

**Pathogenese der chronischen
Immunsuppression durch eine fehlerhafte
Differenzierung von dendritischen Zellen
nach Sepsis**

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

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Eva Pastille

aus Dortmund
Juni 2011

„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts
anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer
nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Für die, die mich begleitet haben

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der AG Chirurgische Forschung, Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Stefanie B. Flohé

2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

3. Gutachter: PD Dr. Heike Weighardt

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2011

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1.1	NK-Zellen	2
1.1.1.2	Granulozyten	5
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	6
1.1.2.1	T-Helferzellen und Regulatorische T-Zellen	7
1.2	Dendritische Zellen	9
1.2.1	Herkunft und Verbreitung	9
1.2.2	Aktivierung, Reifung und Migration	10
1.2.3	Aktivierung von T-Zellen	12
1.2.4	Interaktion mit NK-Zellen	14
1.3	Sepsis	15
1.3.1	Pathogenese der polymikrobiellen Sepsis	16
1.3.1.1	Immunsuppression nach Sepsis	19
1.3.2	Rolle von Dendritischen Zellen während der polymikrobiellen Sepsis	19
1.3.3	Das Knochenmark während der polymikrobiellen Sepsis	20
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
2	MATERIAL	23
2.1	Verbrauchsmaterial	23
2.2	Labor-Geräte	23
2.3	Chemikalien, Reagenzien, Stimuli und Bakterien	23
2.3.1	Chemikalien	23
2.3.2	Reagenzien, Zytokine und Stimuli	23
2.3.3	Bakterien	24
2.4	Seren, Medien, Puffer und Lösungen	24
2.4.1	Seren	24
2.4.2	Puffer und Lösungen	25
2.4.3	Kulturmedium	25
2.4.4	Medium für Bakterien-Kultivierung	26

2.5	Kommerzielle Standardtests	26
2.6	Antikörper.....	27
2.7	Versuchstiere	28
3	METHODEN	29
3.1	Zökale Ligation und Punktion als Tier-Modell für polymikrobielle Sepsis.....	29
3.2	Infektion mit <i>P. aeruginosa</i>.....	30
3.2.1	Anzucht der <i>P. aeruginosa</i>	30
3.2.2	Infektion der Versuchstiere mit <i>P. aeruginosa</i>	31
3.2.3	Bestimmung der bakteriellen Beladung der Lungen	31
3.3	Organentnahme	31
3.3.1	Präparation der Knochen.....	31
3.3.2	Präparation der Milz	32
3.3.3	Präparation der Lunge	32
3.3.4	Präparation der Lymphknoten	32
3.4	Zellkultur.....	33
3.4.1	Isolierung und Kultivierung muriner Zellen	33
3.4.1.1	Erythrozyten-Lyse.....	33
3.4.1.2	Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen.....	33
3.4.1.3	Isolierung und Kultivierung von Milzzellen.....	34
3.4.1.4	Isolierung und Kultivierung von Lungenzellen	34
3.4.1.5	Isolierung von Lymphknotenzellen	35
3.4.2	Isolierung muriner Zellpopulationen mittels <i>automated magnetic cell sorting</i> (autoMACS®)	35
3.4.2.1	Isolierung von CD4 ⁺ T-Helferzellen aus Milz und Lymphknoten	36
3.4.2.2	Isolierung von NK-Zellen aus der Milz.....	36
3.4.2.3	Isolierung von DC aus der Milz.....	36
3.5	Versuchsverlauf und Applikationen	37
3.5.1	Charakterisierung der Immunsuppression nach Sepsis.....	37
3.5.2	Charakterisierung der BMDC	37
3.5.2.1	Stimulation und OVA-Beladung der BMDC	37
3.5.2.2	Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	38
3.5.2.3	Einfluss von NK-Zellen auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung.....	39
3.5.2.4	Einfluss von IL-10 auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung	39
3.5.2.5	Einfluss von DC auf die <i>P. aeruginosa</i> Infektion	40
3.6	Durchflusszytometrie.....	40

3.6.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	41
3.6.2	Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , IL-12p40 und Foxp3	42
3.6.3	CFSE-Markierung von Zellen	43
3.7	Nachweis von löslichen Molekülen in Zellkultur-Überständen und Lungenhomogenisaten	44
3.7.1	Proteinbestimmung nach <i>Lowry</i>	44
3.7.2	Nachweis verschiedener Zytokine mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i> (ELISA) ..	45
3.7.3	Zytokinnachweis mittels <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	45
3.8	Statistische Analysen	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Charakterisierung der Immunsuppression nach Sepsis	48
4.2	Dysfunktion von DC in der Lunge	54
4.3	Dysfunktion von DC in der Milz	55
4.4	Charakterisierung des Knochenmarks während Sepsis	58
4.4.1	Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks nach Sepsis	59
4.4.2	Entwicklung der Knochenmarkzellen aus septischen Tieren in Kultur	62
4.4.3	Differenzierung der generierten BMDC nach Sepsis	63
4.5	Charakterisierung der Funktion von BMDC bei Sepsis	65
4.5.1	Sekretion von Zytokinen nach bakterieller Stimulation	65
4.5.2	Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	67
4.5.2.1	Beladung der BMDC mit OVA und CpG-Stimulation	68
4.5.2.2	Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay <i>in vivo</i>	70
4.6	Analyse möglicher Mechanismen der supprimierten TH1-Polarisierung durch CLP-BMDC <i>in vivo</i>	74
4.6.1	Untersuchung der Wanderung von BMDC in die Lymphknoten	74
4.6.2	Untersuchung der Beteiligung von IL-10	75
4.6.3	Untersuchung der Beteiligung von NK/NKT-Zellen	76
4.6.3.1	Effekt der NK/NKT-Zell-Inaktivierung auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	78
4.7	Untersuchung der Beteiligung von BMDC an der Sepsis-induzierten Immunsuppression	81
4.7.1	Interaktion von NK-Zellen und BMDC <i>in vitro</i>	86

5	DISKUSSION	89
5.1	DC und Immunsuppression während Sepsis	89
5.2	Mögliche Ursachen für die Modulation der Vorläuferzellen von DC im Knochenmark....	94
5.3	Dysfunktion aus dem Knochenmark differenzierter DC während Sepsis	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	LITERATURVERZEICHNIS	105
8	ANHANG	117
8.1	Abkürzungsverzeichnis	117
8.2	Abbildungsverzeichnis	121
8.3	Tabellenverzeichnis	124
8.4	Danksagung	125
8.5	Lebenslauf.....	126
8.6	Erklärungen	127

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (Latein: *immunis* für „frei“, „rein“ oder „unberührt“) ist ein komplexer Mechanismus des tierischen Organismus aus molekularen und zellulären Komponenten und dient der Abwehr von eindringenden Krankheitserregern (Pathogenen), wie Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten oder krankhaft veränderten körpereigenen Zellen. Während der phylogenetischen Entwicklung wurde das Immunsystem zu einem zunehmend komplexeren System [35]. Bereits in der Gruppe der Invertebrata (Wirbellose) besitzt die Klasse der Insekten die Fähigkeit, körperfremde Strukturen über unspezifische Rezeptoren zu erkennen [113]. Höher entwickelte Organismen (Wirbeltiere) besitzen zusätzlich zu dieser so genannten angeborenen Immunabwehr ein adaptives (erworbenes) Immunsystem, wodurch sie spezifische Strukturen von Pathogenen erkennen und diese über gezielte zelluläre Mechanismen abwehren können. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Arten der Immunabwehr liegt in den Typen von Rezeptoren und Mechanismen, die für die Erkennung der Pathogene verwendet werden [104]. Für einen wirksamen Schutz vor Infektionen müssen beide Teile des Immunsystems interagieren und sich optimal ergänzen.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die ersten Mechanismen zur Abwehr von einwandernden Mikroorganismen werden durch physische und chemische Barrieren des Körpers geformt. Dabei gelten die epithelialen Oberflächen (Haut und Schleimhäute) als physische Barrieren und Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen oder mikrobizid wirken, als chemische Barrieren. Die chemischen Barrieren umfassen den niedrigen pH-Wert im Magen, bestimmte Enzyme, wie Lysozym im Speichel oder der Tränenflüssigkeit, sowie antibakterielle Peptide, wie Defensine oder Cryptdine im Darm [90, 122].

Überwinden Pathogene diese initialen Abwehrmechanismen, so stellt die angeborene oder nicht-adaptive Immunität die erste Phase in der Abwehr von Infektionen dar. Diese beruht auf der Erkennung von konservierten molekularen Strukturen, die dem mikrobiellen Metabolismus entstammen und einzigartig für Mikroorganismen sind, auch PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) genannt. Hierfür verfügt das angeborene Immunsystem über eine limitierte Anzahl von Keimbahn-kodierten Rezeptoren, so genannten PRRs (*pathogen* oder *pattern recognition receptors*) und kann damit zwischen körpereigenen und infektiösen fremden Strukturen unterscheiden [75]. Bekannte PAMPs sind z. B. Zellwandbestandteile von Bakterien, wie Peptidoglycan und Lipopolysaccharid (LPS), oder bestimmte nichtmethylierte *desoxyribonucleic acid* (DNA)-Sequenzen, die nur bei Bakterien vorkommen (CpG-Oligonukleotide). Zu den PRRs gehören zum einen die auf der

Zelloberfläche lokalisierten *Scavenger*- und C-Typ Lektin-Rezeptoren, die intrazellulär vorliegenden *NOD-like* Rezeptoren (NLR) und RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) ähnlichen Proteine, sowie lösliche PRRs, zu denen das Mannose-bindende Lektin gehört [74]. Die wichtigsten PRRs sind die extrazellulär oder in Endosomen Membran-gebundenen Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*Toll-like receptor*, TLR). Hierbei handelt es sich um Transmembran-Rezeptoren, die virale Bestandteile und einige bakterielle Produkte erkennen. Ihre Stimulation führt zur Induktion von Signalkaskaden und dadurch zu einer Aktivierung der Transkription von bestimmten Genen inflammatorischer Zytokine [2, 72].

Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, Monozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC), Mastzellen, sowie neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Mastzellen spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Reaktionen, indem sie nach ihrer Aktivierung entzündliche Mediatoren, wie Histamine und Serotonine sekretieren [71]. Eosinophile Zellen sind beteiligt an der Immunität gegen Parasiten, wie z. B. Schistosomen [22]. Makrophagen, DC, neutrophile Granulozyten und Monozyten besiedeln als Phagozyten sämtliche Gewebe des Körpers, zirkulieren kontinuierlich in den Blutbahnen und können mittels PRRs körperfremde Proteine auf Mikroorganismen erkennen [63]. Als Antwort auf die Bindung von Pathogenen an ihre Rezeptoren produzieren sie chemotaktisch wirkende Moleküle, die weitere Phagozyten anlocken. Makrophagen und DC sind weiterhin in der Lage, Antigene, die nach der Phagozytose über einen intrazellulären Abbau der Pathogene prozessiert wurden, über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I und Klasse II zu präsentieren [9]. Über die Antigenpräsentation an T-Zellen wird so eine Verbindung zur adaptiven Immunantwort hergestellt.

Zum angeborenen Immunsystem gehören zusätzlich auch sekretierte Proteine, wie die Akut-Phase-Proteine und das Komplement-System. Akut-Phase-Proteine, wie z. B. das C-reaktive Protein (CRP), werden in Folge von Entzündungsprozessen gesteigert durch die Leber produziert und sekretiert. Sie können das Gerinnungssystem beeinflussen, Proteasen inhibieren [34], das Komplement-System aktivieren, oder die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen erhöhen [64]. Das Komplement-System besteht aus bestimmten proteolytischen Plasma-Proteinen, die untereinander reagieren, um die Erkennung von Pathogenen zu unterstützen und diese zu opsonieren. Die Opsonierung markiert die Pathogene zum Abbau über Phagozytose [58].

1.1.1.1 NK-Zellen

Als Teil des angeborenen Immunsystems besteht die Funktion der NK-Zellen in der Erkennung von krankhaft veränderten Zellen (z. B. durch mikrobielle/virale Infektion oder Tumortransformation) über Keimbahn-kodierte PRRs [87]. Dabei geschieht die Erkennung

unabhängig von spezifischen Antigenen und führt zu keiner klonalen Expansion [171]. NK-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen über die Vorstufe des *common lymphoid progenitor* (lymphoide Vorläuferzelle) zu NK-Zell-Vorläufern. Der Kontakt zu Zytokinen und Stroma-Zellen im Knochenmark induziert die Differenzierung und Reifung der NK-Zellen. Früh in der Entwicklung wird der Rezeptor für Interleukin (IL)-2 auf den NK-Zellen exprimiert, gefolgt von DX5 (in Mäusen) und dem *cluster of differentiation* (CD) 94-NKG2 Komplex. Die vollständige Reifung wird durch die Expression von MHC-spezifischen Rezeptoren (Ly49 in Mäusen) erreicht. Diese reifen NK-Zellen werden aus dem Knochenmark ins Blut freigesetzt und besiedeln alle lymphoiden Organe, sowie die Lunge und die Leber [33].

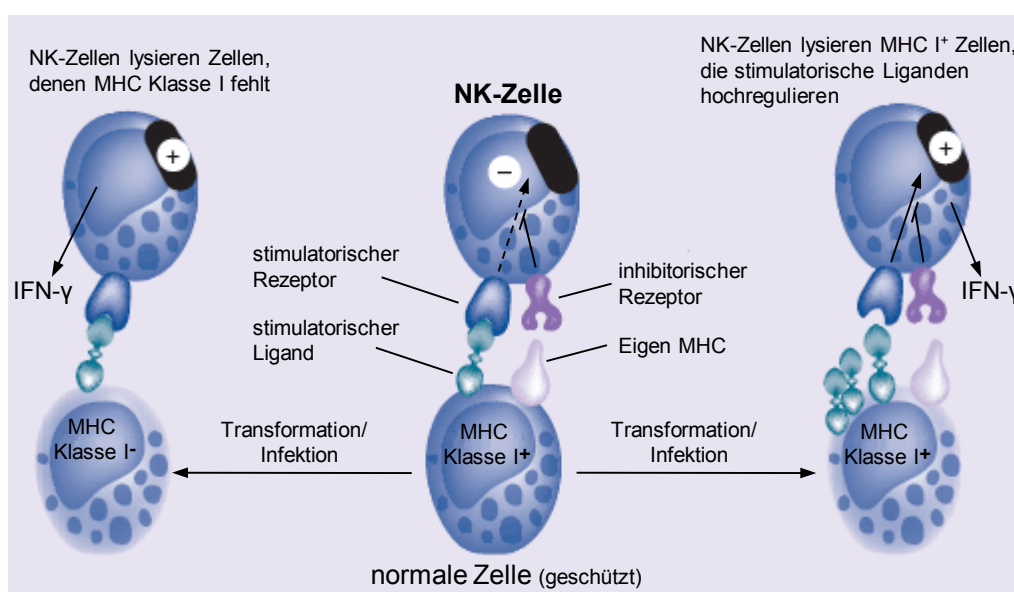


Abbildung 1.1 **Das Gleichgewicht der inhibierenden und stimulierenden Signale der NK-Zellen entscheidet über die Interaktion mit Zielzellen (adaptiert nach [1]).** Normale/gesunde Körperzellen entgehen der NK-Zell-Lyse, da sie durch die Expression von MHC Klasse I Molekülen Signale an die NK-Zelle vermitteln, die die aktivierenden Signale überlagern. Durch Infektionen oder Transformation der Körperzellen, z. B. durch Tumore, kann es zum Verlust von MHC Klasse I Molekülen kommen, oder es werden verstärkt stimulatorische Liganden für die NK-Zellen exprimiert. Der Verlust von inhibierenden Signalen, oder die Verstärkung der stimulierenden Signale führt zur Aktivierung der NK-Zelle.

Die Aktivierung von NK-Zellen wird reguliert über sich ergänzende und antagonistische Signalwege. Auf der Zelloberfläche der NK-Zellen befinden sich aktivierende Rezeptoren, die sowohl die Zytotoxizität, als auch die Sekretion von Zytokinen vermitteln. Hierzu zählen der *Natural Killer group 2D* (NKG2D) Rezeptor und NKp46. Als Antagonisten wirken die inhibierenden Rezeptoren NKG2(A/B) und die Heterodimere aus CD94 und NKG2 [109]. Eine weitere Klasse an Rezeptoren stellen die Ly49 Rezeptoren dar. Hier gibt es sowohl inhibitorische (Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, O, Q, S, T und V), als auch aktivierende (Ly49D, H, L, M, P, R, U und W). Gemeinsam mit NKG2D und CD94/NKG2 gehören sie zur Familie der

C-Typ-Lektine [45]. Liganden für die NK-Zell-Rezeptoren sind klassische MHC Klasse I Moleküle und strukturell verwandte Moleküle (z. B. *RNA export-1*, RAE-1) [45, 177]. Dadurch, dass gesunde Zellen eine normale Menge an MHC Klasse I Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren und nur eine geringe Zahl von Liganden für aktivierende Rezeptoren, werden sie nicht durch NK-Zellen lysiert. Die verminderte Expression von MHC Klasse I Molekülen auf Tumor-infizierten Zellen markiert diese zur Lyse [87] (s. Abbildung 1.1).

Anhand der Expression des Oberflächenmoleküls CD27 lassen sich sowohl murine, als auch humane NK-Zellen in funktionell unterschiedliche Gruppe unterteilen. NK-Zellen, die wenig CD27 exprimieren, sind weniger gut aktivierbar und werden durch gleichzeitige Expression von inhibierenden Rezeptoren reguliert. Eine hohe Expression von CD27 auf der Oberfläche korreliert bei den NK-Zellen mit einer verstärkten Effektorfunktion, einer erhöhten Empfindlichkeit für Chemokine und einer hohen Kapazität für die Produktion von Zytokinen [66]. Ein weiterer Differenzierungsmarker für NK-Zellen ist CD11b. Je mehr CD11b exprimiert wird, desto höher ist das Reifungsstadium. Die NK-Zellen der Untergruppe CD27^{lo}/CD11b^{hi} repräsentieren dabei ein ausgereiftes Stadium mit einer hohen Expression von Ly49 Molekülen [29].

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit Virus-infizierte und durch Tumore veränderte autologe Zellen zu lysieren [171]. Dies geschieht Zellkontakt-abhängig über die Ausschüttung von zytotoxischen Granula, die Perforine und Serin-Proteasen (Granzyme) enthalten, durch die NK-Zellen. Perforin führt zu einer Zerstörung der Zielzellen-Membran und der Einstrom der Serin-Proteasen bewirkt die Apoptose der Zielzelle über Caspase-abhängige und unabhängige Signalwege. Dabei kann die Zytotoxizität über ein Fehlen von MHC Klasse I Molekülen, oder die aktivierenden Rezeptoren ausgelöst werden und über die inhibierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen verhindert werden (s. Abbildung 1.1). Eine weitere Möglichkeit zur Induktion der Apoptose bei den Zielzellen besteht in der Expression von FAS Ligand (FASL) oder *tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) auf den NK-Zellen. Diese binden auf den Zielzellen an ihre entsprechenden Rezeptoren (FAS und TRAILR), wodurch ebenfalls die Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird [156].

Neben ihrer Funktion als Killerzellen können NK-Zellen andere Aufgaben innerhalb des Immunsystems übernehmen. Mit Hilfe von Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen sowohl zu einer Verbesserung als auch Verschlechterung des Krankheitsverlaufs beitragen können. Im EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*) Modell für Multiple Sklerose bei Mäusen führte die Depletion von NK-Zellen zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes [191], während in einer anderen Studie gezeigt wurde, dass das Fehlen von NK-Zellen zu einer Resistenz gegen die EAE Induktion führte [16]. Es wird hierbei diskutiert, dass NK-Zellen die T-Zell Polarisierung und Effektorfunktion während der initialen Phase einer Autoimmunantwort modulieren könnten,

oder zu einer Progression des Krankheitsverlaufs über eine direkte Gewebeschädigung führen könnten. Weiterhin kann eine adaptive Autoimmunantwort über die Beseitigung von myeloiden und lymphoiden Zellen durch NK-Zellen reguliert werden [97].

Nicht nur als Effektorzellen, interagieren NK-Zellen auch mit Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und können so regulatorisch Einfluss nehmen auf die adaptive Immunabwehr [172]. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Interaktion mit DC, die zu einer gegenseitigen Aktivierung von NK-Zellen und DC führen kann (für nähere Einzelheiten s. Abschnitt 1.2.4). Durch die Produktion von Zytokinen können NK-Zellen CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ T-Zellen beeinflussen [103, 193] und Zellkontakt-abhängig ist die Regulation von T-Zell-Aktivierung und Proliferation möglich [4, 198]. Neuere Studien zeigten weiterhin, dass bestimmte Untergruppen von NK-Zellen eine lang-anhaltende Antigen-spezifische Immunantwort auf Hapten-basierte Kontakt-Allergene vermitteln können [119]. Auch nach viraler Infektion wurden NK-Zellen beschrieben, die ein immunologisches Gedächtnis entwickeln [165]. Es wird somit davon ausgegangen, dass einige NK-Zellen direkt an der Vermittlung einer adaptiven Immunität beteiligt sind.

1.1.1.2 Granulozyten

Granulozyten besitzen in ihrem Zytoplasma dichte granuläre Strukturen und werden aufgrund ihrer einzigartig geformten Zellkerne auch polymorph kernige Leukozyten genannt. Man unterscheidet zwischen eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten. In ihren Granula sind verschiedene Enzyme und antimikrobielle Substanzen (z. B. toxische Proteine) enthalten. Eosinophile und basophile Granulozyten setzen diese frei, wenn sie aktiviert werden und sind vermutlich für die Abwehr von Parasiten verantwortlich, sowie an allergischen Reaktionen beteiligt [74].

Die neutrophilen Granulozyten sind die zahlreichsten der zirkulierenden Leukozyten und spielen eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Beseitigung von eindringenden Bakterien. Sie werden in hoher Rate ($5 - 10 \times 10^{10}$ Zellen/ Tag) im Knochenmark produziert. Ihre Lebensspanne, während sie zirkulieren, beträgt jedoch nur 6 - 8 h. Neutrophile können als Phagozyten relativ schnell über den Blutstrom zum Ort der Entzündung rekrutiert werden. Dort erkennen sie extrazelluläre Pathogene anhand ihrer PRRs und töten sie nach der Phagozytose in intrazellulären Vesikeln durch die darin enthaltenen Enzyme und Proteine, oder über die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies ab. Aufgrund ihres hohen Zerstörungspotentials kann es während der Elimination von Pathogenen auch zur Schädigung von gesundem Gewebe kommen [164]. Rekrutiert werden Neutrophile durch bestimmte Zytokine und Chemokine, unter anderem IFN- γ , *tumor necrosis factor* (TNF)- α und CXC Chemokine, die in Zusammenhang mit einer T-Helferzell (T_H)-Immunantwort des Typs 1 (T_H1) stehen.

Weiterhin wird die Phagozytose und die antimikrobielle Wirkung der Neutrophilen verstärkt und $\text{IFN-}\gamma$ erhöht das Überleben der Neutrophilen [32, 105]. Aktivierend und mobilisierend auf neutrophile Granulozyten wirkt auch das von $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen freigesetzte IL-17 [155]. Die nach Aktivierung von Neutrophilen sekretierten Zytokine und Chemokine (z. B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , MIP-1 α) können Monozyten und DC anlocken und damit zur Initiierung der adaptiven Immunantwort beitragen [143, 192]. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass Neutropenie (Verminderung der Neutrophilenzahl) die Entwicklung einer T-Helferzell-Antwort des Typs $\text{T}_{\text{H}1}$ verhindern kann [168].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die erworbene oder adaptive Immunität besitzt im Gegensatz zur angeborenen Immunität Antigen-spezifische Effektorzellen, B- und T-Zellen (bzw. B- und T-Lymphozyten), und so genannte „Memory-Zellen“, die eine erneute Infektion mit den gleichen Pathogenen verhindern können und dadurch eine lang anhaltende Immunität generieren.

Die Entwicklung der B-Lymphozyten aus primitiven Stammzellen findet im Knochenmark statt. Sie erkennen Antigene über sogenannte Immunglobuline, die sowohl als Membran-gebundene Rezeptoren (B-Zell-Rezeptoren), als auch als sekretierte Antikörper produziert werden können. Die Aktivierung der B-Zellen findet in den lymphoiden Geweben durch die Bindung von Antigenen an den B-Zell-Rezeptor statt. Es kommt zur Signaltransduktion und im Zellinneren werden die Antigene degradiert und in Form von Peptiden auf den Zelloberflächen über MHC Klasse II Moleküle präsentiert. Daher gehören die B-Zellen auch zu den Antigen-präsentierenden Zellen [74]. Die Aktivierung der B-Zellen benötigt zusätzlich Antigen-spezifische T-Helferzellen. Diese erkennen die Komplexe aus Peptiden und MHC Klasse II Molekülen und stimulieren die B-Zellen über die Bindung von CD40 Ligand an CD40 und die Ausschüttung von Zytokinen [117]. In Folge der Aktivierung kommt es zur Proliferation und Differenzierung der klonal expandierten B-Zell-Nachkommen in Antikörper-sekretierende Plasmazellen oder Memory-B-Zellen. Die von den B-Zellen sekretierten Antikörper führen zu einer Opsonierung und Aktivierung des Komplement-Systems, so dass Mikroorganismen humoral vernichtet und die Ausbreitung von intrazellulären Infektionen verhindert werden kann.

