboam, S.L. Kunkel, N.W. Lukacs, R.M. Strieter, and T.J. Standiford (1999) *IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense*. J Immunol 162:392-9.
206. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn (1973) *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. The Journal of experimental medicine 137:1142-62.
207. Steinman, R.M., D.S. Lustig, and Z.A. Cohn (1974) *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo*. The Journal of experimental medicine 139:1431-45.
208. Svajger, U., N. Obermajer, M. Anderluh, J. Kos, and M. Jeras (2011) *DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function*. J Leukoc Biol 89:893-905.
209. Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet (2009) *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science 325:612-6.
210. Tai, L.H., M.L. Goulet, S. Belanger, N. Toyama-Sorimachi, N. Fodil-Cornu, S.M. Vidal, A.D. Troke, D.W. McVicar, and A.P. Makrigiannis (2008) *Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC*. The Journal of experimental medicine 205:3187-99.
211. Tamoutounour, S., M. Guillemins, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri (2013) *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity 39:925-38.
212. Taylor, P.R. and S. Gordon (2003) *Monocyte heterogeneity and innate immunity*. Immunity 19:2-4.
213. Tinsley, K.W., M.H. Grayson, P.E. Swanson, A.M. Drewry, K.C. Chang, I.E. Karl, and R.S. Hotchkiss (2003) *Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells*. J Immunol 171:909-14.
214. Tinsley, K.W., M.H. Grayson, P.E. Swanson, A.M. Drewry, K.C. Chang, I.E. Karl, and R.S. Hotchkiss (2003) *Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells*. Journal of immunology 171:909-14.

215. Toti, P., C. De Felice, R. Occhini, K. Schuerfeld, M. Stumpo, M.C. Epistolato, R. Vatti, and G. Buonocore (2004) *Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis*. Am J Clin Pathol 122:765-71.
216. Traggiati, E., A. Casati, M. Frascoli, S. Porcellini, M. Ponzoni, F. Sanvito, L. Leng, R. Bucala, L. Moretta, and F. Grassi (2010) *Selective preservation of bone marrow mature recirculating but not marginal zone B cells in murine models of chronic inflammation*. PloS one 5:e11262.
217. Trombetta, E.S. and I. Mellman (2005) *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annual review of immunology 23:975-1028.
218. Tsaganos, T., E.J. Giamarellos-Bourboulis, S. Kollias, D. Zervakis, V. Karagianni, A. Pelekanou, E.C. Tampaki, M. Kontogiorgi, A. Koroneos, N. Drakoulis, A. Armaganidis, C. Roussos, and H. Giamarellou (2006) *Kinetics of progenitor hemopoietic stem cells in sepsis: correlation with patients survival?* BMC Infect Dis 6:142.
219. Tsujimoto, H., S. Ono, S. Hiraki, T. Majima, N. Kawarabayashi, H. Sugasawa, M. Kinoshita, H. Hiraide, and H. Mochizuki (2004) *Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock*. J Endotoxin Res 10:229-37.
220. Tsujimoto, H., S. Ono, T. Majima, P.A. Efron, M. Kinoshita, H. Hiraide, L.L. Moldawer, and H. Mochizuki (2006) *Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress*. Clin Immunol 119:180-7.
221. Tsujimoto, H., S. Ono, T. Majima, N. Kawarabayashi, E. Takayama, M. Kinoshita, S. Seki, H. Hiraide, L.L. Moldawer, and H. Mochizuki (2005) *Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis*. Shock 23:39-44.
222. Ueda, Y., D.W. Cain, M. Kuraoka, M. Kondo, and G. Kelsoe (2009) *IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia*. J Immunol 182:6477-84.
223. Ueda, Y., M. Kondo, and G. Kelsoe (2005) *Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow*. J Exp Med 201:1771-80.
224. Valanne, S., J.H. Wang, and M. Ramet (2011) *The Drosophila Toll signaling pathway*. Journal of immunology 186:649-56.
225. Valenzuela, J., C. Schmidt, and M. Mescher (2002) *The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells*. Journal of immunology 169:6842-9.
226. van der Poll, T. (2012) *Preclinical sepsis models*. Surg Infect (Larchmt) 13:287-92.