Im Gegensatz zu den B-Zellen findet die Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus statt [131]. Wichtige Oberflächenmoleküle auf den T-Lymphozyten, die zur Unterscheidung von Subpopulationen dienen, sind CD4 und CD8. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die der Immunglobulin-Superfamilie angehören. Sie dienen als Co-Rezeptoren des T-Zellrezeptors (TCR) [124]. Die reifen naiven CD4^+ bzw. CD8^+ T-Zellen treten in den Blutstrom ein und zirkulieren dort, bis sie periphere lymphoide Organe erreichen und dort auf ihr spezifisches Antigen treffen [100]. Die Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen

benötigt die Präsentation des spezifischen Antigens in Form eines Komplexes mit MHC Molekülen und bestimmte costimulatorische Signale.

Nach der Aktivierung differenzieren die $CD8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, welche mit ihrem TCR Peptide erkennen, die über MHC Klasse I-Komplexe präsentiert werden, und sie eliminieren die Zielzellen durch zytotoxische Proteine (Granzym und Perforin). Antigene, die über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden, stammen vor allem von Proteinen, die von den Zellen selbst produziert werden. Dazu zählen, nach Infektion der Zellen, auch virale Proteine. So kann jede kernhaltige Zelle, die MHC Klasse I Moleküle exprimiert, von Viren infiziert werden und nach Erkennung durch zytotoxische T-Zellen eliminiert werden [74].

1.1.2.1 T-Helferzellen und Regulatorische T-Zellen

T-Zellen, die charakteristischerweise das Oberflächenmolekül CD4 tragen, werden als Helferzellen bezeichnet, da sie die Funktion von Immunzellen, z. B. B-Zellen, regulieren können [124]. $CD4^+$ T-Helferzellen erkennen über ihren T-Zellrezeptor Antigen-Peptide, die über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden [85]. Die $CD4^+$ T-Zellen können in drei Arten von T-Helferzellen entwickeln, sowie in regulatorische T-Zellen (Treg). T-Helferzellen können weiter unterteilt werden in den Typ 1, 2 oder 17, genannt T_H1 , T_H2 oder T_H17 [136]. Charakterisiert werden die T-Helferzellen anhand der Zytokinsekretion und ihren Funktionen. Allen gemeinsam ist die Sekretion von IL-2 nach der Aktivierung. T_H1 -Zellen produzieren zusätzlich Interferon (IFN)- γ und aktivieren Makrophagen und andere Zellen, welche für die Abwehr von intrazellulären Bakterien benötigt werden. T-Helferzellen des Typs 2 sekretieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 [149]. Dadurch kontrollieren sie die Funktion von Eosinophilen, Basophilen, Neutrophilen und B-Zellen. Erstere sind involviert in den Schutz vor Parasiten, B-Zellen führen über die Generierung von Antikörpern zu einer humoralen Immunität [163]. T_H17 -Zellen produzieren Zytokine der IL-17-Familie die sich in IL-17A-F unterteilt [84], sowie IL-22 [197]. Von den IL-17 Zytokinen produzieren T_H17 -Zellen vor allem IL-17A und IL-17F, die zusammen Heterodimere bilden können. Es wird angenommen, dass die Wirkung beider Zytokine die Effektorfunktion vermittelt [30, 187], welche in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen und in der Produktion von chemotaktisch wirkenden Zytokinen besteht. Ebenso können T_H17 -Zellen durch pro-inflammatorische Eigenschaften an Entzündungsprozessen, oder an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein [17]. Die Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Helferzellen in eine von mehreren Effektor-Zelllinien erfolgt, wenn sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Die Signale, die durch den TCR, costimulatorische Moleküle und Zytokin-Rezeptoren vermittelt werden, führen zur Expression von Zelllinien-spezifischen Transkriptionsfaktoren. Diese bestimmen die Art der Effektorfunktion und sind abhängig von den infizierenden Pathogenen [104, 114] (s. Abbildung 1.2).

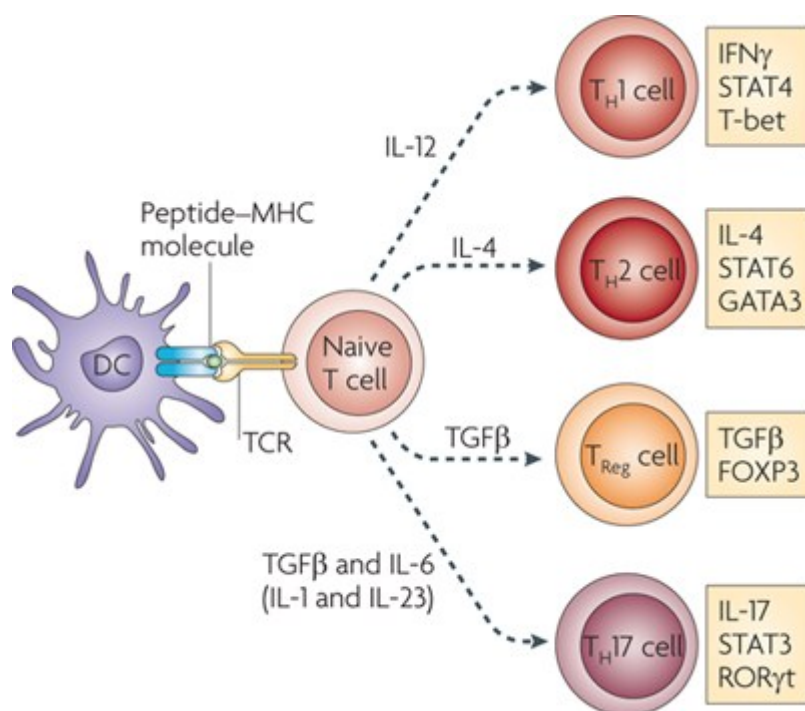


Abbildung 1.2 **Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in Subpopulationen von T-Helferzellen [199]** Nach ihrer Aktivierung durch Stimulation des TCR differenzieren die naiven T-Helferzellen in Abhängigkeit von polarisierenden Faktoren (z. B. IL-12 für TH1, IL-4 für TH2, *transforming growth factor* (TGF)- β für Treg, oder TGF- β + IL-6 für TH17) in verschiedene Effektorzellen. Als Effektorzellen exprimieren die T-Helferzellen spezifische Transkriptionsfaktoren, u. a. *T box expressed in T cells* (T-bet), GATA3, *forkhead box protein* (FOXP) 3, oder *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 3 und Zytokine.

Neben den T-Helferzellen existiert eine weitere Art von CD4⁺ T-Zellen, so genannte regulatorische oder supprimierende T-Zellen (Treg). Diese hemmen autoreaktive T-Zellen, die dem Selektionsprozess im Thymus entgangen sind, und sind daher für die Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen verantwortlich. Außerdem verhindern Treg eine überschießende Immunantwort, indem sie Effektor-T-Zellen supprimieren. Die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ Treg, die ungefähr 10 % der peripheren CD4⁺ T-Zellen ausmachen, entstehen im Thymus und exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3 [57]. Sie üben ihre Effektorfunktion über die Sekretion bestimmter Zytokine, wie IL-10 und TGF- β aus, die zur Apoptose und Zellzyklusarrest bei Zielzellen führen können. Daneben existieren induzierte Treg-Zellen (iTreg), die sich aus naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen außerhalb des Thymus unter dem Einfluss von IL-2 und TGF- β entwickeln [31, 39]. Charakteristisch ist die Produktion von IL-10 und TGF- β , sowie von geringeren Mengen an IFN- γ , IL-5 und IL-2. Sie können die Antigen-spezifische Proliferation von CD4⁺ T-Helferzellen supprimieren [36], vermutlich durch die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β und sie spielen eine Rolle bei allergischen Erkrankungen [139, 188].

1.2 Dendritische Zellen

DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die nach der Antigenaufnahme den Zellen des adaptiven Immunsystems mittels Antigenpräsentation Informationen über die Art der Pathogene vermitteln können. Durch ihre äußerst effiziente Antigenpräsentation kommt den DC eine einzigartige Fähigkeit zur Induktion von primären Immunantworten zu und es wird eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem hergestellt [9].

1.2.1 Herkunft und Verbreitung

Erstmalig beschrieben wurden DC im Jahre 1973 durch RALPH M. STEINMAN und ZANVIL A. COHN. Sie identifizierten und charakterisierten DC in den peripheren lymphoiden Organen von Mäusen, unter anderem der Milz, als große Zellen mit stellaren oder dendritischen Ausläufern, die den Zellen einen variablen Umriss geben [161, 162]. Heute werden DC als Gruppe von Leukozyten angesehen, die phänotypisch und funktional heterogen sind und sich durch die Expression der Oberflächenmarker, Migrationsmuster und Zytokinsekretion unterscheiden [189]. Gebildet werden die Vorläufer von DC kontinuierlich aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC, *hematopoietic stem cells*) im Knochenmark. Aus HSC entstehen über einen lymphoiden Pfad multipotente lymphoide Vorläufer (*common lymphoid progenitor*, LP), oder über einen myeloiden Pfad multipotente myeloide Vorläufer (*common myeloid progenitors*, MP). Aus den MP entwickeln sich allgemeine DC-Vorläufer (*common DC precursor*, CDP). Hieraus entstehen Vorläufer der klassischen/konventionellen DC (pre-cDC) und plasmazytoide DC (pDC). Die pre-cDC verlassen das Knochenmark und wandern über das Blut in lymphoide Gewebe, wo sie zu $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ cDC differenzieren. In nicht lymphoiden Geweben können sich die pre-cDC auch zu lamina propria DC entwickeln. Sogenannte TipDC (*TNF and iNOS-producing DC*) sezernieren TNF und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) und differenzieren aus $Ly6C^+$ Monozyten, die ebenfalls dem myeloiden Entwicklungspfad entstammen, unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen. In welchem Umfang die lymphoiden Progenitoren (LP) zur Entwicklung der PDC und cDC beitragen, ist bisher nicht geklärt [61] (s. Abbildung 1.3). Generiert werden können DC *in vitro* auch aus murinem Knochenmark in Anwesenheit von *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) [144].

DC kommen in geringer Anzahl im Körper ubiquitär in nicht-lymphoiden (z. B. Langerhans Zellen in der Epidermis) und lymphoiden (z. B. Thymus oder Milz) Geweben vor. Allgemeine Marker für die Einteilung in Subpopulationen von cDC (im Weiteren nur als DC bezeichnet) sind CD4 und CD8 α . Neben den $CD4^+CD8\alpha^-$ und $CD4^-CD8\alpha^+$ existieren auch $CD4^-CD8\alpha^-$ in den lymphoiden Organen. Im murinen System werden DC weiterhin anhand der Marker

CD11b und CD205 unterschieden [178]. Auf den reifen DC aller Untergruppen werden die Oberflächenmoleküle CD11c und MHC Klasse II in hohem Maße exprimiert [189].

Plasmazytoide DC unterscheiden sich von den cDC, da sie effiziente Produzenten von Typ 1 Interferonen [154] darstellen und einen charakteristischen Phänotyp ($CD11c^{lo}CD11b^{-}CD45RA^{hi}$) aufweisen [118].

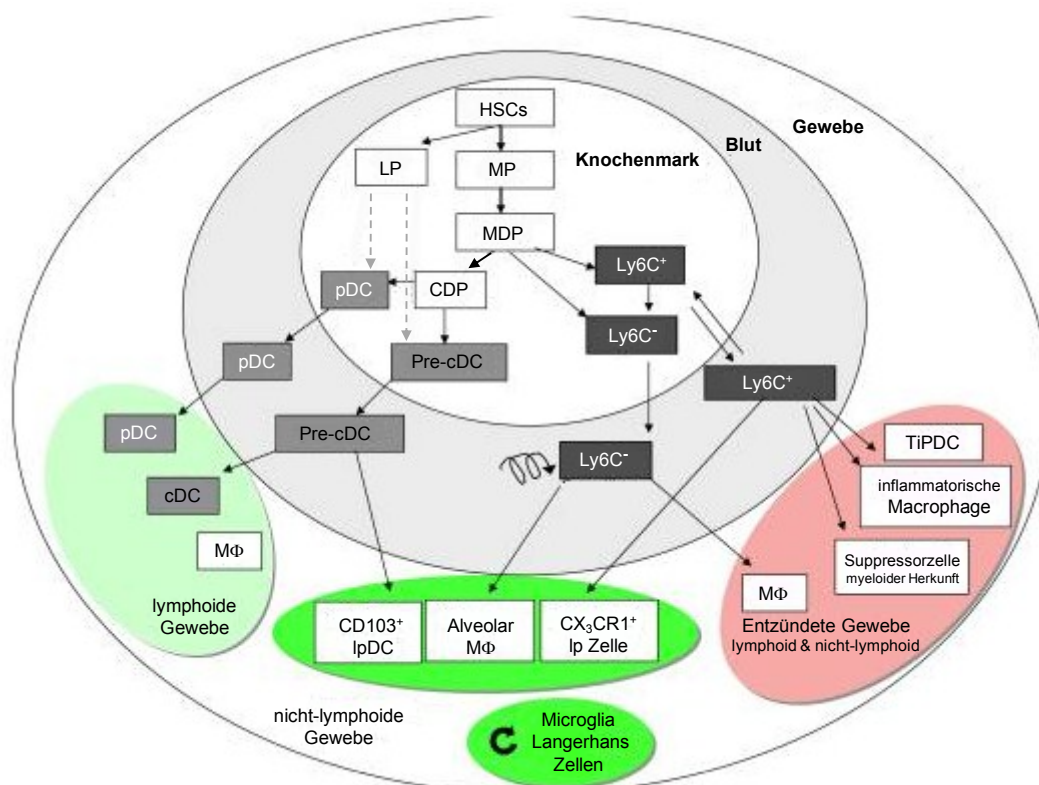


Abbildung 1.3 **Differenzierung von Dendritischen Zellen in der Maus (adaptiert nach [61])** Aus hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) im Knochenmark entstehen lymphoide und myeloide Progenitoren (LP und MP). Aus den MP entwickeln sich Monozyten/Makrophagen und DC Vorläufer (*monocyte/macrophages and DC precursors*, MDP), woraus wiederum allgemeine DC Vorläufer (*common DC precursor*, CDP) entstehen. CDP bringen dann klassische Pre-DC (Pre-cDC) und plasmazytoide DC (pDC) hervor. pDC und Pre-cDC verlassen das Knochenmark, zirkulieren ins Blut und erreichen lymphoide Gewebe. Aus Pre-cDC entwickeln sich dort klassische CD8 α^{-} - und CD8 α^{+} DC und in nicht-lymphoiden Geweben auch lamina propria DC (IpDC). Während Entzündungen können sich aus Ly6C $^{+}$ Monozyten, die ebenfalls von MDP abstammen, auch TNF und iNOS-produzierende DC (*TNF and iNOS-producing dendritic cells*, TipDC) entstehen. Die Art, in der die LP zur Entwicklung von pDC und konventionellen DC (cDC) beitragen, ist noch unklar.

1.2.2 Aktivierung, Reifung und Migration

In ihrer Eigenschaft als Phagozyten nehmen DC in der Peripherie Antigene auf, migrieren zu den nächst gelegenen lymphoiden Organen und präsentieren die Antigene an die für diese spezifischen T-Zellen. Während der Migration untergehen die DC einen Wechsel von Antigen-aufnehmenden Zellen zu Antigen-präsentierenden Zellen [10].

Nach dem Kontakt einer DC mit einem Pathogen, wird dieses durch Phagozytose aufgenommen, die Protein-Bestandteile werden in Antigen-Peptide prozessiert und an den

Oberflächen der DC über MHC Klasse II Moleküle präsentiert. Erkannt werden die Pathogene über PRR. Diese umfassen vor allem die TLRs. Für DC konnte gezeigt werden, dass die für Pathogene üblichen Strukturen LPS, bakterielle DNA und doppelsträngige *ribonucleic acid* (RNA) die Reifung induzieren. Weiterhin kann die Reifung von DC durch pro- und anti-inflammatorische Signale, wie die Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 oder TGF- β [141], sowie Prostaglandine [78] und durch die Ligation von CD40 nach Kontakt mit CD40 Ligand-exprimierenden T-Zellen [26] induziert werden. Während der Reifung regulieren die DC Rezeptoren, die für die Phagozytose und die Antigen-Aufnahme benötigt werden, herunter. Sie exprimieren dafür verstärkt costimulatorische Moleküle, wie CD40 und CD86, Adhäsionsmoleküle (*intercellular adhesion molecule*, ICAM-1) [10], sowie CD83 [196], und akkumulieren eine große Anzahl von langlebigen MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche [28]. Die Antigenpräsentation wird so um mehr als das 100-fache erhöht [47]. Ein wichtiges von reifen DC sezerniertes Zytokin ist IL-12, welches von DC nach gleichzeitigem Kontakt mit CD40L exprimierenden T-Zellen und mikrobiellen Stimuli (u. a. Bakterien, bakterielle Produkte und intrazelluläre Parasiten) produziert wird [27]. Bestimmte DNA-Sequenzen (z. B. CpG-Oligonukleotide) induzieren auch ohne zusätzliche Bindung von CD40L die Ausschüttung von IL-12 durch DC [158]. Bei IL-12 handelt es sich um ein heterodimeres Zytokin, das aus zwei kovalent verknüpften Untereinheiten (p35 und p40) besteht [146]. Während die p35 mRNA von verschiedenen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression von p40 mRNA mit der Produktion von bioaktivem IL-12p70 (bestehend aus den Untereinheiten p35 und p40) durch Antigen-präsentierende Zellen verbunden. *In vivo* induziert es bei NK-Zellen und T-Zellen die Ausschüttung von IFN- γ , das zu einer Aktivierung von Phagozyten führt [173].

Neben IL-12 sezernieren reife DC auch IL-10 [77], sowie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-15 und IL-18 [10]. *In vitro* in der Anwesenheit von IL-10 gereifte DC besitzen eine verminderte Kapazität, eine TH1-Antwort zu induzieren. Dies geht zurück auf eine beeinträchtigte IL-12-Synthese der DC, die eine verringerte IFN- γ Produktion durch die T-Zellen bedingt. Dies deutet darauf hin, dass IL-10 durch die Unterdrückung der IL-12-Synthese die CD4⁺ TH-Antwort in Richtung TH2 verschiebt [40]. Eine Beeinflussung der Polarisierung der TH-Antwort in Richtung TH2 kann durch DC auch vermittelt werden, wenn sie mit dem anti-inflammatorischen Zytokin TGF- β [167], Steroiden [132] oder Prostaglandin-E₂ [105] behandelt werden.

Unter „*steady-state*“-Bedingungen migrieren DC durch die afferenten Lymphbahnen und transportieren Antigene von verschiedensten Geweben/Organen zu den Lymphknoten [145]. Die Präsentation von Selbst-Antigenen an T-Zellen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen kann zu einer Toleranz der T-Zellen gegenüber Selbst-Antigenen führen. Dadurch werden Autoimmun-Reaktionen, induziert durch autoreaktive T-Zellen, minimiert [9].

Die DC, die sich in den nicht-lymphoiden Geweben bzw. Organen befinden, gelangen vermutlich aus dem Knochenmark über den Blutstrom dorthin. Im Gegensatz zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen sind DC dafür spezialisiert, die T-Zell-Zonen innerhalb der lymphoiden Organe zu erreichen und weisen im Gegensatz zu Makrophagen eine hohe Migrations-Kapazität auf [73]. Die Migration wird zum einen durch Mediatoren, die schon die Reifung der DC beeinflussen (bakterielle LPS, Zytokine, wie z. B. TNF- α oder IL-1), oder Chemokine gesteuert [37]. Unreife DC sind sensitiv für das Chemokin MIP-3 α (*macrophage inflammatory protein-3alpha*), sowie MIP-1 α und RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) [44] und exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 und CXCR4. Nach Stimulation zeichnet sich der Phänotyp der aktivierten DC durch die verstärkte Expression von CCR7 aus [135]. Bei CCR7 handelt es sich um einen Rezeptor für MIP-3 β und CCL21 (auch als SLC, *Secondary lymphoid-tissue chemokine* bezeichnet). Beide Chemokine koordinieren, da sie sowohl reife DC als auch naive T-Lymphozyten anlocken, die Begegnung von DC und T-Zellen in den lymphoiden Organen [140, 186].

1.2.3 Aktivierung von T-Zellen

Die Aktivierung von naiven T-Zellen benötigt komplexe Interaktionen von Rezeptoren und Liganden, die bei den T-Zellen zu Signalkaskaden führen. Um T-Zellen zu aktivieren, erfolgt zuerst die Bindung des TCR an das spezifische Antigen in Form eines MHC-Peptid-Komplexes auf der Oberfläche der DC. Hierdurch wird die Spezifität der Immunantwort vermittelt. Als zweites interagieren verschiedene costimulatorische Moleküle auf den DC mit den entsprechenden Liganden auf den T-Zellen [74]. Ein wichtiges costimulatorisches Signal entsteht aus der Bindung der Moleküle B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf den DC an das Oberflächenmolekül CD28 auf den T-Zellen. Eine weitere positive Stimulation wird durch das Molekül ICOS (*inducible costimulator*), welches an einen B7-ähnlichen Liganden bindet. Während die Stimulation durch CD28 auf den T-Zellen die IL-2-Produktion stimuliert, induziert die Bindung eines Liganden an ICOS kein IL-2, sondern die Freisetzung von IL-10 [175].

Die Stimulation der Moleküle *cytotoxic T-lymphocyte antigen* (CTLA)-4 (auch als CD152 bezeichnet) und *programmed death* (PD)-1, die sich auf den Oberflächen von T-Zellen befinden, und mit B7-1, B7-2, oder *programmed death-1 ligand* (PD-1L) auf den DC interagieren, führt zu einer Abschwächung der T-Zell-Antwort [24]. Die Bindung von CD40L an CD40 auf den DC aktiviert die DC, so dass diese vermehrt CD80 und CD86, sowie Zytokine (IL-12, TNF- α) und Chemokine produzieren [26]. Das zweite Signal, dessen Expression unabhängig vom präsentierten Antigen und während der Reifung der DC hoch reguliert wird, induziert die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. In Abwesenheit des

costimulatorischen Signals werden die T-Zellen anergisch oder untergehen Apoptose. Somit wird eine Pathogen-spezifische T-Zell-Aktivierung sichergestellt, und es werden keine Immunantworten gegen körpereigene Antigene induziert.

Die Polarisierung von $CD4^+$ T-Helferzellen in Richtung T_H1 , T_H2 oder T_H17 ist abhängig von Zytokinen, die die DC sezernieren. Neben IL-12, das die T-Helferzellen in Richtung $IFN-\gamma$ -produzierende T_H1 -Zellen polarisiert [149], gibt es auch IL-12-unabhängige Faktoren, die die T_H1 -Polarisierung induzieren. Hierzu zählt CD70, welches auf murinen DC exprimiert wird [157] und *Delta*, ein Ligand von *Notch* [3]. Die Mediatoren, die die Differenzierung von T_H2 -Zellen beeinflussen, werden noch kontrovers diskutiert. Möglich ist die Induktion einer T_H2 -Antwort durch das Fehlen von IL-12. So konnte für IL-10 gezeigt werden, dass es die Expression von Zytokinen der T_H2 -Zellen durch die Unterdrückung der IL-12-Synthese induziert [40]. IL-4, welches jedoch nicht von DC sezerniert wird, kann direkt zur T_H2 -Differenzierung führen [110]. Auch die Expression von *Jagged*, ebenfalls ein *Notch*-Ligand, und OX40L, ein Mitglied der TNF-Familie, auf den DC führen zu einer Polarisierung von $CD4^+$ T-Helferzellen in Richtung T_H2 [3, 56]. T_H17 -Zellen entwickeln sich aus $CD4^+$ T-Helferzellen unter dem Einfluss von IL-23, TGF- β und IL-6 [181] (s. Abbildung 1.2 und 1.4).

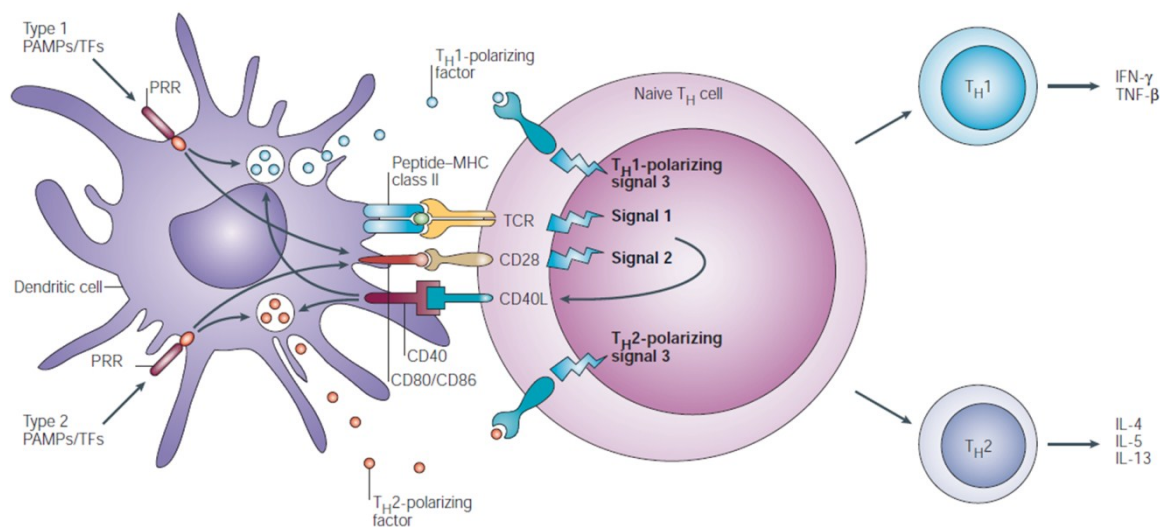


Abbildung 1.4 **Polarisierung von T-Helferzellen durch DC (adaptiert nach [81])**. Peptide, die von Pathogenen stammen, aktivieren über die Präsentation auf MHC Klasse II Molekülen den TCR und vermitteln der T-Helferzelle ein erstes Antigen-spezifisches Signal. Das zweite Signal ist ein costimulatorisches Signal, welches über die Bindung von CD80 oder CD86 auf den DC an das Oberflächenmolekül CD28 der T-Helferzelle gesteuert wird. Das dritte Signal, das meist durch ein lösliches Zytokin durch die DC produziert wird, führt schließlich zur Differenzierung der T-Helferzelle in T_H1 oder T_H2 . Welcher Art das dritte Signal ist, hängt dabei von der Aktivierung spezifischer PRR durch unterschiedliche Pathogene ab. Nach der T-Zell-Aktivierung durch Signal 1 und 2 kommt es durch die Expression von CD40L auf den T-Zellen zu einer positiven „Feedback-Stimulation“ der DC.

Auch naive $CD8^+$ T-Zellen werden durch DC aktiviert. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung dabei direkt stattfinden kann [194] oder unter Beteiligung von $CD4^+$ T-Helferzellen. In einem aktuellen Modell wird davon ausgegangen, dass die DC die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen

unter Beteiligung von $CD4^+$ T-Helferzellen über die verstärkte Expression von CD40-Ligand auf den DC aktivieren [15].

1.2.4 Interaktion mit NK-Zellen

Da NK-Zellen *in vitro* eine geringe Zytotoxizität und regulatorische Aktivität zeigen, wenn sie mit Zielzellen inkubiert werden, wurde davon ausgegangen, dass zusätzliche Signale für ihre Aktivierung benötigt werden [21]. NK-Zellen interagieren mit DC und beeinflussen so adaptive Immunantworten [62]. Dabei resultiert die Interaktion der DC mit den NK-Zellen in einer gegenseitigen Aktivierung.

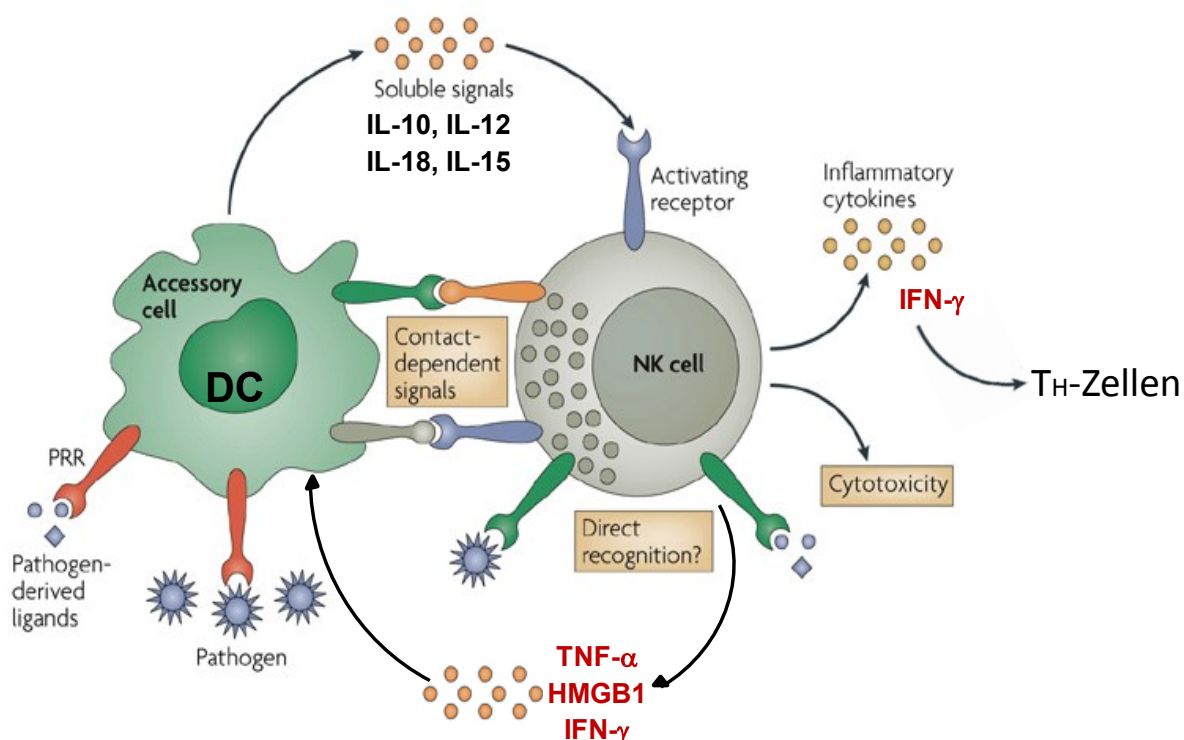


Abbildung 1.5 **Bidirektionaler „Cross-Talk“ zwischen NK-Zellen und DC (verändert nach [115])**. NK-Zellen benötigen Signale von akzessorischen Zellen, z. B. DC, um auf Pathogene reagieren zu können. Die Aktivierung der akzessorischen Zellen wiederum erfolgt durch die Ligandierung von Pathogenen oder deren Bestandteilen an PRR. Die daraus resultierenden Signale, die kontakt-abhängig oder in löslicher Form vermittelt werden, induzieren die Aktivierung der NK-Zellen. Die NK-Zellen können durch Sekretion von löslichen Mediatoren auch die akzessorischen Zellen beeinflussen, oder mit T-Helferzellen interagieren.

Unreife DC interagieren mit NK-Zellen schon in der frühen Phase einer Immunantwort, vor der Generierung spezifischer T-Zellen [23]. Hier führt die Interaktion zu einer Aktivierung der NK-Zellen und dadurch induzierten Reifung oder Lyse der DC. Das Schicksal der unreifen DC kann dabei von der jeweiligen Dichte der Zellen abhängen. Während ein geringes Verhältnis (1:5) zu einer Reifung und Zytokinproduktion (IL-12 und $TNF-\alpha$) der DC führt, werden in einem höheren Verhältnis von NK-Zellen zu DC (5:1) die DC lysiert [130]. Durch Versuche mit humanen NK-Zellen ist bekannt, dass diese unter einer Voraktivierung mit

Zytokinen in der Lage sind, DC zu aktivieren, sowie die Reifung und die Zytokin-Produktion von DC zu beeinflussen. Mit LPS vorbehandelte DC, die aus humanem peripherem Blut gewonnen werden, induzieren bei kokultivierten NK-Zellen eine starke zytotoxische Aktivität. NK-Zellen, die über eine Vorbehandlung mit IL-2 aktiviert werden, induzieren eine verstärkte Reifung von DC und erhöhen die Fähigkeit dieser, IL-12 zu produzieren und CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren [62]. Weiterhin sind humane NK-Zellen dazu imstande, Typ 1 polarisierende DC zu induzieren, die für die Immunantwort in Richtung der T_H1-Antwort verantwortlich sind. Diese DC zeigen unter dem Einfluss von NK-Zellen eine erhöhte IL-12p70-Produktion, sowie eine positive Beeinflussung der CD4⁺ T-Helferzellen zur erhöhten IFN- γ -Sekretion [101].

Neben IL-12 erhöht auch das von DC produzierte Zytokin IL-18 die Zytotoxizität der NK-Zellen [65]. Die Interaktion der NK-Zellen mit den DC resultiert in einer Ausschüttung von IL-18 durch die DC. Dies aktiviert die NK-Zellen und sie sezernieren *high mobility group B1* (HMGB1), ein Protein mit Zytokin-artiger Aktivität, welches die DC reifen lässt und vor der Lyse durch NK-Zellen schützt [150]. Auch das Zytokin IL-15, dessen Expression auf die reifenden DC beschränkt zu sein scheint, kann zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen. Hierfür wurde gezeigt, dass die *in vivo* Aktivierung der NK-Zell-Antworten auf virale und bakterielle Pathogene die Anwesenheit von DC benötigt. Eine Stimulierung der DC über TLR führt zur Rekrutierung von NK-Zellen in die Lymphknoten, wo die NK-Zellen über die Präsentation von IL-15 aktiviert werden [96]. Es wurde auch beschrieben, dass während der Interaktion von NK-Zellen mit DC von den NK-Zellen die Zytokine TNF- α und IFN- γ produziert werden, welche wiederum die Reifung der DC fördern [176]. Neben Zytokinen sind auch Zellkontakt-abhängige Mechanismen an der Interaktion von DC und NK-Zellen beteiligt. Humane NK-Zellen können nach der Aktivierung ihres NKp30 zytotoxischen Rezeptors unreife DC über Lyse eliminieren [53]. Einen Überblick über die Interaktion von DC mit NK-Zellen und die daran beteiligten Zytokine gibt Abbildung 1.5.

1.3 Sepsis

Im Jahre 1991 wurde der Begriff der Sepsis durch eine Konsensuskonferenz des AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS (ACCP) und der SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE festgelegt. Hierbei wurde das Konzept des „*Systemic Inflammatory Response Syndrome*“ (SIRS) entwickelt und Kriterien zur Diagnostik wurden definiert. Unter „SIRS“ versteht man eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers, die durch verschiedene infektiöse oder nicht-infektiöse Bedingungen (z. B. Traumata, Verbrennungen, sterile Pankreatitis) ausgelöst werden kann. Der Begriff „Sepsis“ wurde definiert als systemische Entzündungsreaktion, die in Kombination mit einer Infektion auftritt. Eine Infektion ist dabei ein Prozess, der durch die Einwanderung von pathogenen Mikroorganismen in normalerweise sterile Gewebe verursacht wird [89]. Trotz aller medizinischen Fortschritte stellt, nach einer 2007

veröffentlichten Studie, eine Sepsis in Deutschland immer noch die dritthäufigste Todesursache dar. Demnach waren, während des beobachteten Zeitraums im Jahre 2003, mehr als 150.000 Menschen von einer Sepsis betroffen und deutschlandweit verstarben jeden Tag durchschnittlich 162 Menschen an einer Sepsis [50].

1.3.1 Pathogenese der polymikrobiellen Sepsis

Eine polymikrobielle, durch verschiedene pathogene Bakterien ausgelöste, Sepsis kann nach schweren Unfall-Traumata, Operationen, oder generellen Verletzungen auftreten, wenn die Pathogene die physischen und immunologischen Barrieren des Körpers überwinden und in normalerweise sterile Gewebe eindringen. Dies geschieht oft in Verbindung mit einem geschwächten Immunsystem, z. B. in Folge von Tumor-, Virus-Erkrankungen, oder Organ-Transplantationen. Zur Erkennung der systemischen Entzündungsreaktion dienen bestimmte körperliche Symptome, wie die Körpertemperatur (Hypo- oder Hyperthermie), veränderte Herz- und Atem-Frequenz und die Leukozytenzahl im Blut [88].

Die initiale Phase einer Sepsis ist charakterisiert durch eine starke inflammatorische Antwort des Immunsystems (SIRS). Die Erkennung der Pathogene durch die verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems (z. B. Makrophagen, Monozyten) führt zu einer verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und anderer Effektormoleküle, mit der der Körper das Ausmaß und den Schaden durch die eindringenden Pathogene zu begrenzen versucht. Die proinflammatorischen Zytokine, die während der SIRS-Phase als Antwort auf die Infektion gebildet werden, sind unter anderem TNF- α , IL-1 β und IL-6 [25]. HMGB1 ist ein intrazelluläres Protein, das von geschädigten Zellen freigesetzt wird und dessen Serum-Level ebenfalls während der initialen Phase einer Sepsis systemisch erhöht ist [170]. Durch diese pro-inflammatorischen Mediatoren und ebenfalls freigesetzten Chemokine werden Neutrophile, T-Zellen, B-Zellen, Blutplättchen und Gerinnungsfaktoren zum Ort der Infektion rekrutiert [18, 174]. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade bedingt die Bildung von Blutgerinnseln in der Mikrozirkulation von Organen und die gleichzeitige Inhibierung der Fibrinolyse (körpereigene Auflösung eines Blutgerinnsels) können so zum Organversagen beitragen [11]. Bezeichnet wird dieser Vorgang als *disseminated intravascular coagulation* (disseminierte intravasale Gerinnung, DIC). Dadurch wird die Permeabilität der Blutgefäße für Leukozyten, aber auch Pathogene erhöht [108]. Insbesondere TNF- α trägt dazu bei, dass die kleinsten Blutgefäße (Kapillaren, Arteriolen, Venolen) zerstört werden [67]. Pathogene und deren Bestandteile können weiterhin das Komplement-System aktivieren. Dies führt zur Generierung von Abbauprodukten (Anaphylatoxine) des Komplement-Systems (u. a. die aktivierten Komponenten C3a, C4a und C5a), die schädliche Wirkungen haben können [137] (s. Abbildung 1.6).

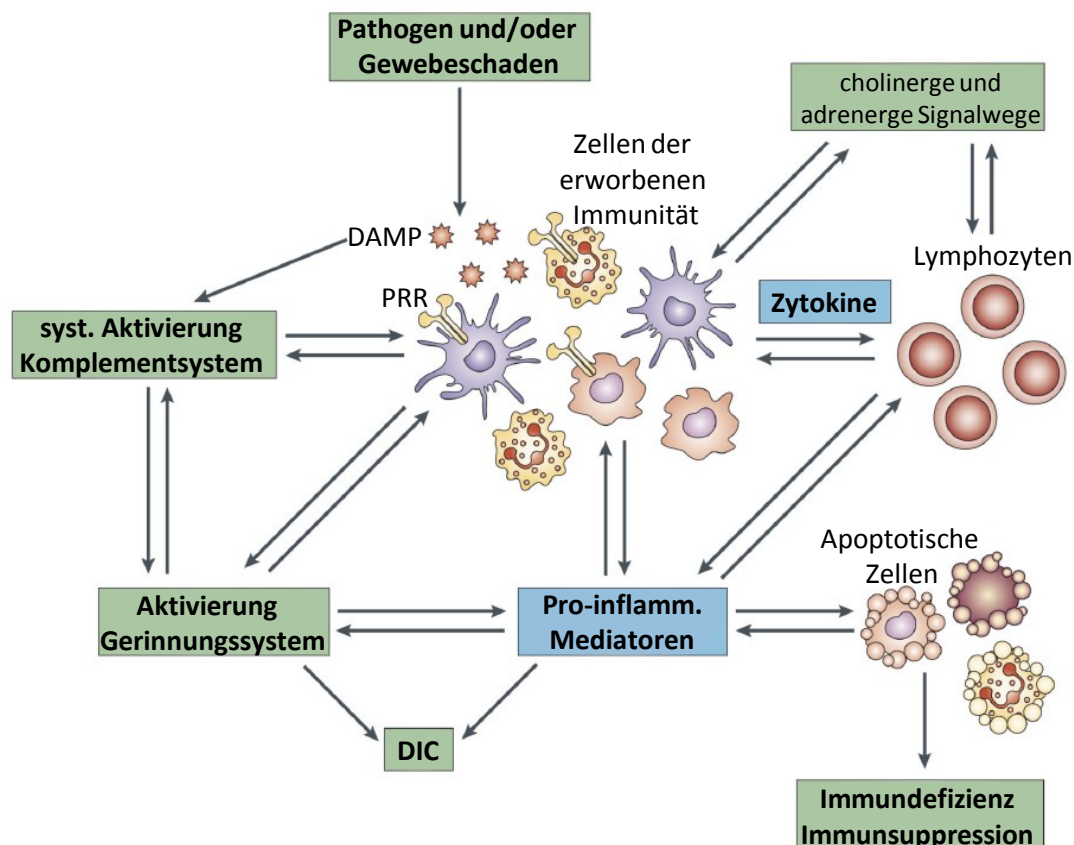


Abbildung 1.6 **Das inflammatorische Sepsis-Netzwerk (modifiziert nach [137])**. Während einer Sepsis kommt es zum Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen biologischen Systemen des inflammatorischen Netzwerks. Die von Pathogenen oder nach Gewebeschaden freigesetzten DAMPs bedingen die übermäßige Stimulation von PRRs auf Immunzellen. Diese sezernieren daraufhin große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen, freien Radikalen und Enzymen, die zur Gewebeschädigung führen können. Systemische Aktivierung des Komplementsystems durch Pathogene und deren Bestandteile im Blut führt zur Bildung von Anaphylatoxinen. Die gleichzeitige Aktivierung des Gerinnungssystems resultiert in der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) und einer erweiterten inflammatorischen Immunantwort. Das Komplement- und Gerinnungssystem stehen in engem Zusammenhang und ein Ungleichgewicht in einer Kaskade führt zu einer positiven Verstärkung des jeweils anderen Systems. Die anhaltende pro-inflammatorische Immunantwort beeinflusst auch die Effektorzellen (Lymphozyten, wie z. B. Neutrophile) und führt über die später auftretende Apoptose von Leukozyten zur Immunsuppression.

Das während der Sepsis auftretende SIRS wird begleitet von einer Expression anti-inflammatorischer Zytokine, die eine übertriebene Entzündungsreaktion verhindern, genannt „*Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome*“ (CARS). Das Gleichgewicht dieser beiden gegenläufigen Syndrome ist für das Überleben einer Sepsis entscheidend, da das Überwiegen des SIRS zu einem septischen Schock und ein verstärktes CARS zu einer Suppression der Immunantwort führt, so dass der Körper nicht in der Lage ist, die primäre Infektion zu eliminieren. Anti-inflammatorische Zytokine, die im Rahmen des CARS den Körper vor unkontrollierten Entzündungsreaktionen schützen sollen, sind IL-1, IL-4, IL-10 oder TGF- β [19].

Kommt es im Verlauf der Sepsis zu einer Sepsis-induzierten Organ-Dysfunktion, liegt laut Definition eine schwere Sepsis vor (*severe Sepsis*) und ein septischer Schock folgt, wenn die Sepsis mit arterieller Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution und Zeichen von Organ-Dysfunktion einhergeht. Je schwerer der Grad der Sepsis, desto höher ist demnach auch die Sterblichkeit. Das Endstadium der Sepsis ist ein Multiorganversagen [88].

Um die komplexen Auswirkungen einer Sepsis untersuchen zu können, wurde das Modell der zökalen Ligation und Punktion (*Cecal Ligation and Puncture, CLP*) in Mäusen entwickelt, bei dem die Versuchstiere durch das Abbinden und die Punktion des Blinddarms Symptome einer Sepsis entwickeln, die denen septischer Patienten mit Peritonitis gleichen [12]. Hierbei besteht ein Zusammenhang zwischen der Quantität (Menge) und der Qualität (Komplexität) des initialen Pathogens und der Dauer und des Ausmaß der Sepsis. Eine stärkere Sepsis resultiert in einem Anstieg der Zytokin- und Leukozyten-Antwort und eine größere Komplexität führt zu einer verlängerten Antwort. So wurde im CLP-Modell bei Mäusen gezeigt, dass bei einer geringeren Menge an einwandernden Pathogenen die Sterberate und die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 abnahmen, während die IL-10-Konzentration zunahm [179]. Die Verabreichung von IL-10 vor der CLP-Operation erhöhte das Überleben und die Gabe von anti-IL-10 steigerte die Sterblichkeit. Für IL-12, den Gegenspieler von IL-10, wurde festgestellt, dass die Applikation von IL-12 vor CLP-Operation die Sterblichkeit erhöhte [48]. So wird davon ausgegangen, dass eine schwere Sepsis mit einer ungehinderten Entzündungsantwort verbunden ist und eine weniger schwere Sepsis zeigt eine Expression von anti-inflammatorischen Molekülen. Damit scheint während einer Sepsis die Balance zwischen den pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen mit der Schwere und dem Überleben der Sepsis verbunden zu sein [179]. Durch Studien an Tieren und Patienten konnte nachgewiesen werden, dass eine Sepsis auch bestimmte Zellpopulationen beeinflusst. So kommt es durch Sepsis-induzierte Apoptose zu einem schweren Verlust von CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen, nicht aber von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in der Milz von septischen Patienten [68]. Im CLP-Modell bei Mäusen führt die Apoptose von T-Lymphozyten im Thymus zu einem Rückgang von bestimmten Populationen der T-Zellen [6]. Die T-Zellen in den Milzen von septischen Mäusen zeigen nach Stimulation eine verminderte IL-2- und IFN- γ -Produktion, während die T_H2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-10 verstärkt freigesetzt wurden [5]. In einem CLP-Modell mit IFN- γ -defizienten-Mäusen ist die Mortalität der IFN- γ -defizienten-Mäuse nach einer Sepsis stark erhöht im Vergleich zu septischen Wildtyp-Mäusen [102]. Deshalb besteht die Annahme, dass während einer Sepsis die T_H1-Polarisierung der T-Helferzellen fehlt und dies zu einer eingeschränkten Immunabwehr bis hin zur Immunsuppression führt.

1.3.1.1 Immunsuppression nach Sepsis

Dass eine schwere Sepsis nicht nur eine akute Krankheit darstellt, deren Folgen unmittelbar zum Tode führen können, belegen klinische Daten über eine 26 % Sterbewahrscheinlichkeit innerhalb eines Jahres nach Überleben einer Sepsis [134]. Es wurde festgestellt, dass die Überlebenden einer Sepsis eine erhöhte Anfälligkeit besitzen, innerhalb von 8 Jahren nach der überlebten Sepsis an nicht-septischen Ursachen zu sterben [128]. Deshalb werden die Konsequenzen einer Sepsis als chronisch beschrieben und man geht davon aus, dass die initiale Sepsis eine Kaskade von dysregulierten Immunantworten mit weit reichenden Auswirkungen darstellt, denen eine entscheidende Bedeutung bei der Sterblichkeit nach Sepsis zukommt [70].

Die bereits beschriebenen Auswirkungen einer Sepsis auf die Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, auf die Verschiebung der T_H-Antwort von T_H1 nach T_H2 und auf die Apoptose von Effektorzellen des Immunsystems tragen zu einer Suppression des Immunsystems bei. Als Folge der Immunsuppression besitzen Patienten mit einer Sepsis ein signifikant erhöhtes Risiko sekundäre Infektionen zu entwickeln. Dies konnte auch im Tiermodell belegt werden. Hier zeigten Mäuse, die einer CLP-Operation unterzogen worden waren, eine erhöhte Sterblichkeit, wenn sie 1 Tag oder 4 Tage nach der Sepsis-Induktion zusätzlich mit *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) infiziert wurden. Die erhöhte Sterblichkeit wurde begleitet von einer verminderten Fähigkeit zur Bekämpfung der Bakterien und einem veränderten Zytokinmilieu in der Lunge. Vor allem die erhöhte Produktion von IL-10 in der Lunge der septischen Versuchstiere scheint zur Immunsuppression beizutragen [111, 160]. Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um ein gram-negatives Bakterium, das häufig Ursache nosokomialer Pneumonien (Lungenentzündungen) ist [54]. Auch die Lungeninfektion von septischen Mäusen mit dem opportunistischen Pilz *Aspergillus fumigatus* 3 Tage nach der Sepsis-Induktion resultierte in einer erhöhten Sterblichkeit der septischen Mäuse im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, die keine Anfälligkeit für die Pilz-Infektion zeigte [12]. In diesem Versuchsansatz konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Immunsuppression in Zusammenhang mit einer Dysfunktion von DC steht, welche ein verändertes Zytokinprofil aufwies. Durch die intrapulmonale Applikation von gesunden DC konnte die Anfälligkeit der post-septischen Tiere für die *Aspergillus*-Infektion verhindert werden [14]. Deshalb wird davon ausgegangen, dass DC eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Immunsuppression nach Sepsis spielen.