227. van der Pouw Kraan, T.C., L.C. Boeije, R.J. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden (1995) *Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production*. J Exp Med 181:775-9.
228. van Dissel, J.T., P. van Langevelde, R.G. Westendorp, K. Kwappenberg, and M. Frolich (1998) *Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients*. Lancet 351:950-3.
229. van Furth, R. and Z.A. Cohn (1968) *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. The Journal of experimental medicine 128:415-35.
230. Venet, F., A. Lepape, and G. Monneret (2011) *Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions*. Crit Care 15:231.
231. Vepsalainen, S., M. Parkinson, S. Helisalmi, A. Mannermaa, H. Soininen, R.E. Tanzi, L. Bertram, and M. Hiltunen (2007) *Insulin-degrading enzyme is genetically associated with Alzheimer's disease in the Finnish population*. J Med Genet 44:606-8.
232. Vincent, J.L., J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, R. Moreno, J. Lipman, C. Gomersall, Y. Sakr, K. Reinhart, and E.I.G.o. Investigators (2009) *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. JAMA 302:2323-9.
233. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman (2000) *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. Journal of immunology 164:2978-86.
234. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman (1992) *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells*. The Journal of experimental medicine 176:47-58.
235. Walley, K.R., N.W. Lukacs, T.J. Standiford, R.M. Strieter, and S.L. Kunkel (1996) *Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis*. Infect Immun 64:4733-8.
236. Walzer, T., M. Dalod, S.H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier (2005) *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood 106:2252-8.
237. Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig (2008) *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nature immunology 9:676-83.
238. Weiss, S.J. (1989) *Tissue destruction by neutrophils*. N Engl J Med 320:365-76.
239. Wen, H., C.M. Hogaboam, J. Gauldie, and S.L. Kunkel (2006) *Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile*. Am J Pathol 168:1940-50.

240. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry (1980) *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. The Journal of surgical research 29:189-201.
241. Williams, D.L., T. Ha, C. Li, J.H. Kalbfleisch, J. Schweitzer, W. Vogt, and I.W. Browder (2003) *Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality*. Critical care medicine 31:1808-18.
242. Williams, D.L., T. Ha, C. Li, J.H. Kalbfleisch, J. Schweitzer, W. Vogt, and I.W. Browder (2003) *Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality*. Crit Care Med 31:1808-18.
243. Wu, L. and A. Dakic (2004) *Development of dendritic cell system*. Cellular & molecular immunology 1:112-8.
244. Wu, L. and K. Shortman (2005) *Heterogeneity of thymic dendritic cells*. Seminars in Immunology 17:304-12.
245. Wu, X., W. Hou, S. Sun, E. Bi, Y. Wang, M. Shi, J. Zang, C. Dong, and B. Sun (2006) *Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming*. J Immunol 177:934-43.
246. Xie, J.H., N. Nomura, S.L. Koprak, E.J. Quackenbush, M.J. Forrest, and H. Rosen (2003) *Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells*. Journal of immunology 170:3662-70.
247. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira (2003) *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science 301:640-3.
248. Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski (1998) *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling*. Nature 395:284-8.
249. Yokosuka, T., M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, and T. Saito (2012) *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. The Journal of experimental medicine 209:1201-17.
250. Yu, W.L., Q. Fu, and N.Q. Cui (2011) *[Relation of mesenteric lymph node and innate immune function in septic rats]*. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 23:271-4.
251. Zhang, A.L., P. Colmenero, U. Purath, C. Teixeira de Matos, W. Hueber, L. Klareskog, I.H. Tarner, E.G. Engleman, and K. Soderstrom (2007) *Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells*. Blood 110:2484-93.