1.3.2 Rolle von Dendritischen Zellen während der polymikrobiellen Sepsis

DC sind ein essentieller Teil des Immunsystems, da sie in der Lage sind, Effektor-T-Zellen durch die Präsentation von Antigenen zu aktivieren und deren Antworten auf einwandernde Pathogene zu modulieren. Dass allgemein die Anwesenheit von DC für das Überleben einer

schweren Sepsis benötigt wird, konnte durch die Depletion von CD11c⁺ Zellen im CLP-Modell gezeigt werden. Hier war die Sterberate der CD11c⁺-depletierten Mäuse deutlich erhöht [148]. Eine Sepsis führt, sowohl im humanen als auch im murinen System, in verschiedenen lymphoiden Organen zu einem deutlichen Verlust von DC. Für septische Patienten wurde beschrieben, dass die Zahl der DC in der Milz drastisch abnimmt [69]. Im CLP-Modell an Mäusen konnte ein Rückgang der Population an DC in der Milz festgestellt werden. Durch unsere Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass es in der Milz vor allem zu einem Verlust der CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ Subpopulationen der DC während der Sepsis kam [55]. Weiterhin konnte bei Mäusen eine Abnahme an DC in den lokalen (mesenterialen) und distalen (poplitealen und inguinalen) Lymphknoten in Zusammenhang mit Apoptose gefunden werden [49]. In den Lungen von septischen Mäusen wurden ebenfalls reduzierte Zahlen von DC beobachtet [14]. Wird das Überleben von DC jedoch wieder hergestellt, kann die Immunsuppression abgeschwächt werden. Dies wurde in einem Mausmodell einer LPS-induzierten Sepsis gezeigt, bei dem die DC die humane Form des anti-apoptischen Proteins *B cell lymphoma-2* (Bcl-2) exprimieren. Diese DC sind resistenter gegenüber der LPS-induzierten Apoptose und die Mäuse zeigen eine verminderte Sterblichkeit [60].

Noch vor Beginn der Depletion in den lymphoiden Organen entwickeln DC eine Dysfunktion in Bezug auf ihre Reaktivität auf bakterielle Stimuli. Milz-DC aus septischen Tieren sezernieren weniger IL-12, aber mehr IL-10 als DC aus gesunden Kontrolltieren nach Stimulierung mit bakteriellen Komponenten [55, 182]. Außerdem zeigen DC aus den Milzen der septischen Tiere eine verminderte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung [46, 55]. Diese Dysfunktion der DC persistiert und wurde noch mehrere Wochen nach Abklingen der Sepsis beobachtet. Im Modell einer sekundären Infektion mit *Aspergillus* wurde bei den DC aus den Lungen der septischen Mäuse nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden (z. B. LPS) eine verminderte Sekretion von IL-12 und TNF- α in Kombination mit einer erhöhten Produktion von IL-10 festgestellt [14]. Diese veränderten Zytokin-Sekretionsmuster lassen vermuten, dass die Polarisation der T-Helferzellen durch die DC während einer Sepsis in Richtung einer protektiven TH1-Antwort gehemmt ist und zu einer Immunsuppression führt. Die Dichotomie der DC während einer Sepsis liegt in ihrer Notwendigkeit für die Initiierung einer Immunantwort und ihrer Dysfunktion, die der Effektivität der Immunantwort entgegen wirkt.

1.3.3 Das Knochenmark während der polymikrobiellen Sepsis

Das Knochenmark ist der Ort der Hämatopoese. Hier werden aus den HSC alle zellulären Bestandteile des Blutes (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Granulozyten, DC, Makrophagen, Mastzellen) gebildet. Da die HSC alle verschiedenen Typen von Blutzellen

bilden können, das Entwicklungspotential aber auf eine bestimmte Zelllinie (myeloid oder lymphoid) beschränkt ist, werden sie auch als multipotent bezeichnet. Zur Bildung der unterschiedlichen Blutzellen proliferieren die HSC und werden zu lymphoiden oder myeloiden Vorläufer-Zellen. Aus den myeloiden Vorläufern gehen die Granulozyten, Makrophagen, DC und Mastzellen hervor. Die B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, aber auch bestimmte DC werden von den lymphoiden Vorläufer-Zellen gebildet [74]. Wie durch neuere Studien gezeigt werden konnte, existieren im Knochenmark neben den HSC auch Stammzellen, die heterogen und nicht hämatopoetischen Ursprungs (non-HSC) sind. Immer mehr Anzeichen sprechen dafür, dass diese im Knochenmark residierenden Zellen eine Rolle bei der Gewebe-Homöostase spielen könnten und im Falle von Gewebe-Verletzungen und Stress durch die Freisetzung aus dem Knochenmark die Regeneration von verletzten Geweben erleichtern könnten [86].

Als Ort der Bildung von Leukozyten kommt dem Knochenmark eine wichtige Bedeutung als zentrales lymphoides Organ zu. Trotzdem gibt es bis jetzt nur wenige Informationen über die Rolle des Knochenmarks während einer Sepsis. Anhand eines Tiermodells mit Kaninchen konnte gezeigt werden, dass nach einer bakteriellen Infektion mehr polymorphkernige Leukozyten aus dem Knochenmark ins Blut freigesetzt wurden [142]. Mit Hilfe des CLP-Modells in Mäusen wurde nachgewiesen, dass eine Population von $GR-1^+CD11b^+$ Zellen im Knochenmark während einer Sepsis stark zunimmt. Diese Zellpopulation besteht aus heterogenen, unreifen, überwiegend myeloiden Progenitoren, die unter anderem IL-10 produzieren und in Zusammenhang mit der Sepsis-induzierten T-Zell-Suppression und einer begünstigten T_H2 -Polarisation stehen [41]. Im CLP-Modell bei Mäusen konnte weiterhin wenige Stunden nach der Sepsis-Induktion ein Anstieg der Apoptose-Rate im Knochenmark beobachtet werden. Dabei ist die Apoptose auf die $B220^+Gr^-$ B-Zell-Population beschränkt. Für die T-Zellen im Knochenmark wurde dagegen keine Apoptose beschrieben [6]. Da Neutrophile eine relativ kurze Lebensspanne aufweisen und schnell zum Infektionsherd rekrutiert werden, müssen sie während einer Infektion kontinuierlich aus dem Stammzell-Pool neugebildet werden. So kommt es im Laufe einer Sepsis oft zur Neutropenie. In einem Mausmodell mit Verbrennung und anschließender *P. aeruginosa* Infektion wurde gezeigt, dass die dabei auftretende Neutropenie im Knochenmark nur zum Teil durch Apoptose induziert wird. Zusätzlich verhindert in den septischen Mäusen eine verminderte Generierung von myeloiden und Granulozyten/ Monozyten-Progenitoren aus HSC die Differenzierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark [138].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Während einer akuten Sepsis ist das Gleichgewicht zwischen der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) und dem gegenläufigen anti-inflammatorischen Syndrom (CARS) gestört, so dass es zu einer Suppression des Immunsystems kommt. Die Immunsuppression ist mit einer Beeinträchtigung der Funktion verschiedener Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems assoziiert. DC sind potente Antigen-präsentierende Zellen und spielen eine essentielle Rolle bei der Koordination von Immunantworten. In verschiedenen lymphoiden Organen führt die Sepsis zu einem schweren Verlust von DC. Die verbleibenden DC zeichnen sich dabei aus durch eine Unfähigkeit, das TH1-fördernde Zytokin IL-12 zu sezernieren eine TH1Zell Antwort zu induzieren, während das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 verstärkt produziert wird. Mit Hilfe des CLP-Tiermodells und der Applikation einer bakteriellen Infektion oder Pilz-Infektion in post-septische Versuchstiere konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber sekundären Infektionen nach dem Überleben einer Sepsis besteht [12, 111]. Die gleichzeitige Gabe von DC naiver Tiere kann eine protektive Immunantwort jedoch zum Teil wiederherstellen [14]. Dies zeigt, dass DC an der Entwicklung der Immunsuppression während einer Sepsis beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit soll klären, in wieweit DC nach Sepsis an einer Immunsuppression beteiligt sind und der Frage nach den Ursachen für die anhaltende Dysfunktion der DC nachgehen. Dafür werden zum einen DC aus der Milz und zum anderen die *de novo* aus dem Knochenmark generierten DC septischer Mäuse untersucht, da ein Grund für die Veränderungen der DC während und nach einer Sepsis in einem Defekt in ihrer Differenzierung aus dem Knochenmark liegen könnte. Untersucht werden die DC aus der Milz und die DC, die aus dem Knochenmark generiert wurden, in Bezug auf ihren Phänotyp und ihre Funktion. Mittels einer Infektion mit *P. aeruginosa* soll der Frage nachgegangen werden, in wieweit DC aus septischen Mäusen ein erhöhtes Risiko für eine Sekundärinfektion vermitteln.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien, die unter anderem die Zellkulturplatten, Pipetten, PP-Schraubenverschlussröhrchen, Pipettenspitzen, Kanülen, Einmalspritzen, Zellsiebe und Reaktionsgefäße umfassten, wurden von den Firmen Falcon BD (Heidelberg), Becton, Dickinson and Company BD (Heidelberg), STARLAB (Ahrensburg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.2 Labor-Geräte

Für die Arbeiten im Labor wurden die unter Tabelle 2.1 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
Auflichtmikroskop AxioStar plus	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
autoMACS [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO ₂ Inkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer FACSCalibur [®]	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Spectrophotometer DR/2010	HACH LANGE GmbH, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Werkbank antair BSK	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Zentrifuge Varifuge 3.0RS	Heraeus, München
Zentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, München
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Stimuli und Bakterien

2.3.1 Chemikalien

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 gebrauchte Ethanol lieferte die Apotheke des Universitätsklinikums Essen.

2.3.2 Reagenzien, Zytokine und Stimuli

Die unter Tabelle 2.2 aufgeführten Reagenzien, Zytokine und Stimuli wurden von den genannten Herstellern bezogen und fanden Anwendung in der Kultivierung und Aufreinigung von Zellen oder wurden *in vivo* in Versuchstiere appliziert.

Tabelle 2.2 Reagenzien, Zytokine und Stimuli

Reagenz	Bezugsquelle
Anti asialo GM1 Antiserum	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Liberase Blendzyme 2	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Monensin (GolgiStop™)	BD Biosciences, Heidelberg
Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (rmGM-CSF)	R&D Systems, Wiesbaden
Vybrant CFDA SE <i>CellTracerKit</i>	MolecularProbes™, Göttingen
Zytokin	Bezugsquelle
rekombinantes murines IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
Stimulus	Bezugsquelle
CpG-Oligonukleotide (Sequenz: T*C*C*ATGACGTTCTGAT*G*C*T)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Lipopolysaccharid (LPS, <i>E.coli</i> 026:B6)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ovalbumin-Peptid (Peptidname: OVA 323-339)	AnaSpec, San Jose, USA
Ovalbumin-Protein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Peptidoglycan (PGN)	InvivoGen, San Diego, USA
rekombinantes CD40 Ligand (CD40L)	R&D Systems, Wiesbaden

2.3.3 Bakterien

Der *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Stamm ATCC 27853 wurde verwendet, um Versuchstiere intranasal (i.n.) zu infizieren. *In vitro* wurden verschiedene murine Zelltypen mit Ultraviolettstrahlung (UV)-inaktivierten Bakterien desselben Stammes kultiviert.

2.4 Seren, Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Seren

Das in der Zellkultur als Mediumzusatz verwendete Fötale Kälberserum (*fetal calf serum* FCS) wurde bezogen von Biochrom (Berlin). Da das FCS in der Zellkultur verwendet und dem Puffer für die Zellsortierung mittels autoMACS zugesetzt wurde, besaß das FCS einen geringen Endotoxingehalt von weniger als 1,00 EU mL⁻¹. Mausserum, das als Mediumzusatz bei der Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zellaktivierung angewendet wurde, stammte von der Firma PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich). Der Endotoxingehalt des Mausserums betrug 34,1 EU mL⁻¹. Vor Gebrauch wurden die Seren durch Erwärmung für 30 Minuten auf 56° C inaktiviert und es folgte eine Zentrifugation (4000 g, 10 min) zur Entfernung von Sedimenten. Normales Kaninchenserum wurde aus Kaninchenblut nach Inkubation des Blutes bei Raumtemperatur (RT) und Abschluss der dabei eintretenden Gerinnung durch Zentrifugation gewonnen. Das Kaninchenblut wurde von

einem gesunden Kaninchen im Zentralen Tierlabor des Uniklinikums Essen ohne Zusatz von Gerinnungshemmern abgenommen. Eine Hitze-Inaktivierung des Kaninchenserums erfolgte nicht.

2.4.2 Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen (s. Tabelle 2.3) wurden, soweit nicht anders angegeben, die Chemikalien der unter 2.3.1 angegebenen Firmen verwendet. Als Lösungsmittel wurde entionisiertes Wasser aus der hauseigenen Anlage, selbst angesetztes PBS (*Phosphat-buffered Saline*) oder Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) verwendet. Das in der Zellkultur und bei der Aufreinigung von Zellen mittels autoMACS eingesetzte PBS wurde von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und besaß einen Endotoxingehalt von ≤ 1 EU mL⁻¹. Die Puffer und Lösungen, die Anwendung in der Zellkultur fanden, wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
autoMACS [®] Bindepuffer	2 mM EDTA; 0,5 % v/ v FCS (Biochrom) in PBS
autoMACS [®] <i>Cleaning Solution</i>	70 % v/ v Ethanol
autoMACS [®] <i>Rinsing Solution</i>	2 mM EDTA in PBS
autoMACS [®] <i>Running Buffer</i>	2 mM EDTA; 0,5 % v/ v FCS (Biochrom) in PBS
Blockierlösung (für ELISA)	1 % FCS in PBS
Bovine Serum Albumin (BSA)-Lösung	2 mg mL ⁻¹ , <i>Pierce Protein Research Products</i> , Thermo Fisher Scientific, Bonn
Cellwash [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Cytoperm/Cytofix [®]	BD Biosciences, Heidelberg
EDTA	250 mM Stocklösung
ELISA-Waschpuffer	D-PBS + 0,05 % Tween 20
Erythrozyten-Lysepuffer, pH 7	0,15 M NH ₄ Cl; 10 mM KHCO ₃ ; 0,1 mM Na ₂ EDTA*2H ₂ O
Ethanol	100 % v/ v, Apotheke Universitätsklinikum Essen
D-PBS (für ELISA)	1,5 M NaCl, 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , 27,1 mM Na ₂ HPO ₄
Isofluran (Forene [®])	100 % v/ v, Abbott, Wiesbaden
Physiologische Trypanblaulösung	0,4 %, Sigma-Aldrich
<i>TMB Substrate Reagent Set</i>	BD OptEIA [™] , BD Biosciences, Heidelberg

2.4.3 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente für alle Ansätze von Zellkulturen *very low endotoxin medium*, VLE RPMI 1640 der Firma Biochrom (Berlin). Als endotoxinfreie Zusätze enthielt das Kulturmedium 10 mM HEPES (Biochrom, Berlin), 0,06 mg mL⁻¹ Penicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 0,02 mg mL⁻¹ Gentamicin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 0,05 mM β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Taufkirchen). L-Glutamin war in dem RPMI Medium in

stabiler Form enthalten. Mit Ausnahme der Kultivierung von Lymphknotenzellen im Rahmen der *in vivo* Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung wurde dem Kulturmedium 10 % Hitze-inaktiviertes FCS zugesetzt. Das Medium für die Kultivierung von Lymphknotenzellen enthielt 1 % Mausserum.

2.4.4 Medium für Bakterien-Kultivierung

Die Kultivierung der *P. aeruginosa* erfolgte auf *Tryptic-Soy-Agar* (TSA)-Platten. Der hierfür verwendete Agar stammte von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und das *tryptic soy broth* (Tryptic-Soja-Bouillon, TSB) wurde von Bacto™ (BD, Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung der TSA-Platten wurden 10,5 g TSB zusammen mit 5,2 g Agar und 350 ml destilliertem H₂O 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. Für die Anzucht der Bakterien wurde Trypticase™ Soy Agar Medium (BD, Heidelberg) verwendet.

2.5 Kommerzielle Standardtests

Die unter Tabelle 2.4 angegebenen Test-Kits wurden angewendet zur Quantifizierung von Zytokinen in Zellkultur-Überständen und bei der Aufreinigung von Zellen mittels autoMACS.

Tabelle 2.4 Verwendete Standardtests

Test-Kit	Bezugsquelle
<i>CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>CD11c (N418) MicroBeads, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>NK Cell Isolation Kit, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Basic MicroBeads, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Foxp3 Staining Buffer Set</i>	eBioscience, Frankfurt
<i>mouse IFN-γ ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse IL-2 ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse IL-6 ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse IL-10 ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse IL-12p70 ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse TNF-α ELISA DuoSet</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>human/mouse TGF-beta 1 ELISA Ready-SetGo![®]</i>	eBioscience, Frankfurt
<i>BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets für Mouse TNF-α, IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-13</i>	BD Biosciences, Heidelberg

2.6 Antikörper

Die in der Tabelle 2.5 aufgelisteten Antikörper dienten der Charakterisierung von Zelloberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen im Rahmen der Durchflusszytometrie, der *in vivo* Applikation in Versuchstieren, oder fanden Anwendung in der Zellkultur. Antikörper, die in der Zellkultur verwendet wurden, enthielten einen geringen Endotoxingehalt von $< 1 \text{ EU mL}^{-1}$.

Tabelle 2.5 Antikörper

Spezifität	Konjugation	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
B220	PE	RA3-6B2	BD Biosciences, Heidelberg	
CD3		17A2	BD Biosciences, Heidelberg	
CD3	FITC	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg	
CD4	PE	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg	
CD11b	PerCPCy5.5	M1/70	BD Biosciences, Heidelberg	
CD11c	APC	HL3	BD Biosciences, Heidelberg	
CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)		2.4G2	BD Biosciences, Heidelberg	
CD25	PECy7	PC61.5	eBioscience, Frankfurt	Rat IgG1, λ
CD28		37.51	eBioscience, Frankfurt	
CD40	FITC	HM40-3	eBioscience, Frankfurt	Arm. Hamster IgG1, κ
CD45RB	PE	16A	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2a, κ
CD49b	APC	DX5	eBioscience, Frankfurt	
CD69	PE	H1.2F3	BD Biosciences, Heidelberg	
CD80	FITC	16-10A1	BD Biosciences, Heidelberg	Arm. Hamster IgG2, κ
CD86	PE	GL1	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2a, κ
DO11.10 TCR	APC	KJ1-26	eBioscience, Frankfurt	
Foxp3	PE	FJK-16s	eBioscience, Frankfurt	
Gr-1	PE	RB6-8C5	eBioscience, Frankfurt	Rat IgG2b, κ
H-2K ^d	PE	SF1-1.1	BD Biosciences, Heidelberg	Mouse IgG2a, κ
I-A/I-E	FITC	2G9	BD Biosciences, Heidelberg	
IFN-γ	PE	XMG1.2	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG1, κ
IL-10		JES5-2A5	BioXCell, West Libanon	Rat IgG1
IL-12	PE	C15.6	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG1
Ly6G	PE	1A8	BD Biosciences, Heidelberg	
NKG2A/C/E	Biotin	20d5	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2a, κ
NKG2D	PE	CX5	eBioscience, Frankfurt	Rat IgG1, κ
PD-1	PE	J43	BD Biosciences, Heidelberg	Arm. Hamster IgG2, κ
PD-L1	PE	MIH5	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2a, λ
Qa1	Biotin	6A8.6F10.1A6	BD Biosciences, Heidelberg	Mouse IgG1, κ
RAE-1γ	PE	CX1	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2b, κ
SAV	PerCPCy5.5		BD Biosciences, Heidelberg	

2.7 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Mäuse vom Stamm BALB/c verwendet, die von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden, oder aus eigener Zucht stammten. Die Zucht der BALB/c Mäuse im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen griff dabei zurück auf Elterntiere, die ursprünglich von Harlan Winkelmann erworben worden waren. Vor Versuchsbeginn hatten die von Harlan bezogenen Tiere eine Woche lang die Möglichkeit, sich an die Bedingungen im zentralen Tierlaboratorium zu gewöhnen. Dies diente der Vermeidung von möglicherweise beim Transport entstandenem Stress. Die für die T-Zell-Assays benötigten OVA-spezifischen T-Zellen wurden aus homozygoten weiblichen DO11.10 TCR transgenen Mäusen gewonnen. Diese Mäuse exprimieren einen TCR, welcher spezifisch für ein Ovalbumin-Peptid (pOVA) ist, das von MHC Klasse II Molekülen des Haplotyps d präsentiert. Ursprünglich wurden diese DO11.10 transgenen Mäuse von THE JACKSON LABORATORY bezogen und dann im ZTL des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Bei Versuchsbeginn hatten alle Tiere ein Alter von 7 - 12 Wochen und ein Gewicht von 20 bis 24 g erreicht. Die Versuchstiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen im ZTL des Universitätsklinikums Essen gehalten und hatten Zugang zu Standard-Nager-Futter und Wasser ad libitum.

3 Methoden

3.1 Zökale Ligation und Punktion als Tier-Modell für polymikrobielle Sepsis

Um eine subletale polymikrobielle Sepsis zu induzieren, wurde das von der Arbeitsgruppe um CHAUDRY [185] entwickelte Modell der zökalen Ligation und Punktion (*Cecal Ligation and Puncture*, CLP) in modifizierter Form angewendet. Das Prinzip dieses Modells beruht darauf, dass nach der Ligation und der Punktion des Blinddarms ein Austritt von Bakterien aus dem Blinddarm in die Bauchhöhle erfolgt, wodurch eine polymikrobielle Sepsis ausgelöst wird. Um den Schweregrad der Sepsis zu modulieren, kann man die Länge des abgebundenen Blinddarmabschnitts und die Größe der zur Punktion verwendeten Nadel variieren. In der vorliegenden Arbeit wurde für die durchgeführten Versuche eine subletale Sepsis induziert,

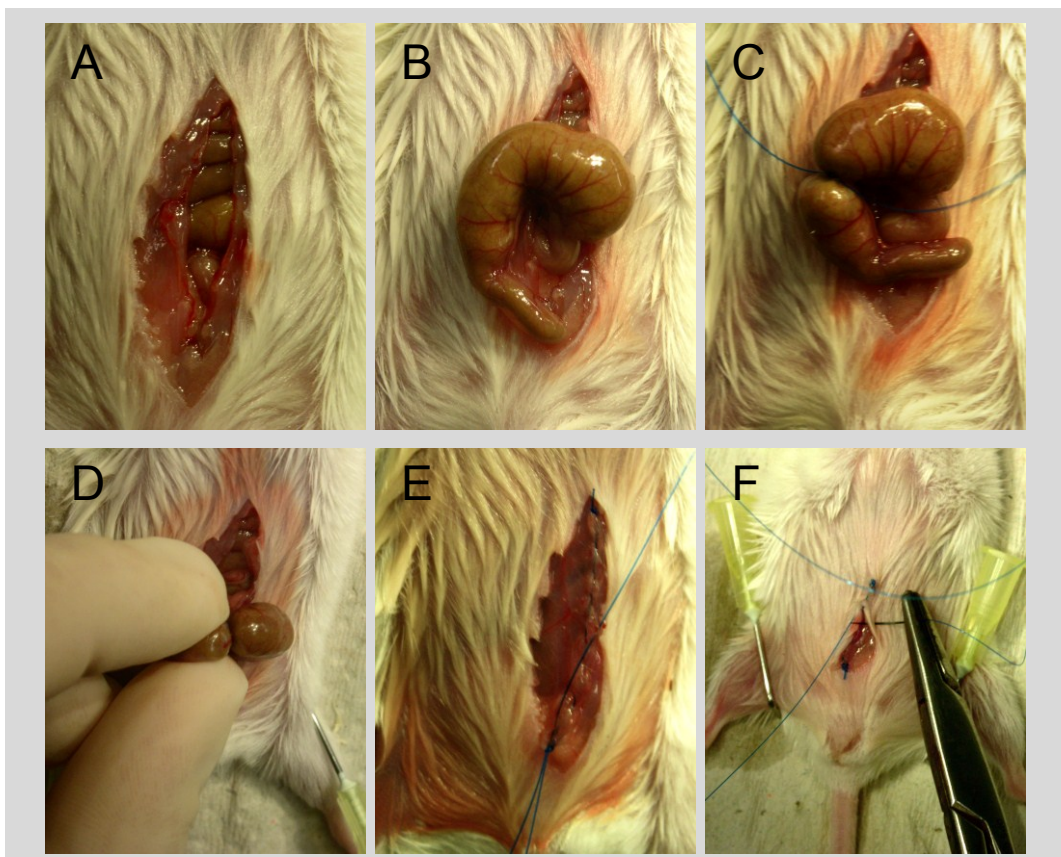


Abbildung 3.1 **Ablauf der CLP-Operation zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis.** Nach der Öffnung des Fells und der Bauchdecke mittels einer Schere (A) wird der Blinddarm aus der Bauchhöhle freigelegt (B) und etwa ab der Hälfte mit Hilfe von Nahtmaterial abgebunden (C). Mit einer 27G-Kanüle wird der ligierte Teil des Blinddarms einmal punktiert und eine sehr geringe Menge an Darminhalt wird vorsichtig herausgedrückt (D). Nachdem der Blinddarm zurück in den Bauchraum platziert wurde, 1 ml einer NaCl-Lösung i.p. verabreicht wurde, wird zunächst die Bauchdecke (E) und dann das Fell zugenäht (F).

bei der die Versuchstiere einen Zeitraum von 4 Tagen überleben sollten. Hierfür wurden weibliche 7-12 Wochen alte Mäuse des Stammes BALB/c verwendet. Nach der Betäubung der Mäuse mit Isofluran erfolgte die Narkose mit einer intramuskulären (i.m.) Injektion von 115 mg kg⁻¹ Körpergewicht Ketamin (CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) und

13 mg kg⁻¹ Körpergewicht Xylazin (CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) in den Vorderlauf. Danach wurde der Bauchraum der Versuchstiere geöffnet. Hierzu wurde der Bauch der Versuchstiere mit Octenisept® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert und das Fell im unteren Bauchbereich mit einer Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm aufgeschnitten. Danach erfolgte die Öffnung des Bauchraums (Laparotomie) entlang der linea alba und der Blinddarm wurde mit Hilfe einer stumpfen Pinzette aus dem Bauchraum freigelegt. Mittels einer Schlaufe aus 5-0 nicht-resorbierbarem chirurgischem Nahtmaterial (Prolene von Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) wurde ca. 50% des Blinddarms abgebunden und der abgebundene Teil des Blinddarms wurde mit einer 27Gauge (G)-Kanüle (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) einmalig punktiert. Durch die so entstandene Perforation wurde vorsichtig eine sehr geringe Menge an Darminhalt mit Daumen und Zeigefinger ausgedrückt und der Blinddarm wurde zusammen mit dem Darminhalt zurück in die Bauchhöhle platziert. Zur Wiederbelebung der Versuchstiere wurde anschließend 1 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal (i.p.) verabreicht und sowohl Bauchraum, als auch Fell wurden jeweils mit einer Naht aus 5-0 Prolene verschlossen. Als Negativkontrolle wurden Versuchstiere einer sogenannten Sham-Operation (Schein-Operation) unterzogen, bei der keine Ligation und Punktion des Blinddarms erfolgte. Unter den beschriebenen Operationsbedingungen entwickelten die CLP-Versuchstiere deutliche Krankheitssymptome, die sich durch struppiges Fell, eingeschränkte Motilität und Gewichtsverlust kennzeichneten. Die Mortalität innerhalb von 4 Tagen nach der Sepsis-Induktion lag bei 0 - 25 %.

3.2 Infektion mit *P. aeruginosa*

3.2.1 Anzucht der *P. aeruginosa*

Die zur i.n. Infektion verwendeten *P. aeruginosa* mussten vor der Infektion der Versuchstiere vermehrt werden, um die entsprechende Menge applizieren zu können. Hierzu wurden die Bakterien am Tag vor der Infektion für ungefähr 14 h auf TSA-Platten (BD™ Trypticase™ Soy Agar, BD, Heidelberg) bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Vermehrung der Bakterien wurde eine Impföse des Bakterienmaterials in einen Erlenmeyerkolben mit 8 ml TSB, einem Universal-Anreicherungsmedium, überführt und bei 37°C, im Wasserbad, für eine 1 h kultiviert. Während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte das Ernten der *P. aeruginosa* durch Überführen der Bakterien-Lösung in ein 50 ml PP-Röhrchen und Zentrifugation (1300 g, 10 min). Nach Resuspendieren in 20 ml RPMI Medium (Gibco®, Invitrogen, Darmstadt), welches 10 mM HEPES und stabiles L-Glutamin enthielt, wurde die Bakterienzahl mit Hilfe eines Photometers und der Bestimmung der Absorption der Bakterien-Lösung bei 550 nm bestimmt. Bei dem verwendeten Photometer entsprach eine

Absorption von 1,0 einer Bakterienzahl von $2,1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation und anschließendes Resuspendieren) in RPMI Medium wurden die *P. aeruginosa* auf die gewünschte Bakterienzahl durch die Verdünnung mit Medium eingestellt.

3.2.2 Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa*

Für die Infektion von naiven Versuchstieren des Stammes BALB/c wurden 1×10^9 Koloniebildende Einheiten (*Colony-Forming Units*, CFU) i.n. appliziert. Versuchstiere, die einer Sham- oder CLP-Operation unterzogen worden waren, wurden mit 2×10^8 CFU infiziert. Hierfür wurden die Mäuse kurz mit Diethylether narkotisiert und die *P. aeruginosa* Bakterien wurden in einem Volumen von 20 μl mit Hilfe einer Mikropipette zügig in ein Nasenloch pipettiert. Die Versuchstiere befanden sich dabei narkotisiert, durch den Griff im Nackenfell in senkrechter Lage und sie wurden, bis sie das Bewusstsein wiedererlangten, aufrecht gehalten, um die vollständige Aufnahme des Flüssigkeitsvolumen in den Atemtrakt zu gewährleisten.

3.2.3 Bestimmung der bakteriellen Beladung der Lungen

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa* wurden die Lungen entnommen (s. 3.3.3). Jedoch wurde hier auf die Spülung der Lungen mit PBS verzichtet. Mittels eines Duall Homogenisators mit Glaspistill wurden die Lungen in je 1 ml PBS homogenisiert. Zur Bestimmung der Zahl der Bakterien in den Lungen wurden 100 μl des Homogenisats für 10 min unter Zugabe von 5 mg mL^{-1} Saponin lysiert, um intrazelluläre Bakterien freizusetzen. Durch die Zugabe von 900 μl PBS wurde 1 ml einer 1:10 Verdünnung des Lungenhomogenisates hergestellt, welches zur weiteren seriellen Verdünnung verwendet wurde. Jeweils 900 μl der seriellen Verdünnungen wurden auf TSB-Agar-Platten für 18 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurden die Kolonien ausgezählt.

3.3 Organentnahme

Für die Entnahme des Knochenmarks, der Milzen, der Lungen oder der Lymphknoten wurden die Versuchstiere nach kurzer Vorbetäubung mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Tötung erfolgten alle weiteren Schritte zur Organentnahme unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank.

3.3.1 Präparation der Knochen

Um die Oberschenkel- (Femur-) und Unterschenkel- (Tibia-) Knochen zu entnehmen, wurden die Versuchstiere in Rückenlage fixiert und das Fell im Beinbereich wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert. Mit Hilfe einer Schere wurde ein Schnitt entlang der Hinterbeine der Mäuse durchgeführt und das Fell wurde vollständig von den Muskeln entfernt. Durch einen Schnitt

im Hüftbereich, bei dem darauf geachtet wurde, dass es nicht zu einer Verletzung der Knochen kam, erfolgte anschließend die Trennung der Hinterbeine von den Hüftgelenken. Für die Entfernung des Muskelgewebes von den Knochen, mussten zunächst die Femur- und Tibia-Knochen durch den Schnitt mit einer Schere voneinander und von den Fußknochen getrennt werden. Die so separierten Knochen wurden durch vorsichtiges Reiben zwischen einem rauen Papiertuch von den Muskelfasern und dem Sehngewebe gereinigt und bis zur Gewinnung der Knochenmarkzellen in PBS auf Eis gehalten.

3.3.2 Präparation der Milz

Die Entnahme der Milz erfolgte nach der Desinfektion des Bauchfells der Versuchstiere mit 70 % Ethanol. Mit einer Schere wurde zunächst ein Hautschnitt auf der linken Seite der Versuchstiere im Bereich der Milz durchgeführt. Nach dem Aufschneiden des Peritoneums wurde die Milz vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette aus der Bauchhöhle gelöst, vom umliegenden Gewebe befreit und durch einen Schnitt von den beiden Blutgefäßen getrennt. Die weitere Aufbewahrung der Milz bis zur Zellgewinnung erfolgte in einer Petrischale (100 x 15 mm) in Kulturmedium.

3.3.3 Präparation der Lunge

Zur Entnahme der Lunge wurden die Versuchstiere in Rückenlage fixiert. Nach der Desinfektion mit 70 % Ethanol wurde das Fell auf der Bauchseite mittels einer Schere auf der kompletten Körperlänge aufgeschnitten. Im Anschluss an die Freilegung des Thorax (Brustkorb) wurde die Brusthöhle durch das Durchschneiden des Zwerchfells und Entfernung der Rippen und des Brustbeins eröffnet. Es wurden dann die vena cava inferior (untere Hohlvene) und die Aorta, die entlang der Wirbelsäule verlaufen und das Blut vom Herzen abführen (Aorta), unterhalb des Zwerchfells durchschnitten. Danach wurde solange eiskaltes PBS mittels einer 10 ml Spritze und einer 25G-Kanüle in die rechte Herzkammer gespritzt, bis beide Lungenflügel blutleer waren. Das sich in der Lunge befindende Blut, das im Zuge der Sauerstoffanreicherung über die Arteria pulmonalis (Lungenarterie) aus der rechten Herzkammer in die Lunge gepumpt wird, konnte so aus der Lunge gespült werden und durch die durchschnittene Aorta ablaufen. Die Lungenflügel wurden mit Hilfe einer Schere und stumpfen Pinzette vorsichtig von der Trachea und der Lungenarterie und -vene getrennt, aus dem Brustkorb entnommen und sofort weiterbehandelt zur Aufreinigung der Lungenzellen.

3.3.4 Präparation der Lymphknoten

Es wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Diese liegen an der Rückseite der Kniekehle, eingebettet in Fettgewebe. Nach der Fixierung der Beine und der Desinfektion des Beinfells wurde zunächst das Fell auf der gesamten Länge der Beine aufgeschnitten und die Kniekehlen wurden freigelegt. Nach einem kleinen Schnitt in das umgebende Gewebe

wurden die Lymphknoten mit einer feinen Pinzette vom Fettgewebe gelöst und in eine Petrischale mit Kulturmedium überführt.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Isolierung und Kultivierung muriner Zellen

Alle zur Isolation und Kultivierung benötigten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten der Zell-Präparation wurden die isolierten Organe, Gewebe bzw. Zellen auf Eis gekühlt. Die Inkubation der verschiedenen murinen Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂/Luft-Gemisch.

3.4.1.1 Erythrozyten-Lyse

Im Rahmen der Isolierung der Knochenmarkzellen, Milzzellen und der Lungenzellen erfolgte eine Lysierung der Erythrozyten. Hierfür wurden die gewonnenen Zellen zentrifugiert (300 g, 10 min und 4 °C). Das Zellsediment wurde in 1 ml Erythrozyten-Lyse Puffer mittels einer Mikropipette resuspendiert und für bei RT inkubiert. Die anschließende Zugabe von 5 ml Kulturmedium stoppte den Lyseprozess und es folgte eine Unterschichtung der Zellen mit 1,5 ml FCS. Zum Abschluss der Erythrozyten-Lyse folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (300 g, 10 min, 4 °C), bevor die Zellen in Kulturmedium aufgenommen wurden.

3.4.1.2 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen

Zur Generierung von DC aus dem Knochenmark der Versuchstiere wurde die von LUTZ et al. [98] beschriebene Methode in abgeänderter Form verwendet. Nach der Entnahme der Knochen wurden diese zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und danach in sterilem PBS aufgenommen. Mit einer sterilen Schere wurden jeweils die beiden Enden eines Knochens aufgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe von Kulturmedium, das durch eine 27G-Kanüle in die Knochen gespritzt wurde, aus den Knochen gespült und in einer Petrischale aufgefangen. Die so gewonnenen Knochenmarkzellen wurden mittels einer Mikropipette vorsichtig resuspendiert, um Zellaggregate aufzulösen. Nach der Überführung der Zellen in ein 50 ml PP-Röhrchen, folgte eine Lyse der Erythrozyten in deren Anschluss die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Um aus den Knochenmarkzellen *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (BMDC) zu generieren, wurden die Knochenmarkzellen in einer Dichte von 2×10^6 in Petrischalen (100 x 15 mm, Falcon, BD Biosciences) mit 10 ml Kulturmedium ausgesät. Das Medium enthielt zusätzlich 20 ng mL⁻¹ rmGM-CSF, einen myeloischen Wachstumsfaktor, der in dieser Konzentration die Differenzierung von DC aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks begünstigt. Nach 3 Tagen Inkubation der Zellen im Brutschrank wurden 10

ml Kulturmedium, welches 20 ng mL^{-1} GM-CSF enthielt, zu jeder Petrischale zugefügt. Am 7. Tag der Kultur wurden alle nicht-adhärenenten Zellen geerntet, abzentrifugiert und gezählt. Charakteristisch für differenzierte DC ist die Expression von CD11c und MHC Klasse II-Molekülen, deren Anteil an den Knochenmarkzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde.

3.4.1.3 Isolierung und Kultivierung von Milzzellen

Nach der Entnahme und Aufnahme in eine Petrischale wurde in die Milz mit Hilfe einer 27G-Kanüle und einer Spritze an drei Stellen ein Volumen von 1 ml einer $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Liberase Blendzyme 2-Lösung injiziert. Die Milz wurde dann in drei gleich große Teile geschnitten und für 18 min im Brutschrank inkubiert. Das Liberase Blendzyme 2 ist eine Mischung aus Enzymen, die auf die Kollagene und nicht-Kollagen-Proteine wirken, die die interzelluläre Matrix im Milzgewebe aufbauen, und dient dem effizienten und vorsichtigen Aufschluss des Gewebes. Zur Gewinnung der Zellen nach dem Verdau wurden die Milzteile mit Hilfe der rauen Seite einer 2 ml Spritze durch ein Zellsieb ($70 \text{ } \mu\text{m}$) in eine Petrischale, die 20 ml Kulturmedium mit 5 mM EDTA enthielt, gerieben. Anschließend wurden die im Medium suspendierten Milzzellen durch ein weiteres Zellsieb ($40 \text{ } \mu\text{m}$ Maschengröße) in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei $460g$ (1500 rpm) für 6 min und $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ erfolgte eine Erythrozyten-Lyse und danach wurden die Milzzellen in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde nach Verdünnung der Zellen im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Im Anschluss an die Isolierung wurden die Milzzellen für die Aufreinigung von CD11c^+ DC mittels *automated magnetic cell sorting* (autoMACS) verwendet. Für die Isolation von CD4^+ T-Zellen oder NK-Zellen aus einer Milzsuspension mittels autoMACS wurden die Milzen wie bereits beschrieben aufgereinigt, jedoch ohne eine Erythrozyten-Lyse und den Verdau mit Blendzyme.

Die aus der Milz aufgereinigten DC wurden für 18 bis 22 h in einer Dichte von 1×10^5 und einem Volumen von $200 \text{ } \mu\text{l}$ in Triplikaten in *96-well* Flachbodenplatten ausgesät und in An- oder Abwesenheit von $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG kultiviert. Zusätzlich wurde $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ rmGM-CSF zugesetzt. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Analyse mittels CBA bei -20°C aufbewahrt.

3.4.1.4 Isolierung und Kultivierung von Lungenzellen

Die entnommenen Lungenflügel eines Tieres wurden mit Hilfe eines Skalpell auf einem Glasobjektträger in kleine Stücke zerschnitten und dann in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt, in dem sich 3 ml einer 2 mg mL^{-1} Collagenase P-Lösung (verdünnt mit PBS) befanden. Zum Verdau des Lungengewebes erfolgte eine 45 min Inkubation der Lungen bei 37°C im Wasserbad. Nach kurzem Vortexen wurde die Lungensuspension mit der rauen Seite einer 2

ml Spritze durch ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite in ein 50 ml PP-Röhrchen gerieben. Zur weiteren Entfernung von überschüssigem Gewebe und Zelltrümmern folgte ein Überführen der Zellsuspension durch einen 30 µm-Nylonfilter in ein 15 ml PP-Röhrchen. Vor der Bestimmung der Zellzahl wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt, in deren Anschluss die Zellen in 1 ml Kulturmedium aufgenommen wurden.

Kultiviert wurden die Lungenzellen für 18 bis 22 h in *96-well* Rundbodenplatten in einer Dichte von 8×10^5 und einem Volumen von 200 µl in Quadruplikaten. Stimuliert wurden die Zellen mit $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 oder 10×10^6 CFU der UV-inaktivierten *P. aeruginosa*. Um die NK-Zellen als Teil der Lungenzellen zu aktivieren und stimulieren wurde zusätzlich 3 ng mL^{-1} rmlL-2 zur Kultur hinzugefügt. In den Überständen wurden mittels ELISA die Zytokine bestimmt und die Lungenzellen wurden in einer intrazellulären Färbung näher analysiert.

3.4.1.5 Isolierung von Lymphknotenzellen

Zur Isolierung der Zellen aus den Lymphknoten wurden die Lymphknoten mit der rauen Seite einer 2 ml Spritze vorsichtig durch ein 70 µm-Zellsieb in eine Petrischale gerieben, in dem 5 ml des Kulturmediums (ohne FCS) vorgelegt waren. Nach kurzem Resuspendieren zum Auflösen von Zellclustern wurde die Zellsuspension in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt, zentrifugiert (460 g, 6 min., 4°C) und die Lymphknotenzellen wurden in 1 ml Kulturmedium (mit 1% Mausserum) aufgenommen.

3.4.2 Isolierung muriner Zellpopulationen mittels *automated magnetic cell sorting* (autoMACS®)

Die Methode der magnetischen Zellsortierung (*Magnetic Cell Sorting*, MACS®) beruht auf dem Prinzip der Sortierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle mit Hilfe von Antikörpern, die an magnetische Kügelchen (sogenannte MACS® *MicroBeads*) gekoppelt sind. Während einer Inkubation der Zellsuspension werden die gewünschten Zellpopulationen durch das Binden der monoklonalen Antikörper indirekt mit den magnetischen *MicroBeads* markiert. Durch das Überführen des Zellgemischs auf eine ferromagnetische Säule und das Anlegen eines magnetischen Feldes werden die magnetisch-markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen die Säule passieren können. Erst nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld werden die magnetisch-markierten Zellen aus der Säule eluiert (s. Abbildung 3.2). So ist es möglich, Zellpopulationen, die mit MACS®-*MicroBeads* markiert sind, und unmarkierte Zellpopulationen voneinander zu trennen. Bei einer sogenannten Positivselektion wird die Zellpopulation, die man isolieren möchte, mit den MACS®-*MicroBeads* markiert und von den restlichen Zellen separiert. Die Depletion von Zellen beschreibt die Markierung aller Zellen, die nicht von Interesse sind. Hier werden alle markierten Zellen in der Säule zurückgehalten

und die aufzureinigende Zellpopulation, die unmarkiert bleibt, wird zuerst eluiert. Um die Reinheit der Zellpopulation zu überprüfen, wurde im Anschluss der Separation eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

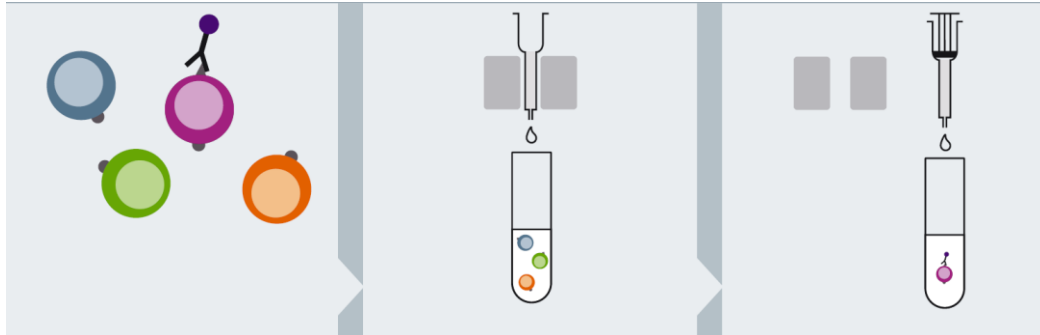


Abbildung 3.2 **Prinzip der positiven Selektion mittels MACS® (Miltenyi Biotec, 2008)**. Zellen, die über Antikörper-Bindung mit magentischen *MicroBeads* gekoppelt sind, werden auf eine Säule geladen und in ein magnetisches Feld gebracht. Während die magnetisch gekennzeichneten Zellen zurückgehalten werden, erfolgt die Eluierung der nicht magnetisch gekennzeichneten Zellen. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld werden die *MicroBead* gekoppelten Zellen von der Säule gespült.

3.4.2.1 Isolierung von CD4⁺ T-Helferzellen aus Milz und Lymphknoten

Für die Isolation der CD4⁺ T-Helferzellen aus Milz und Lymphknoten-Zellsuspensionen wurde das *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* verwendet. Die Separation von CD4⁺ T-Helferzellen beruht dabei auf der Depletion von magnetisch-markierten Zellen, die nicht CD4⁺ sind. Für die indirekte Markierung wurden biotinylierte Antikörper gegen CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen, DC, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten verwendet. Das Vorgehen bei der Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und die Separation der Zellen erfolgte mit einem autoMACS® der Firma Miltenyi Biotec.

3.4.2.2 Isolierung von NK-Zellen aus der Milz

Für die Isolation der NK-Zellen aus der Milz wurde das *NK Cell Isolation Kit* verwendet. Die Separation von NK-Zellen beruht dabei auf der Depletion aller magnetisch-markierten Zellen, bei denen es sich nicht um NK-Zellen handelt, so dass die NK-Zellen im Anschluss an die Separation unmarkiert sind. Für die indirekte Markierung wurden biotinylierte Antikörper gegen CD3⁺ T-Lymphozyten, B-Zellen, DC, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten verwendet. Das Vorgehen bei der Isolierung erfolgte auch hier nach Herstellerangaben und die Separation der Zellen erfolgte mit einem autoMACS® und dem Programm „*Depletes*“.

3.4.2.3 Isolierung von DC aus der Milz

Für die Isolation der DC aus der Milz wurden *CD11c MicroBeads* von Miltenyi Biotec entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Vor der Inkubation mit den spezifischen *CD11c MicroBeads* wurden die Milzzellen für wenige Sekunden mit *Basic MicroBeads*

inkubiert. Hierbei handelt es sich um unkonjugierte *Beads*, die für die Entfernung von Material, das unspezifisch an die *MicroBeads* bindet, benutzt werden können. So können zum Beispiel tote Zellen aus der Zell-Suspension entfernt werden und die Aufreinigung der gewünschten Zellen wird verbessert. Es wurden 5 µl einer 1:10 Verdünnung (mit PBS) der *Basic MicroBeads* pro 1×10^7 Zellen verwendet und anschließend wurden die positiv-markierten Zellen, die an die *Basic MicroBeads* gebunden hatten, mittels des autoMACS® Programms „*Possel*“ aussortiert. Es folgte die Inkubation der Milzzellen mit den *CD11c MicroBeads* und für die Aufreinigung der magnetisch-markierten $CD11c^+$ DC wurde das Programm „*Posseld*“ verwendet.

3.5 Versuchsverlauf und Applikationen

3.5.1 Charakterisierung der Immunsuppression nach Sepsis

Vier Tage nach der Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurden aus den Versuchstieren die Milzen, die Lungen und das Knochenmark entnommen. Die Milzzellen wurden durchflusszytometrisch charakterisiert und die DC wurden aufgereinigt und kultiviert (s. 3.4.1.3). Die Lungenzellen wurden ebenfalls gewonnen und die Zellzusammensetzung wurde mittel Durchflusszytometrie analysiert. Weiterhin wurden auch die Lungenzellen kultiviert und im Anschluss intrazellulär gefärbt (s. 3.4.1.4). Das Knochenmark wurde nach einer durchflusszytometrischen Analyse verwendet, um DC zu generieren (s. 3.4.1.2).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die septischen Versuchstiere 4 d nach der Sepsis-Induktion mit 2×10^8 *P. aeruginosa* infiziert und die bakterielle Beladung der Lungen wurde bestimmt.