252. Zhao, P., X. Xiao, R.M. Ghobrial, and X.C. Li (2013) *IL-9 and Th9 cells: progress and challenges*. International immunology 25:547-51.
253. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman (2009) *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity 30:646-55.
254. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul (2010) *Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)*. Annual review of immunology 28:445-89.
255. Zlotoff, D.A., A. Sambandam, T.D. Logan, J.J. Bell, B.A. Schwarz, and A. Bhandoola (2010) *CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus*. Blood 115:1897-905.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

2-HPCD	2-Hydroxypropylpropyl- $\beta$ -cyclodextrin
APC	antigen presenting cell
BMC	<i>bone marrow cells</i>
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
CARS	<i>compensatory antiinflammatory response syndrom</i>
CD	cluster of differentiation
cDC	<i>conventional dendritic cell</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
CLP	common lymphoid progenitor
CLP	cecal ligation an puncture
CMP	common myeloid progenitor
CpG	Nicht-methylierte Cytosin-phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotide
CTLA-4	<i>cytotoxic t lymphocyte antigen 4</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DC-SIGN	<b><i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i></b>
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assa</i>
FACS	<i>fluorescence associated cell staining</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLT3-L	<i>fms-like-Tyrosinkinase 3</i>
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	<i>Forward-scattered light</i>
GALT	<i>gut associated lymphoid tissues</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macro-phage colony stimulating factor</i>
HMGB-1	<i>high-mobility group box-1</i>
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
HSC	hematopoetic stem cell
HSP	Hitze-Schock-Protein
i.n.	<i>intra nasal</i>
i.v.	<i>intra venös</i>

ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-12/10	Interleukin-12 bzw. -10
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
LRR-	
Sequenz	N-terminale leucinreiche Sequenz
LTA	lipoteichoic acid
MDP	<i>monocyte/macrophage and DC progenitor</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MoDC	aus Monozyten differenzierte dendritische Zelle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRSA	multiresistenter <i>S. aureus</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NOD-like	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like</i>
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OP	Operation
PAF	plättchenaktivierender Faktor
Pam3CSK4	Triacyl-Lipopeptide
PAMP	<i>pathogenassociated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffert saline</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PDL-1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PGE	Prostaglandin
PGN	Peptidoglukan
PIRO	<i>predisposing factors, infection, response, organ dysfunction</i>
Pre-DC	DC-Vorläufer
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>

rmGM-CSF	recombinant mouse <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSV	respiratorischer Synzytial-Virus
s.c.	<i>sub cutan</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrom</i>
SphK	Sphingosinkinasen
SSC	<i>Side-scattered light</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
TCR	t cell receptor
Tfh	folikuläre T <sub>H</sub> -Zellen
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor</i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TipDC	TNF-α und iNOS produzierende dendritische Zelle
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor-protein</i>
TIR-Domäne	Toll/IL-1-Rezeptor homologen Domäne
TLR	<i>toll like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TSA	<i>tryptic soy agar</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
VLE RPM	<i>very low endotoxin RPMI</i>