3.5.2 Charakterisierung der BMDC

3.5.2.1 Stimulation und OVA-Beladung der BMDC

Zur näheren Charakterisierung der BMDC an Tag 7, wurde der Einfluss von bakteriellen Komponenten auf die BMDC untersucht. Hierfür wurden je $0,5 \times 10^6$ BMDC in 48 *well*-Flachbodenplatten in einem Volumen von 500 µl als Triplikate ausgesät. Zur Stimulierung der Zellen dienten $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG-Oligonukleotide, 100 ng mL^{-1} LPS, sowie $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ PGN. Des Weiteren wurde der Kultur rmGM-CSF in einer Konzentration von 10 ng mL^{-1} zugefügt. Nach 18 bis 22 h wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und bis zur Bestimmung von verschiedenen Zytokinen mittels ELISA bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Vor der Untersuchung der Interaktion der DC mit T-Zellen wurden die Tag 7 BMDC mit Ovalbumin-Protein (OVA) und CpG-Oligonukleotiden stimuliert. Als Kontrolle wurden zusätzlich auch Kulturen der BMDC ohne Zugabe von CpG angelegt. Dazu wurden die ausgereiften DC für 7 h in einer Dichte von 5×10^6 Zellen in einer 6 *well*-Flachbodenplatte in

einem Volumen von 2 ml ausgesät und mit 5 mg mL^{-1} CpG-Oligonukleotiden und $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ OVA stimuliert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden danach geerntet, gezählt und mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der aktivierten MHC Klasse II⁺ CD11c⁺ DC bestimmt. Um zu überprüfen, welche löslichen Mediatoren die stimulierten Sham- und CLP-BMDC produzierten, wurden 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 200 μl Kulturmedium in einer 96 well-Flachbodenplatte erneut in Triplikaten ausgesät. Manche Kulturen wurden zusätzlich mit $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ CD40 Ligand versetzt, um die Gegenwart von aktivierten T-Zellen zu simulieren. Nach 18 bis 22 h Inkubation wurden die Überstände der BMDC-Kulturen für Zytokin-Analysen mittels ELISA abgenommen und bei $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.5.2.2 Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung *in vivo*

Zur Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung *in vivo* wurden mittels MACS-Technik DO11.10⁺ CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen von DO11.10 TCR transgenen Mäusen gewonnen. Hiervon wurden je 5×10^6 in 100 μl PBS intravenös (i.v.) in naive BALB/c injiziert.

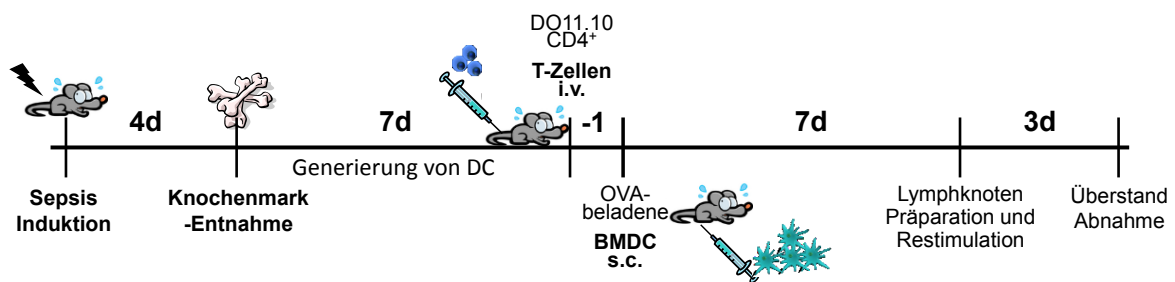


Abbildung 3.3 Versuchsablauf zur Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung *in vivo*

Nach 24 h wurden $0,5 \times 10^6$ der mit CpG und OVA für 7 h inkubierten, BMDC in einem Volumen 30 μl PBS subkutan (s.c.) in die rechte und linke Fußsohle der BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor die CD4⁺ T-Zellen erhalten hatten, injiziert. So erhielt jede Maus eine absolute Menge von 1×10^6 BMDC. Nach 7 Tagen wurden die drainierenden (poplitealen) Lymphknoten entnommen und die Lymphknotenzellen wurden isoliert (s. Abbildung 3.3). Der Aktivierungszustand der OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die isolierten Lymphknotenzellen wurden in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen pro 200 μl in Triplikaten in 96 well-Flachbodenplatten ausgesät und mit $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ OVA und $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ pOVA restimuliert. Als Kulturmedium diente Medium, dem anstelle von FCS 1% Maus-Serum zugesetzt war. Als weitere Kultur wurden die aus den Lymphknotenzellen mittels MACS aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen in Triplikaten in einer Konzentration von 1×10^5 pro 200 μl auf eine 96 well-Flachbodenplatte ausgesät, die mit $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ αCD3 und $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ αCD28 beschichtet war. Nach 3 Tagen wurden die Überstände der Kultur abgenommen und mittels ELISA analysiert.

3.5.2.3 Einfluss von NK-Zellen auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung

Für einige Versuche wurde den BALB/c Versuchstieren 2 bis 3 h nach der T-Zell-Applikation zusätzlich 50 μ l Anti asialo GM1 Antiserum, verdünnt mit 250 μ l PBS, i.p. injiziert, um die NK-Zellen zu inaktivieren und zu depletieren. Das Anti asialo Serum wird gewonnen aus Kaninchen, die zuvor gegen asialo GM1 (aus Rinderhirn-Gewebe aufgereinigt) immunisiert worden waren. Das asialo GM1 ist ein Antigen auf der Zellmembran der NK-Zellen [82]. Zusätzlich zu einer Inaktivierung der NK-Zellen, ist auch eine Depletion möglich [96]. Als Kontrolle der Wirkung des Anti asialo Serums wurden 50 μ l eines Kaninchenserums, das aus dem Blut von gesunden unbehandelten Kaninchen des ZTL gewonnen worden war, i.p. verabreicht. Der weitere Versuchsablauf entsprach der bereits unter 3.5.2.2 beschriebenen Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung.

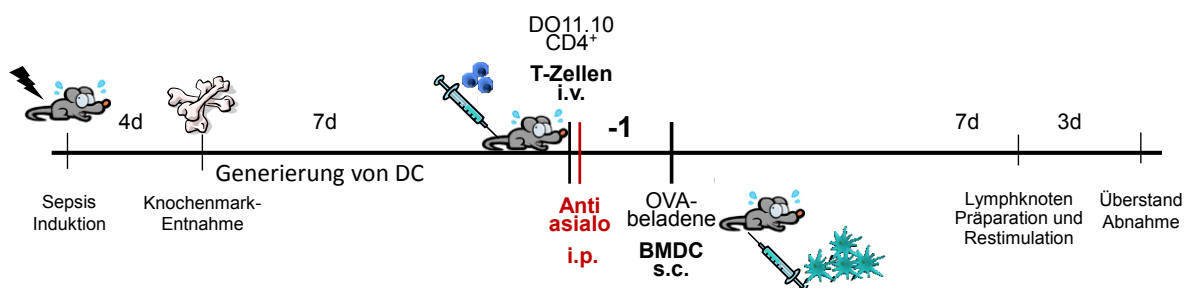


Abbildung 3.4 Versuchsablauf zur NK-Zell-Depletion bei Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung

3.5.2.4 Einfluss von IL-10 auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung

Um zu untersuchen, ob das Zytokin IL-10 an der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung durch die BMDC beteiligt war, wurde im Rahmen des Versuchsablaufs der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung das IL-10 durch die Applikation eines IL-10-Antikörpers neutralisiert. Hierzu wurden ungefähr 2 h nach der s.c. Injektion der BMDC 50 μ g des α IL-10 Antikörpers pro Maus i.p. appliziert. Wie bereits unter 3.5.2.2 beschrieben folgte nach 7 d die Entnahme der Lymphknoten und die Restimulation der Lymphknotenzellen.

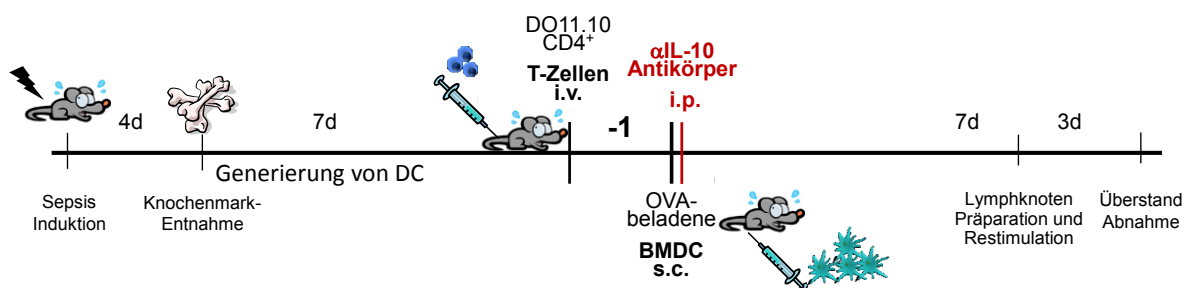


Abbildung 3.5 Versuchsablauf zur IL-10-Neutralisierung bei Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung *in vivo*

3.5.2.5 Einfluss von DC auf die *P. aeruginosa* Infektion

Die aus dem Knochenmark der septischen Tiere und der Kontrolltiere generierten und an Tag 7 geernteten DC wurden in einer Konzentration von 1×10^6 zusammen mit 1×10^9 CFU der *P. aeruginosa* i.n. in naive BALB/c Mäuse injiziert. Nach 24 h wurden die Lungen entnommen und die bakterielle Beladung wurde bestimmt. Als Kontrolle dienten naive Versuchstiere, die mit 1×10^9 *P. aeruginosa* infiziert wurden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden naive BALB/c mit 1×10^9 CFU *P. aeruginosa* i.n. infiziert. Auch hier wurden BMDC der septischen und der Kontrolltiere in einer Konzentration von 1×10^6 co-appliziert. Jedoch wurden die BMDC vorher mit CFSE markiert. Vier h nach der Infektion wurden die Lungen entnommen und die Lungenzellen wurden für Kulturen und durchflusszytometrische Analysen verwendet. Als Kontrollen dienten naive nicht-infizierte BALB/c und BALB/c Mäuse, die nur die *P. aeruginosa* Infektion erhielten.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die isolierten und kultivierten murinen Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Zytokine zu analysieren und näher zu charakterisieren. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, die spezifisch an die zu untersuchenden Zellen binden, ist es möglich, die entsprechenden emittierten Lichtstrahlungen/Fluoreszenzen der Zellen mit Hilfe von Lasern und Detektoren zu erfassen und zu quantifizieren. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei direkt proportional zur Menge der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle (Fluorochrome) und damit zur Menge an Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen. Während der Messung mit einem Durchflusszytometer werden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen in suspensierter Form in einem laminaren Strom durch hydrodynamische Fokussierung durch den Strahl eines Lasers geführt. Dabei lenken die Zellen das einfallende Laser-Licht ab, es kommt zur Lichtstreuung. Je nach der Größe, der Beschaffenheit der Zellmembran, des Kerns und des granulären Materials im Inneren der Zellen, können die Lichtstreuungseigenschaften variieren. Das *Forward-scattered light* (FSC) wird bestimmt durch die von den Zellen verursachte Lichtbeugung und ist proportional zur Größe der Zellen. Das *Side-scattered light* (SSC) ist das Licht, das von den Zellen gebrochen und reflektiert wird. Die spezifische Fluoreszenz der Zellen wird detektiert, indem das an die Zelle gebundene Fluorochrom die Energie des Laserlichts absorbiert und die absorbierte Energie anschließend in Form von Photonen wieder abgibt. Diese Photonenkonzentration kann, über optische Filter zu geeigneten Detektoren weitergeleitet, quantifiziert werden (s. Abbildung 3.6). Das elektronische System des Durchflusszytometers verarbeitet die detektierten Lichtsignale, wandelt sie in digitale Signale um, die, falls nötig, verstärkt und dann in Mess- oder

Auswertefenstern graphisch dargestellt werden. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte als zweidimensionale Punkt-Diagramme, so genannte „DotPlots“. Für die durchflusszytometrischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur™ verwendet, welches mit 2 Lasern 4 verschiedene Fluoreszenzen messen kann. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren FITC (*Fluorescein Isocyanat*), PE (*Phycoerythrin*), PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein*) und APC (*Allophycocyanin*). Die Wellenlängenbereiche, in denen die Farbstoffe ihre Emissionsmaxima besitzen, unterscheiden sich voneinander, so dass die Emissionen von verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen (FL-1 bis FL-4) erfasst werden können.

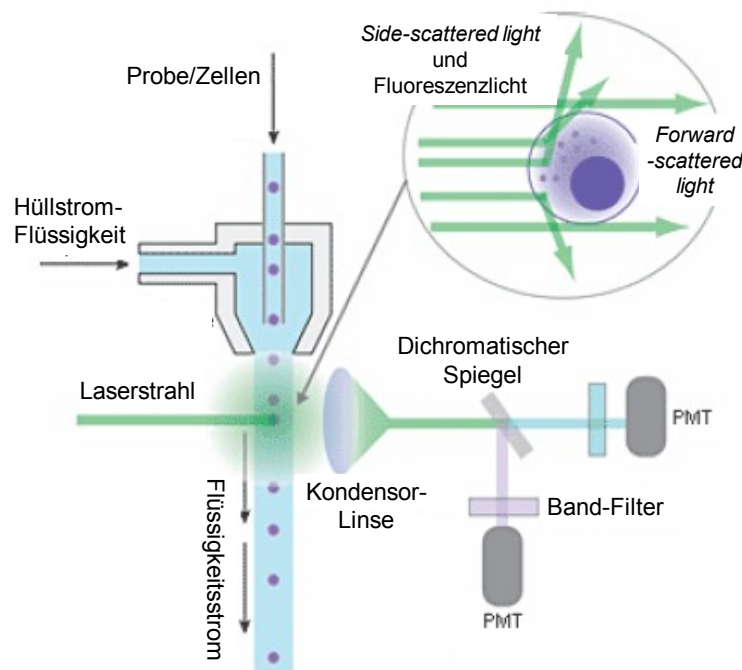


Abbildung 3.6 **Prinzip der Durchflusszytometrie (ReproCELL Incorporated, Japan)**. Während der durchflusszytometrischen Messung werden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch den Strahl eines Lasers geführt. Die Zellen lenken das einfallende Laser-Licht ab, es kommt zur Lichtstreuung. Das Seitwärtsstreuung (*Side-scattered light*) ist das Licht, das von extra- und intrazellulären Strukturen der Zelle gebrochen und reflektiert wird. Das Vorwärtsstreuung (*Forward-scattered light*) ist das Licht, das aufgrund der Größe der Zellen gebeugt wird und ist proportional zur Zellgröße. Der/die verwendete/n Laser regt/regen auch die spezifischen Fluoreszenzmoleküle auf den Zellen an. Das von den Zellen abgestrahlte Fluoreszenzlicht, sowie *Side-scattered* und *Forward-scattered light* werden durch Linsen, Spiegel und Filter-Systeme an die extrem empfindlichen Detektoren (*Photomultiplier*, PMT) des elektronischen Systems geleitet.

3.6.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Jeweils $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden in eine *96-well* Rundbodenplatte transferiert und zentrifugiert (460 g, 4 °C, 6 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 50 µl Cellwash® resuspendiert, welchem $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Fcy III/II Rezeptor zugegeben wurde, um die spätere unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Die Inkubationszeit des sogenannten „Blockens“ betrug 6 min und wurde bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung der spezifischen Oberflächenmoleküle durch die Zugabe der

entsprechend austitrierten Mengen an Antikörpern oder Isotyp-Kontrollen (s. Tabelle 2.5) in einem Volumen von 50 µl Cellwash[®]. Nach Inkubation von 15 min bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Cellwash[®] gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellsediment wurde in 200 µl Cellwash[®] resuspendiert. Färbungen, für die ein biotinylierter Antikörper verwendet wurde, enthielten einen weiteren Inkubationsschritt (10 min, 4 °C im Dunkeln) mit PerCPCy5.5-konjugiertem Streptavidin, das an das Biotin bindet. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte nach Transfer der Zellen in 5 ml Rundbodenröhrchen, in denen vorher 50 µl Cellwash[®] vorgelegt worden waren, mit einem FACSCalibur[™]. Zur Auswertung wurde das Programm *Cell QuestPro* (BD Biosciences) verwendet.

3.6.2 Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , IL-12p40 und Foxp3

Die Zellen, deren Zytokinproduktion intrazellulär nachgewiesen werden sollte, wurden in den letzten 6 h der Kultur mit 0,66 µL mL⁻¹ Monensin inkubiert. Bei Monensin handelt es sich um Inhibitor, der die intrazellulären Protein-Transport Vorgänge blockiert, so dass sich die von den Zellen produzierten Zytokine in den Golgi-Komplexen ansammeln. Dadurch kann bei der durchflusszytometrischen Analyse die Zytokinproduktion der Zellen besser detektiert werden. Jeweils 1-2 x 10⁶ Zellen wurden zunächst für ihre Oberflächenmarker gefärbt und nach dem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 150 µl Cytofix/Cytoperm[®] inkubiert. Das enthaltene Paraformaldehyd dient hierbei der Fixierung der Zellen und Saponin der Permeabilisierung der Zellmembranen. Nach Zentrifugation der Zellen (460 g, 6 min, 4 °C) folgte ein Waschschrift mit Permeabilisierungspuffer, welcher ebenfalls Saponin enthält. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C im Dunkeln mit den entsprechenden Antikörpern für IL-12p40 oder IFN- γ , die in einem Volumen von 50 µl Permeabilisierungspuffer zugegeben wurden, inkubiert. Nach Waschen mit Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in 250 µl Cellwash[®] aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Zum Nachweis von intrazellulärem Foxp3 wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal mit Cellwash[®] gewaschen, zentrifugiert (460 g, 6 min, 4 °C) und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers mit dem *Foxp3-stainig Set* fixiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen mit 0,5 µl Foxp3-Antikörper für 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Permeabilisierungspuffer und anschließendem Waschen mit Cellwash[®] wurden die Zellen in 250 µl Cellwash[®] resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.6.3 CFSE-Markierung von Zellen

Um BMDC für in vivo-Untersuchungen zu markieren, wurden die Zellen vor der Injektion in Versuchstiere mit *Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester* (CFDA-SE) markiert. Bei CFDA-SE handelt es sich um ein nicht-fluoreszierendes membrangängiges Fluorescein-Derivat, welches innerhalb von Zellen durch Abspaltung von Acetat-Gruppen durch zelluläre Esterasen modifiziert werden kann. Dabei entsteht ein fluoreszierendes Molekül (CFSE), das die Zellen nicht mehr so schnell über die Membran verlassen kann. Die Succinimidylester des entstehenden CFSE binden im Inneren der Zellen an freie Amine, zum Beispiel Aminogruppen von Proteinen. So werden langlebige fluoreszierende Produkte gebildet (s. Abbildung 3.7). Zur Markierung der BMDC wurde das *Vybrant CFDA SE CellTracerKit* verwendet. Die BMDC wurden in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt, zentrifugiert (460g, 6 min, 4 °C) und in 1 ml vorgewärmtem PBS pro 10-15x10⁶ Zellen aufgenommen. Das CFDA-SE wurde in einer Konzentration von 0,5 µM zugegeben. Nach sorgfältiger Vermischung der

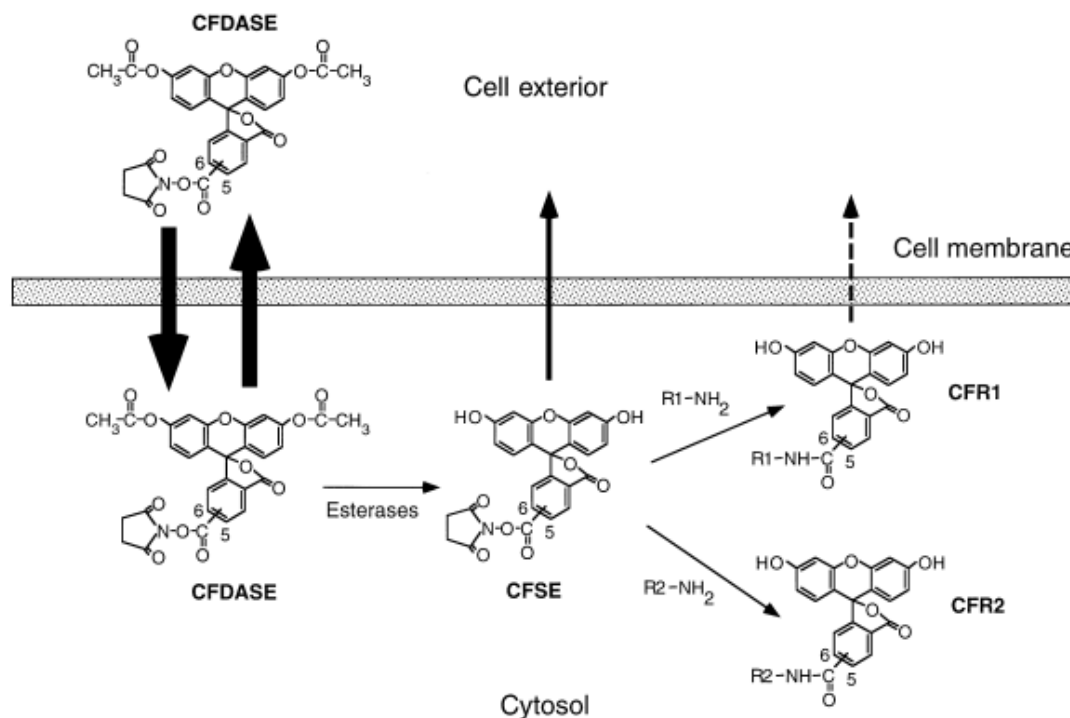


Abbildung 3.7 **Prinzip des Mechanismus der CFSE-Markierung von Zellen (modifiziert nach [123])**. Das nicht fluoreszierende Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester (CFDA SE) ist ein lipophiles Molekül, das die Zellmembran durchdringen kann. Intrazelluläre Esterasen können das CFDA SE spalten und das fluoreszierende Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) entstehen lassen. Dieses ist weniger membrangängig. Der Succinimidylrest des CFSE ist stark reaktiv mit Aminogruppen und kann das 5-(6) Carboxyfluorescein (CF) kovalent mit intrazellulären Proteinen verbinden. Ein Teil der entstehenden Konjugate kann schnell wieder abgebaut werden, oder membrangängig sein, während ein anderer Teil langlebig ist und die Zelle nicht verlassen kann, so dass eine stabile Fluoreszenz-Markierung der Zelle entsteht.

Zellen mit dem CFDA-SE folgte eine Inkubation der Zellen für 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (460 g, 6 min, 4 °C) und das Zellsediment wurde in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für

30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Diese Inkubation diente der Entfernung von CFDA, das von den Zellen möglicherweise wieder freigesetzt wird. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellen, welche im Anschluss daran in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt wurden. Die vom CFSE emittierte Fluoreszenz kann mittels einer durchflusszytometrischen Messung bestimmt werden, da es ein ähnliches Emissionsspektrum wie der Fluoreszenz-Farbstoff FITC besitzt und somit im selben Messkanal (FL-1) detektiert werden kann.

3.7 Nachweis von löslichen Molekülen in Zellkultur-Überständen und Lungenhomogenisaten

3.7.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung wurde verwendet, um die Lungenhomogenisate zu analysieren, und die Zytokinkonzentrationen in den Lungen auf eine Proteinmenge normieren zu können.

Der Proteinnachweis nach *LOWRY* [94] beruht auf der Reduktion von Kupfer (II) zu Kupfer (I) durch Proteine in alkalischer Umgebung und die anschließende Reaktion des Kupfer (I) mit der sogenannten Folin-Reagenz. Während des ersten Schritts bildet ein Kupfer (II)-Ion mit vier Peptid-N-Atomen der Peptidbindungen der Proteine in einem alkalischen Milieu einen hellblauen Chelatkomplex. Im zweiten Schritt reagiert der reduzierend wirkende Kupfer-Protein Komplex mit einer Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz (Folin-Reagenz), wodurch die in der Folin-Reagenz enthaltenen Heteropolysäuren Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure in Gegenwart von Lithiumsulfat zu Molybdänblau bzw. Wolframblau reduziert werden. Neben den Kupfer-Protein-Komplexen können auch die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan direkt das Folin-Reagenz reduzieren. Es erfolgt ein Farbumschlag der Folin-Reagenz von gelb nach blau und die blauen Produkte können bei einer Wellenlänge von 750 nm, 650 nm oder 540 nm photometrisch bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Proteinmengen in den Lungenhomogenisaten wurden die *Protein Assay Reagents A, B* und *S* des *DC™ Protein Assays* von Bio-Rad verwendet. Als Standard diente eine *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Lösung (2 mg mL⁻¹), die zur Herstellung einer Standardreihe mit PBS seriell verdünnt wurde. Auf eine 96 well-Flachbodenplatte wurden je 5 µl der entsprechend mit PBS verdünnten Lungenhomogenisate oder des Standards in Doppelbestimmungen aufgetragen. Es folgte die Zugabe von 25 µl des *Protein Assay Reagents A* (eine alkalische Kupfer(II)-tartrat-Lösung) und 0,5 µl des *Protein Assay Reagents S* (ein Tensid, falls Detergenzien in den Proben enthalten waren) zu jeder Probe bzw. des Standards. Zum Abschluss wurden je 200 µl des *Protein Assay Reagents B* (Folin-Reagenz) zugefügt und die Farbentwicklung wurde nach 15 min mittels eines Mikroplatten-Absorptionsreaders bei 660 nm gemessen.

3.7.2 Nachweis verschiedener Zytokine mittels *Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)*

Es wurden verschiedene *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)* DuoSets (s. Tabelle 2.4) nach Herstellerangaben verwendet, um Zytokine in Zellkulturüberständen und Lungenhomogenisaten quantitativ nachzuweisen. Bei den hier angewendeten ELISA-Methoden handelte es sich um so genannte *Sandwich-ELISA*. Bei diesem Verfahren wird zuerst ein monoklonaler Antikörper (Primärantikörper) auf dem Boden einer 96 well-Flachboden-Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach der Entfernung von überschüssigem Primärantikörper durch Waschen werden alle noch unbeschichteten Flächen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte durch Zugabe einer Lösung aus verdünntem Serum (zum Beispiel FCS) geblockt. Dies dient dazu, spätere unerwünschte Adsorptionen aus den zu testenden Zellkulturüberständen an den Plattenboden zu verhindern. Im Anschluss an einen erneuten Waschschrift folgt die Inkubation der Probe mit den nachzuweisenden Antigenen. Während der Inkubation binden die Antigene an den immobilisierten Primärantikörper. Um die Komplexe aus den immobilisierten Primärantikörpern und den Antigenen aus den Zellkulturproben zu detektieren, werden in einer anschließenden Inkubation polyklonale, gegen den Primärantikörper gerichtete und Biotin-konjugierte Antikörper zugefügt. So sind die Antigene zwischen den Primär- und Detektionsantikörpern wie in einem *Sandwich* komplexiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden Antikörper zugegeben, die mit einem Enzym, hier die *Horseradish-Peroxidase (HRP)*, konjugiert sind. Diese binden an die Detektionsantikörper und setzen ein zugegebenes Substrat (aus Tetramethylbenzidin, TMB) zu gefärbten Produkten um. Die Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure stoppt den Substratumsatz durch das Enzym und durch die photometrische Bestimmung mit einem *Absorptions-Reader* können dann unter Bezug auf eine Standardkurve quantitative Aussagen über die Menge an Antigenen getroffen werden.

Bei der Durchführung des TGF- β -ELISA musste das TGF- β in den zu analysierenden Überständen aus den Zellkulturen vor dem Auftrag auf die Mikrotiterplatte durch Säure aktiviert werden. Dazu wurden je 100 μ l der Überstände mit 20 μ l einer 1 N HCl-Lösung versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 20 μ l 1 N NaOH zugefügt. Der TGF- β -Standard benötigte keine Aktivierung

3.7.3 Zytokinnachweis mittels *Cytometric Bead Array (CBA)*

Der *Cytometric Bead Array (CBA)* wurde nach Herstellerangaben verwendet, um mehrere Zytokine gleichzeitig in einem geringen Volumen an Zellkulturüberständen zu detektieren. Hierfür wurden 25 μ l der zu untersuchenden Zellkulturüberstände oder eines im Lieferumfang des Test-Kits enthaltenen Standards in 96 well-Rundbodenplatten zunächst für 1 h mit 25 μ l einer Mischung aus verschiedenen *MicroBeads* inkubiert. Die *MicroBeads* (oder

CaptureBeads) besitzen eine definierte Fluoreszenz-Intensität und sind mit einem *Capture*-Antikörper gekoppelt, der spezifisch für ein einzelnes zu analysierendes Molekül (z. B. ein Zytokin) ist. Es wurden *CaptureBeads* für IL-12p70, TNF- α , IL-4, IL-13 und IL-10 verwendet. In einer zweiten, ebenfalls 1 h dauernden, Inkubation wurden dann 25 μ l eine Antikörpermischung (*Detection-Antikörper*) zugefügt. Die *Detection-Antikörper* können auch spezifisch an die zu analysierenden Moleküle der Probe binden und sind zusätzlich mit dem Reporter-Molekül PE (Phycoerythrin) konjugiert, so dass die *Beads* nach einem Waschschriff mit einem Durchflusszytometer analysiert werden können. Mit Hilfe der entsprechenden FCAP Array™ Software (Soft Flow Hungary Ltd.) kann für jede spezifische *Bead*-Population (IL-12p70, TNF- α und IL-10) der Median der Fluoreszenz-Intensität (*median fluorescence intensity*, MFI) bestimmt werden. Dieser MFI-Wert wird mit zunehmender Bindung des zu analysierenden Moleküls und der damit verbundenen PE-konjugierten *Detection*-Antikörper größer. Durch die Generierung einer Standard-Kurve kann so die Konzentration an Zytokinen in den zu untersuchenden Proben quantifiziert werden (s. Abbildung 3.8).

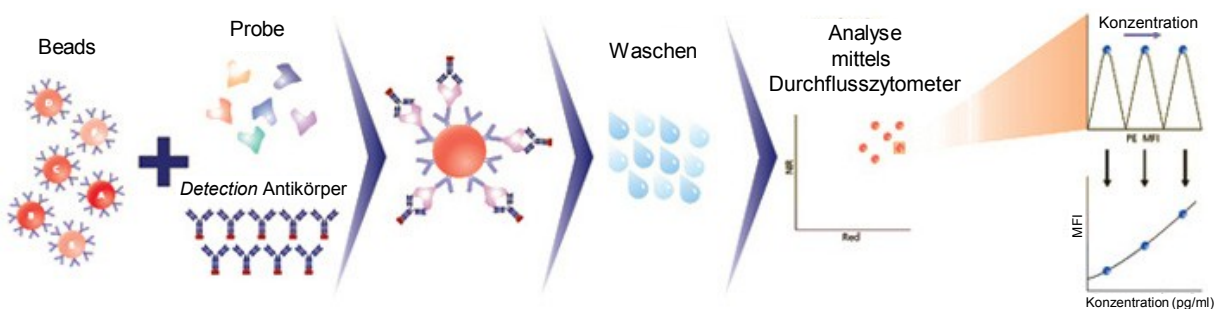


Abbildung 3.8 **Prinzip des Cytometric Bead Array (BD, Biosciences 2011)**. Die zu untersuchende Probe wird mit definierten *Capture*-Antikörper gekoppelten *MicroBeads* und PE-markierten *Detection* Antikörpern inkubiert. Hierbei binden die *MicroBeads* über die *Capture*-Antikörper spezifisch die Zytokine in der Probe. An die Zytokine wiederum binden die *Detection*-Antikörper. Die Fluoreszenz der PE-markierten *Detection*-Antikörper kann nach einem Waschschriff mittels Durchflusszytometrie gemessen werden und ist proportional zur Menge an Zytokinen in der Probe.

3.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 4.0. Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Allgemeinen dargestellt als die Mittelwerte in Kombination mit der Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den Sham- und CLP-Gruppen wurden mit einem gepaarten oder ungepaarten *student t Test* untersucht. Im Falle einer größeren Abweichung der Einzelwerte der Ergebnisse wurde ein Median angezeigt und die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des *Wilcoxon Test*, wenn gepaarte Werte verglichen wurden. Die Daten über die Zytokine in den Lungen nach *P. aeruginosa* Infektion wurden zum Teil normalisiert auf den Mittelwert der Sham-Gruppe für jedes Experiment und anschließend

statistisch analysiert. Die Darstellung der bakteriellen Beladung und der Zytokine der Lungen erfolgte als eine Punktwolke, die die Streuung der einzelnen Messwerte veranschaulicht und den Median beinhaltet. Hier wurden die Daten mit Hilfe des nicht-parametrischen *Mann Whitney U-Tests*, oder einem *one-way ANOVA* Test analysiert. Für den Vergleich der Daten von mehreren Versuchsgruppen wurde ein *one-way ANOVA* Test gefolgt von einem *Newman-Keuls* Test verwendet. Generell wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

Wie bereits bekannt ist, kommt es während einer polymikrobiellen, d. h. durch verschiedene bakterielle Pathogene verursachte, Sepsis zu einer Immunsuppression. Innerhalb der akuten Phase der Sepsis entwickeln DC eine Dysfunktion, die durch eine abnormale Reaktivität gegenüber bakteriellen Stimuli und durch eine verminderte Fähigkeit zur TH1-Polarisierung von T-Zellen deutlich wird. Selbst nach Überstehen einer Sepsis bleibt eine höhere Anfälligkeit für Infekte erhalten, die auf eine Dysfunktion von DC zurückzuführen ist. Dies lässt vermuten, dass eine Sepsis sich auf die Differenzierung von DC im Knochenmark auswirkt.

Zunächst wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit überprüft, in welchem Umfang die induzierte subletale Sepsis zu einer Immunsuppression führt. Dafür wurde das bereits bekannte Modell der Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* als Sekundärinfektion nach polymikrobieller Sepsis angewendet. Weiterhin wurden zur Analyse der Dysfunktion von DC die direkten Auswirkungen der induzierten subletalen Sepsis auf die DC in verschiedenen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen betrachtet. Um die Beteiligung von DC aus dem Knochenmark, welches die Vorläuferzellen für die DC enthält, an einer Immunsuppression zu untersuchen, wurden nach der Charakterisierung des Knochenmarks (u. a. die Zellzusammensetzung) DC aus den Vorläuferzellen des Knochenmarks generiert. Diese wurden in Bezug auf ihre Differenzierung, ihre Fähigkeit zur TH-Aktivierung und weitere Funktionsmerkmale analysiert.

4.1 Charakterisierung der Immunsuppression nach Sepsis

Von früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Induktion einer Sepsis mittels CLP-Modell zu einer erhöhten Anfälligkeit der septischen Versuchstiere für eine sekundäre Lungeninfektion, u. a. mit *P. aeruginosa*, führt. Dies wird durch eine höhere Sterblichkeit der CLP-Tiere, die mit einer verminderten Fähigkeit zur Bekämpfung der Bakterien in den Lungen einhergeht, deutlich. Weiterhin induziert die *P. aeruginosa* Infektion eine erhöhte Produktion von IL-10 in den Lungen der septischen Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren [160]. Gleichzeitig sinkt nach *P. aeruginosa* Infektion die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 oder IL-12 in den Lungen der CLP-Tiere verglichen mit den Sham-Kontrollen. So wird davon ausgegangen, dass das Immunsystem nach einer Sepsis beeinträchtigt ist und die Infektion mit sekundär infektiösen Erregern begünstigt wird [111, 160].

Die Auswirkungen der subletalen Sepsis auf die Abwehr einer sekundären Infektion mit *P. aeruginosa* 4 Tage nach der Sepsis-Induktion durch CLP wurden durch die Sepsis-induzierten Veränderungen in der Lunge bezüglich zellulärer Zusammensetzung und Zytokin-Expression näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die subletale Sepsis zu einer

starken Granulozyten-Infiltration in die Lungen der CLP-Tiere im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe führte (s. Abbildung 4.1 A). So enthielten die Lungen in Folge der Sepsis ungefähr die 4-fache Menge an Granulozyten im Vergleich zu den Lungen der Sham-Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu verringerte sich nach Sepsis in den Lungen die absolute Zahl an T-Zellen und NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe um die Hälfte (s. Abbildung 4.1 B und C). Besonders Granulozyten und NK-Zellen kommt eine entscheidende Funktion bei der Beseitigung von *P. aeruginosa* in der Lunge zu [83, 184], so dass eine Veränderung in ihrer Anzahl vor der *P. aeruginosa* Applikation einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben kann. Die Lungen der septischen Mäuse enthielten 4 Tage nach der Sepsis-Induktion keine Bakterien der primären CLP mehr, so dass hierdurch kein Einfluss auf die sekundäre Infektion stattfand.

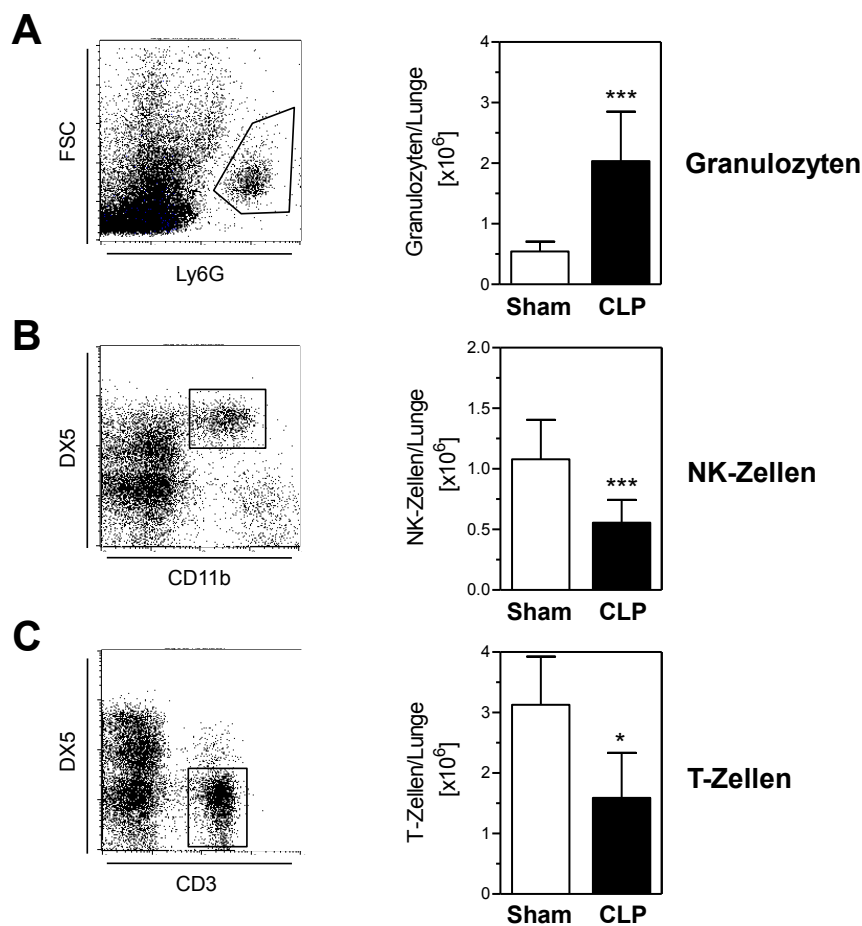


Abbildung 4.1 **Zellzusammensetzung der Lungen nach Sepsis**. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Lungenzellen der Sham- (offene Rechtecke) und CLP- (schwarze Rechtecke) operierten Mäuse (3-4 Mäuse pro Gruppe) gewonnen und gezählt. Anschließend wurden die Lungenzellen mit Antikörpern gegen Ly6G, CD3, CD11b und DX5 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist die Gating-Strategie zur Bestimmung des Anteils an (A) Granulozyten (Ly6G^+), (B) NK-Zellen ($\text{CD11b}^+ \text{DX5}^+$) und (C) T-Zellen ($\text{CD3}^+ \text{DX5}^+$). Hieraus und aus der Gesamtzahl an Lungenzellen wurde die absolute Zahl der Zellen pro Lunge berechnet. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der absoluten Zellzahlen pro Lunge für $n = 9 - 20$ Mäuse, gepoolt aus 3-5 Versuchen mit 3 bis 4 Mäusen. Die Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des gepaarten „*student t-Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

Um eine Immunsuppression nach Sepsis nachzuweisen, wurden Sham- und CLP-Tiere 4 Tage nach Operation mit einer nicht-letalen Menge an *P. aeruginosa* i.n. infiziert. Die Analyse der Lungen nach der *P. aeruginosa* Infektion zeigte, dass die Induktion einer subletalen Sepsis in den Lungen, im Vergleich zu den Sham-Tieren, zu einer höheren bakteriellen Beladung mit dem Pathogen führte (s. Abbildung 4.2 A).

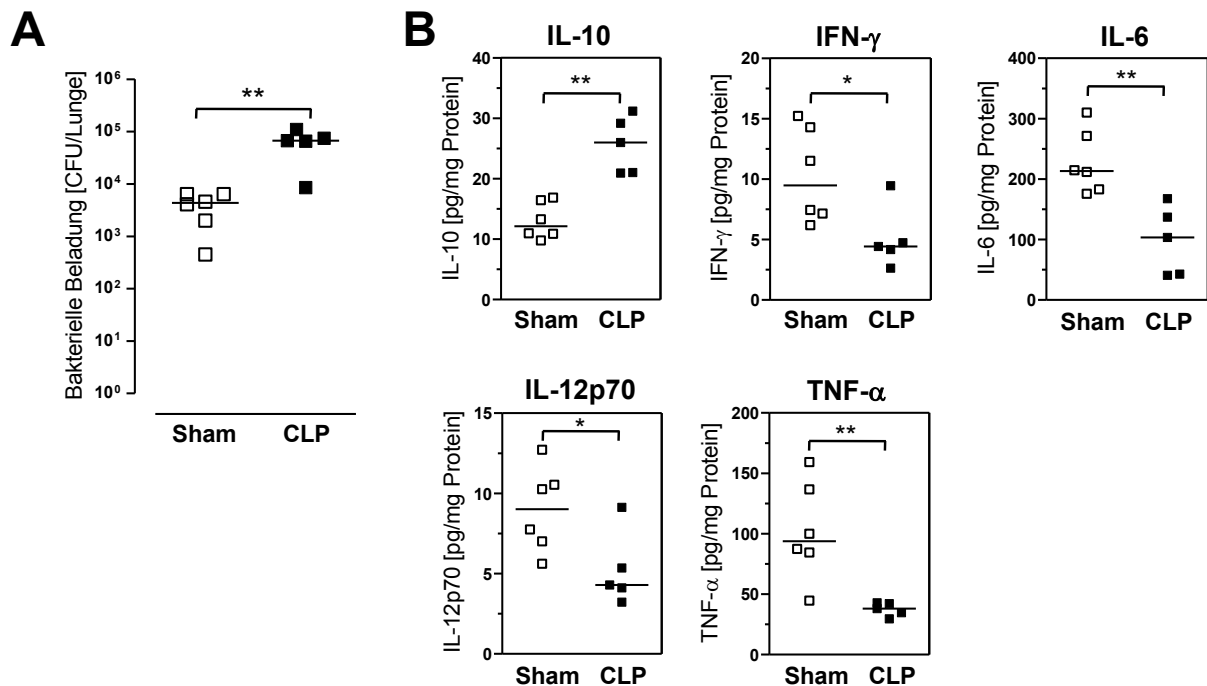


Abbildung 4.2 **Charakterisierung der Lungen nach sekundärer *P. aeruginosa* Infektion.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Sham- (offene Quadrate) und CLP- (schwarze Quadrate) operierten Mäuse (5-6 Mäuse pro Gruppe) i.n. mit 2×10^8 *P. aeruginosa* infiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Infektion wurden die Lungen entnommen und homogenisiert. (A) Ein Teil der Homogenisate wurde nach Saponin-Verdau zur Bestimmung der bakteriellen Beladung verwendet. (B) Der Rest der Homogenisate wurde zentrifugiert, einer Proteinbestimmung unterzogen und mittels ELISA wurden die Zytokine quantifiziert. Dargestellt sind die Bakterien pro Lunge (A) und die Zytokinmengen pro Lunge normiert auf die Proteinmenge (B) für jedes einzelne Versuchstier. Horizontale Linien zeigen den Median an. Die Ergebnisse sind Daten eines Experiments, das repräsentativ für 3 Experimente ist. Die Unterschiede zwischen den CLP-Tieren und den Sham-Tieren wurden mit Hilfe des „Mann Whitney U-Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dies korrelierte mit einem veränderten Zytokinprofil in den Lungen der septischen Tiere nach *P. aeruginosa* Infektion. Die Lungen-Homogenisate der Sham-Tiere enthielten als Folge der *P. aeruginosa* Infektion relativ hohe Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-12p70. Auch IFN- γ , eine Zytokin, welches nach *P. aeruginosa* Infektion in Lungen hauptsächlich durch NK-Zellen sekretiert wird [184], war in den Lungen der Sham-Tiere in großer Menge vorhanden (s. Abbildung 4.2 B). Im Gegensatz dazu enthielten die Lungen-Homogenisate der septischen Tiere eine signifikant geringere Menge an IL-6, IFN- γ , TNF- α und IL-12p70. Die Menge an anti-inflammatorischem IL-10 war in den Lungen der

CLP-Versuchstiere jedoch mehr als doppelt so hoch wie die IL-10-Level in den Lungen der Sham-Tiere (s. Abbildung 4.2 B).

In einem anderen Versuchsansatz wurden die Lungenzellen der Sham- und CLP-Versuchstiere gewonnen und in einer *in vitro* Kultur mit UV-inaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert. Hierdurch war es möglich, mittels intrazellulärer Färbung Hinweise auf die Zellpopulationen zu erhalten, welche für das abweichende Zytokinprofil in den Lungen nach sekundärer Infektion verantwortlich waren. Um festzustellen, ob das *in vitro* Modell mit der *in vivo* *P. aeruginosa* Infektion zu vergleichen ist, wurden zunächst die Zytokine in den Zellkulturüberständen der Lungenzellen quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass, vergleichbar mit der *in vivo* Situation, die Lungenzellen der CLP-Tiere nach *in vitro* Stimulation mit *P. aeruginosa* weniger IL-6, IFN- γ und TNF- α produzierten im Vergleich zu den Lungenzellen der Sham-Tiere (s. Abbildung 4.3 A, C und D).

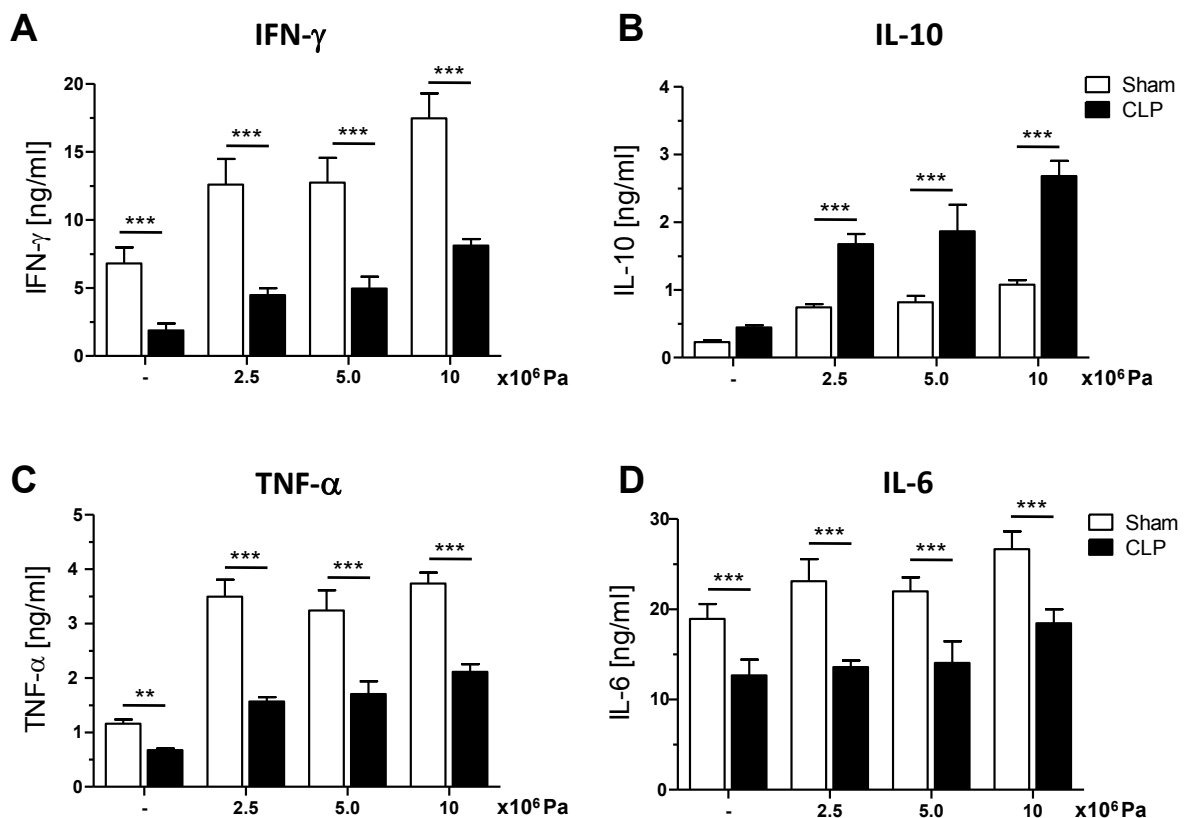


Abbildung 4.3 **Zytokinproduktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach *P. aeruginosa* Stimulation *in vitro*.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Lungenzellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse (3-4 Mäuse pro Gruppe) gewonnen und für 18 bis 22 h *in vitro* in An- bzw. Abwesenheit von 2.5 - 10.0 x 10⁶ UV-inaktivierten *P. aeruginosa* (Pa) und rmlL-2 (3 ng mL⁻¹) kultiviert. Mittels ELISA wurde die Produktion von (A) IFN- γ , (B) IL-10 (C) TNF- α und (D) IL-6 in den Zellkulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Quadruplikat-Ansätzen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente. Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Parallel dazu war die Menge an IL-10 in den Zellkulturüberständen der CLP-Lungenzellen signifikant erhöht verglichen mit den Überständen der Lungenzellen der Sham-Tiere (s. Abbildung 4.3 B). Die Menge an IL-12p70 wurde auch für die Überstände bestimmt. Eine Abbildung dazu wird jedoch erst im Zusammenhang mit den DC in der Lunge gezeigt (s. Abschnitt 4.2).