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Differenzierungspotential von Monozyten unter homöostatischen.....	9
Abbildung 1.2 Morphologie dendritischer Zellen.....	12
Abbildung 1.3 Dendritische Zellen entstehen aus myeloiden Vorläufern im Knochenmark (adaptiert von [164]). .....	13
Abbildung 3.1 Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Einflüsse in der frühen Phase der Sepsis (6 Stunden nach CLP). .....	39
Abbildung 3.2 Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Effekte in der akuten Phase der Sepsis (36 Stunden nach CLP). .....	39
Abbildung 3.3 Versuchsablauf zur Untersuchung S1P-abhängiger Effekte auf die Entwicklung der postseptischen DC-Dysfunktion (vier Tage nach CLP). .....	40
Abbildung 4.1 Knochenmarkleukozyten während Sepsis. ....	46
Abbildung 4.2 B-Zellen und Granulozyten im Knochenmark während Sepsis. ....	47
Abbildung 4.3 T- und NK-Zellen im Knochenmark während Sepsis. ....	49
Abbildung 4.4 Monozytenpopulationen im Knochenmark während Sepsis.....	51
Abbildung 4.5 Proliferation und Aktivierung von Monozyten im Knochenmark während Sepsis.....	53
Abbildung 4.6 Dendritische Zellen im Knochenmark während Sepsis.....	54
Abbildung 4.7 Zeitliche Änderung der Zahl CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark während Sepsis.....	55
Abbildung 4.8 Zeitlicher Einfluss der Sepsis auf die BMDC de novo Differenzierung aus Knochenmarkszellen in vitro.....	57
Abbildung 4.9 Depletion bzw. Isolation von CD4 <sup>+</sup> DC aus dem Knochenmark septischer Mäuse. ....	59
Abbildung 4.10 Einfluss CD4 <sup>+</sup> DC auf die in vitro Generierung von BMDC aus dem Knochenmark während Sepsis.....	60
Abbildung 4.11 Charakterisierung CD4 <sup>+</sup> DC aus dem Knochenmark während Sepsis. ....	61
Abbildung 4.12 Zeitliche Änderung der Zahl CD4 <sup>+</sup> DC in den mesenterialen Lymphknoten während Sepsis. ....	63
Abbildung 4.13 Zeitliche Änderung der Zahl CD4 <sup>+</sup> DC in der Milz und im Blut während Sepsis. ....	65

Abbildung 4.14 Einfluss der mesenterialen Lymphknoten auf die Akkumulation der CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark während Sepsis. ....	66
Abbildung 4.15 Einfluss der Entfernung der mesenterialen Lymphknoten auf die post-septische DC-Differenzierung.....	67
Abbildung 4.16 Einfluss der Entfernung der mesenterialen Lymphknoten auf die postseptische Immunsuppression von Leukozyten in der Milz.....	68
Abbildung 4.17 Einfluss der Milz auf die Akkumulation CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark während Sepsis.....	69
Abbildung 4.18 Einfluss der TLR-Signaltransduktion auf die Akkumulation von CD4 <sup>+</sup> DC und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark und in der Milz. ....	70
Abbildung 4.19 Systemische Blockade von S1PR verhindert die frühe transiente Akkumulation CD4 <sup>+</sup> DC in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten.....	71
Abbildung 4.20 Systemische Blockade von S1PR verhindert die Akkumulation CD4 <sup>+</sup> DC und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark.....	73
Abbildung 4.21 Einfluss der systemischen Blockade von S1PR auf Monozytenpopulationen im Knochenmark.. ....	74
Abbildung 4.22 Einfluss systemischer Blockade von S1PR auf die Zahl CD4 <sup>+</sup> DC im Knochenmark und der Milz 4 Tage nach Sepsisinduktion. ....	75
Abbildung 4.23 Zelluläre Veränderungen der Lunge nach systemischer Blockade von S1PR 4 Tage nach Sepsisinduktion.. ....	76
Abbildung 4.24 Einfluss der systemischen Blockade von S1PR auf die BMDC-Differenzierung im Knochenmark 4 Tage nach Sepsisinduktion.....	77

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.2.3.2 Kostimulatorische Rezeptoren in der immunologischen Synapse ....	15
Tabelle 1.3.2 TLR und deren Liganden.....	17
Tabelle 2.2.2 Geräteverzeichnis .....	26
Tabelle 2.3.1.1 Reagenzien, Stimuli, Bakterien.....	27
Tabelle 2.3.3.1 Verwendete Lösungen und Puffer .....	28
Tabelle 2.4 2 Antikörperverzeichnis .....	30

## **8.4 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 8.5 Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Mechanismen der Akkumulation von CD4<sup>+</sup> dendritischen Zellen im Knochenmark und deren Auswirkung auf die Differenzierung dendritischer Zellen während der polymikrobiellen Sepsis“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Stephanie Pohlmann befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Stefanie Flohé

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c + e der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Stephanie Pohlmann

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d + f der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Stephanie Pohlmann