Die intrazelluläre Färbung der Lungenzellen nach *P. aeruginosa* Stimulation *in vitro* zeigte, dass die CD11b⁺ DX5⁺ NK-Zellen die Hauptquelle für IFN- γ waren (s. Abbildung 4.4). Die intrazelluläre IFN- γ -Produktion der NK-Zellen aus den Lungen der CLP-Tiere war, verglichen mit den NK-Zellen aus den Lungen der Sham-Tiere, deutlich geringer (s. Abbildung 4.4 B). Dies konnte nicht nur nach Stimulation der Lungenzellen mit *P. aeruginosa* beobachtet werden, sondern auch die unstimulierten NK-Zellen aus den Lungen der CLP-Tiere produzierten weniger IFN- γ als die NK-Zellen aus den Lungen der Sham-Tiere (s. Medium-Werte der IFN- γ -Produktion in Abbildung 4.4 B und C). Die verringerte IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen aus den Lungen der CLP-Tiere war vergleichbar zur geringen IFN- γ -Menge in den Zellkulturüberständen der Lungenzellen der CLP-Tiere (s. Abbildung 4.3 A). Dass die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen aus den Lungen der CLP-Tiere nach *P. aeruginosa* Stimulation signifikant verringert war im Vergleich zu den NK-Zellen aus den Lungen der Sham-Kontrolltiere, zeigt Abbildung 4.4 C. Hier wird deutlich, dass nach Kultivierung der Lungenzellen mit *P. aeruginosa* der Anteil der IFN- γ -produzierenden NK-Zellen in den Lungen der Sham-Tiere mehr als doppelt so groß ist im Vergleich zu den NK-Zellen aus den Lungen der septischen Versuchstiere (s. Abbildung 4.4 C). Die Herkunft des IL-10 konnte nicht bestimmt werden, da eine intrazelluläre Färbung von IL-10 nicht möglich war.

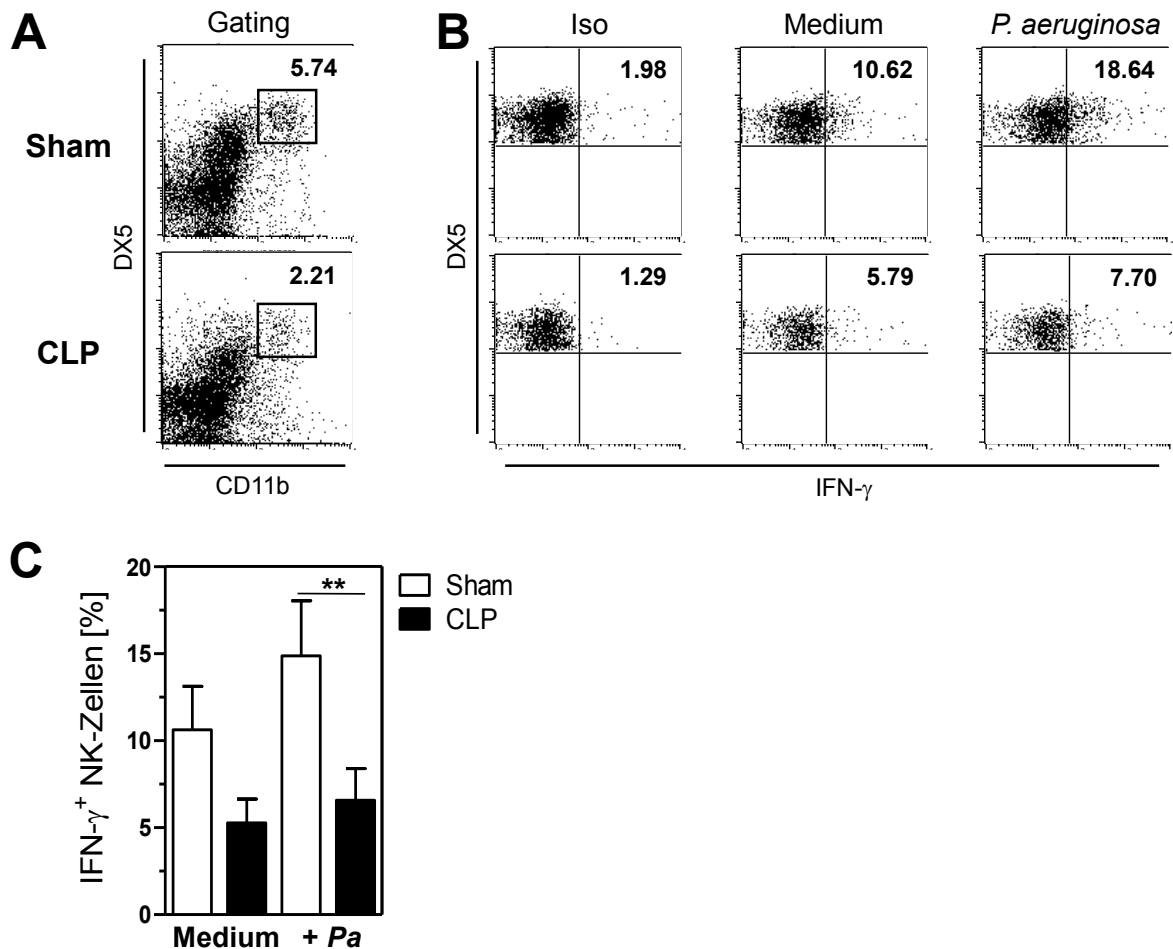


Abbildung 4.4 **Intrazelluläre IFN- γ Produktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach *P. aeruginosa* Stimulation *in vitro*.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Lungenzellen der Sham- und CLP-operierten Mäuse (3-4 Mäuse pro Gruppe) gewonnen und für 18 bis 22 h *in vitro* in An- bzw. Abwesenheit von 5×10^6 UV-inaktivierten *P. aeruginosa* und rML-2 (3 ng mL^{-1}) kultiviert. Anschließend erfolgte, nach einer Inkubation der Zellen mit Monensin, die Färbung mit Antikörpern gegen CD11b, DX5 und IFN- γ . Mittels Durchflusszytometrie wurde die intrazelluläre IFN- γ Sekretion der NK-Zellen (CD11b⁺ DX5⁺) bestimmt. Dargestellt ist (A) die Gating-Strategie und (B) die IFN- γ Produktion der NK-Zellen. Hier bezeichnen die Zahlen den Prozentsatz der IFN- γ ⁺-Zellen. Die Grenze für IFN- γ ⁺ Zellen wurde mittels Isotyp festgelegt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente. (C) Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der IFN- γ -Produktion der NK-Zellen aus 3 Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** p < 0,01.

Bei der Anwendung des *P. aeruginosa* Infektionsmodells konnte für die subletale Sepsis eine Immunsuppression der CLP-Tiere festgestellt werden. Diese war gekennzeichnet durch die verminderte Fähigkeit der CLP-Tiere die applizierten Bakterien in den Lungen zu eliminieren. Weiterhin produzierten die Lungenzellen der CLP-Tiere vermehrt das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 im Vergleich zu den Lungenzellen der Sham-Kontrolltiere. Die NK-Zellen der Lungen der septischen Tiere sekretierten dagegen nur geringe Mengen an IFN- γ verglichen mit den NK-Zellen aus den Lungen der Sham-Tiere.

4.2 Dysfunktion von DC in der Lunge

Neben den bereits beschriebenen Änderungen der Zellzusammensetzung und einem veränderten Zytokinprofil in den Lungen septischer Versuchstiere, hatte die Induktion einer subletalen Sepsis auch Auswirkungen auf die DC in der Lunge.

Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, führte die Sepsis-Induktion zu einem signifikanten Verlust des prozentualen Anteils an DC in den Lungen der septischen Versuchstiere. Während die Lungen der Sham-operierten Tiere etwa 2 - 3,5 % DC enthielten, war der prozentuale Anteil der DC in den Lungen der CLP-Tiere mit 0,7 - 2 % deutlich geringer (s. Abbildung 4.5 B). Die absolute Menge an DC in den Lungen der CLP-Tiere war ebenfalls deutlich geringer verglichen mit der Menge an DC in den Lungen der Sham-Tiere, so dass die Lungen nach Sepsis-Induktion nur noch etwa die Hälfte an DC enthielten (s. Abbildung 4.5 C).

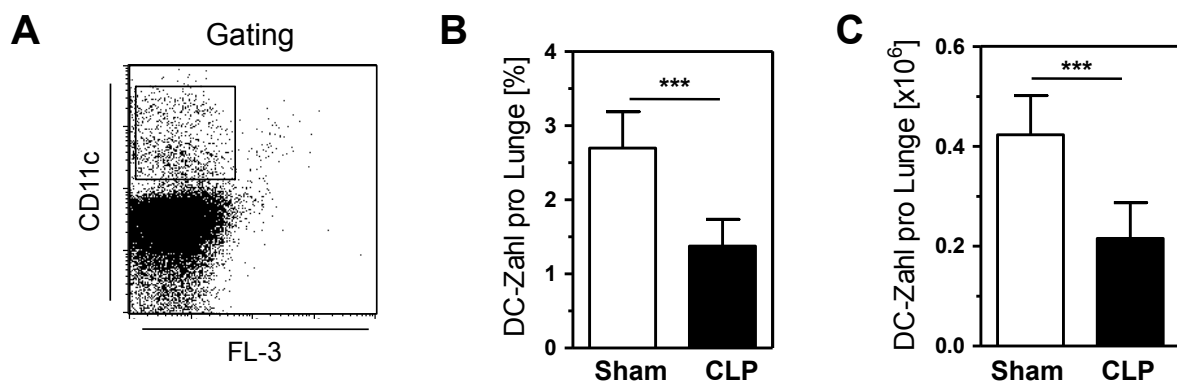


Abbildung 4.5 **Zahl der DC in der Lunge während Sepsis.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Zellen aus den Lungen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse isoliert (aus 3-4 Mäusen pro Gruppe) und gezählt. Anschließend wurden die Lungenzellen mit Antikörpern gegen CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die absolute Zahl an CD11c⁺ DC pro Lunge wurde aus dem Prozentsatz an CD11c⁺ und der Gesamtzahl an Lungenzellen berechnet. Dargestellt ist (A) die Gating-Strategie und (B) der prozentuale Anteil an CD11c⁺ DC, sowie (C) die Mittelwerte und die Standardabweichungen der DC-Zahlen pro Lunge für 3-4 Mäuse pro Gruppe aus 4 Experimenten. Die Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** p < 0,001.

Bezüglich der Fähigkeit der Lungenzellen der Sham- und CLP-Tiere unter Einfluss von *P. aeruginosa* Stimulation das pro-inflammatorische Zytokin IL-12 zu sekretieren, konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Nach *in vitro* Kultivierung der Lungenzellen mit *P. aeruginosa* produzierten die Lungenzellen der Sham-Tiere deutlich mehr IL-12p70 als die Lungenzellen der CLP-Tiere (s. Abbildung 4.6). Dies ist analog zu der Beobachtung, dass die Lungen-Homogenisate der CLP-Tiere nach *P. aeruginosa* Infektion *in vivo* deutlich weniger IL-12p70 enthielten als die Lungenhomogenisate der Sham-Kontrollen (s. Abbildung 4.2). Die Zellpopulation, welche die

Quelle des IL-12p70 darstellt, konnte nicht näher bestimmt werden, da eine intrazelluläre Färbung von IL-12p40/70 keine eindeutigen Ergebnisse lieferte.

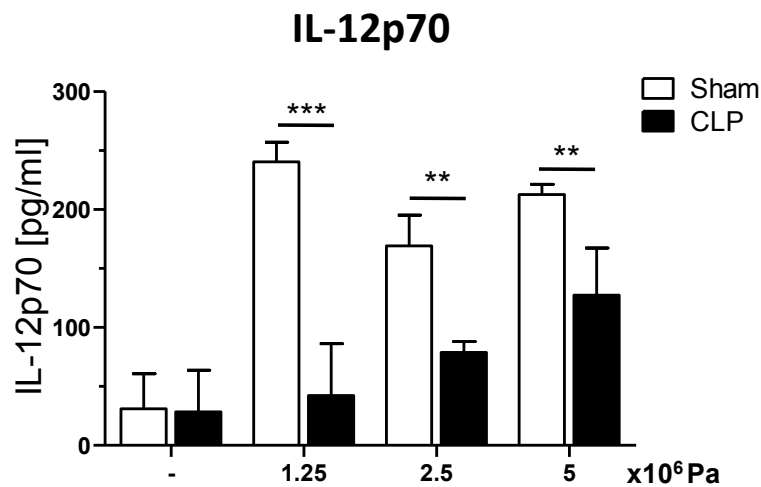


Abbildung 4.6 **IL-12p70-Produktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach *P. aeruginosa* Stimulation *in vitro*.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Lungenzellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse (3-4 Mäuse pro Gruppe) gewonnen und für 18 bis 22 h *in vitro* in An- bzw. Abwesenheit von 1.25 - 5.0 x 10⁶ UV-inaktivierten *P. aeruginosa* (Pa) und rIL-2 (3 ng mL⁻¹) kultiviert. Mittels ELISA wurde die Produktion von IL-12p70 in den Zellkulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Triplikat-Ansätzen eines Experiments. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente. Die Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** p < 0,05; *** p < 0,001.

Für die Lungen kann nach subletaler Sepsis demnach eine Reduktion des prozentualen Anteils an DC bei den CLP-Tieren verglichen mit der Sham-Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Zellen der Lungen der septischen Tiere produzieren zudem eine geringere Menge an IL-12p70.

4.3 Dysfunktion von DC in der Milz

Es wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die Zahl und Funktionen von DC in der Milz während einer schweren Sepsis innerhalb von 24 h beeinflusst werden. Neben einem Verlust von bestimmten Milz-spezifischen Subpopulationen der DC kommt es zu einer verstärkten Reifung und einem veränderten Zytokin-Sekretionsmuster bei den verbleibenden DC aus der Milz. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen durch die DC aus den Milzen von septischen Versuchstieren beeinträchtigt ist [55]. Ob nach subletaler Sepsis ein ähnlicher Effekt zu beobachten ist, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden.

Vier Tage nach der Induktion einer subletalen Sepsis wurden die Gesamt-Milzzellen präpariert und gezählt. Durchflusszytometrisch wurde der Prozentsatz der CD11c^{hi} Milzzellen

(s. Gating-Strategie Abbildung 4.7 A) bestimmt, um daraus die absolute Zahl der DC in den Milzen zu berechnen. Wie in Abbildung 4.7 B zu sehen ist, enthielten die Milzen der Sham-Tiere mehr als $1,5 \times 10^6$ DC, während in den Milzen der septischen Tiere nur $0,5 - 1,0 \times 10^6$ DC nachgewiesen werden konnten. Somit war die Zahl der DC in den Milzen der septischen Versuchstiere um 50 % reduziert im Vergleich zur Zahl der DC in den Sham-Kontrolltieren. Dass diese Reduktion der Gesamt-DC auf einen Verlust der $CD4^+CD8^-CD11c^+$ Subpopulation zurückzuführen ist, veranschaulicht Abbildung 4.7 C. Hier wird deutlich, dass es nach der subletalen Sepsis innerhalb der Population der DC zu einem Rückgang des prozentualen Anteils der $CD4^+CD8^-$ DC kam, während der Anteil der $CD4^-CD8^-$ DC zunahm.

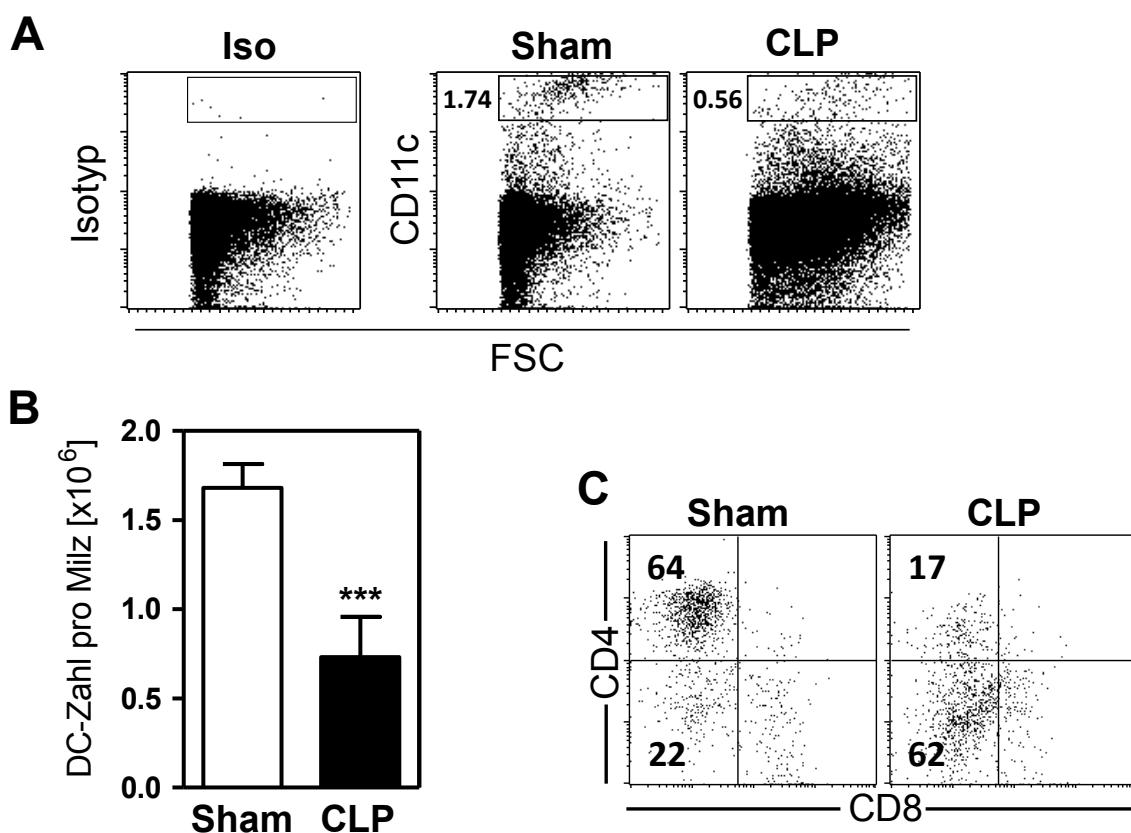


Abbildung 4.7 **Zahl und Phänotyp der DC in der Milz während Sepsis.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Zellen aus den Milzen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse isoliert (aus 3-4 Mäusen pro Gruppe) und gezählt. Anschließend wurden die Milzzellen mit Antikörpern gegen CD11c, in Kombination mit CD4 und CD8, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die absolute Zahl an $CD11c^{hi}$ DC pro Milz wurde aus dem Prozentsatz an $CD11c^{hi}$ und der Gesamtzahl an Milzzellen berechnet. Die Grenze für $CD11c^{hi}$ Zellen wurde mittels Isotyp festgelegt. Dargestellt ist die Gating-Strategie der $CD11c^{hi}$ DC (A) und die Mittelwerte und die Standardabweichungen der DC-Zahlen pro Milz für 3-4 Mäuse pro Gruppe (B), sowie die Expression von CD4 und CD8 auf den $CD11c^{hi}$ DC (C). Hier bezeichnen die Zahlen den Prozentsatz der $CD4^+CD8^-$ DC. Die Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des ungepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

Um die Reaktivität der Milz-DC auf bakterielle Stimulation zu überprüfen, wurden 4 Tage nach Sepsis-Induktion die DC mittels MACS-Technik aus den Milzen der Versuchstiere gewonnen und mit bakteriellen CpG Oligonukleotiden kultiviert. Die Reinheit der CD11c⁺ Milzzellen betrug im Durchschnitt 60 - 70 % (überprüft mittels Durchflusszytometrie). Nach Stimulation der DC mit CpG und Bestimmung der Zytokine in den Zellkulturüberständen mittels CBA zeigte sich, dass die DC aus den Milzen der CLP-Versuchstiere signifikant erhöhte Mengen an IL-10 produzierten im Vergleich zu den DC aus den Sham-Tieren (s. Abbildung 4.8 A). Die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α wurden von den DC aus den CLP-Tieren in geringerem Maße sekretiert als von den DC aus den Milzen der Sham-Tiere (s. Abbildung 4.8 B und C).

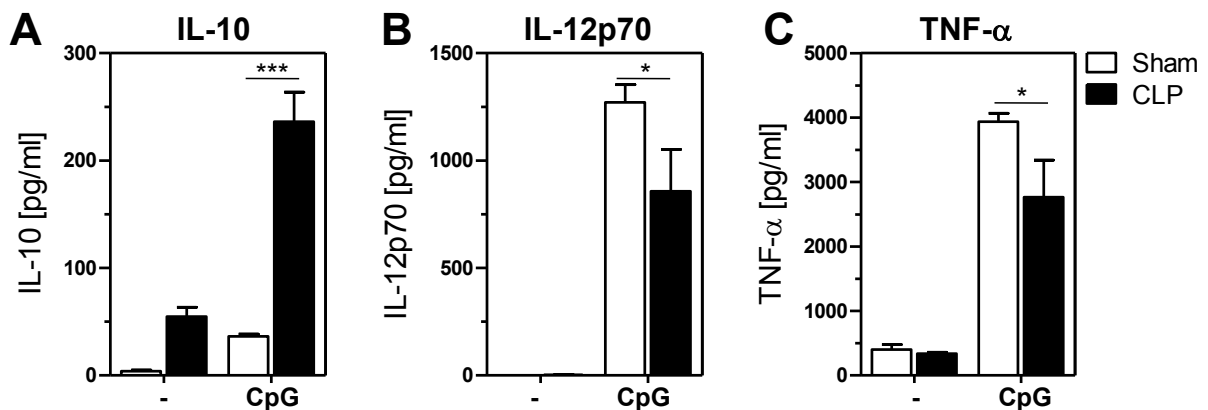


Abbildung 4.8 **Zytokinprofil der DC aus der Milz.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die CD11c⁺ Zellen (DC) aus den Milzen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse mittels MACS-Technik isoliert (aus 3-5 Mäusen pro Gruppe). Je 1×10^5 der Milz-DC wurden für 18 bis 22 h in An- bzw. Abwesenheit von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG kultiviert. Die Überstände der Zellkultur wurden mittels CBA auf die Anwesenheit von IL-10, IL-12p70 und TNF- α untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus den Triplikat-Ansätzen, welche repräsentativ für mindestens 3 Experimente sind. Die Unterschiede zwischen den CLP-Versuchstieren und den Sham-Kontrollen wurden mit Hilfe des ungepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Die verminderte IL-12-Produktion der Milz-DC aus den CLP-Mäusen konnte auch in einer intrazellulären Färbung von IL-12p40/70 nachgewiesen werden. Nach der Gewinnung der Milzzellen 4 Tage nach Sepsis-Induktion, wurden die Gesamt-Milzzellen aus den Sham- und CLP-Versuchstieren für 18 bis 22 h mit CpG kultiviert. Innerhalb der Population der CD11c⁺ Milzzellen (Milz-DC) aus den CLP-Tieren konnte man nach CpG-Stimulation einen deutlich geringeren Anteil an IL-12p40/70⁺ DC erkennen im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 4.9 A). Bezüglich der Expression costimulatorischer Moleküle auf den DC nach CpG-Stimulation konnte man keinen Unterschied zwischen den DC aus den Milzen der CLP- und Sham-Tiere erkennen (s. Abbildung 4.9 B). Sowohl die DC aus den Milzen der septischen Tiere als auch die DC der Kontrollgruppe exprimierten deutlich mehr CD40 und CD86 nach CpG-Stimulation auf ihrer Oberfläche als ohne Stimulation.

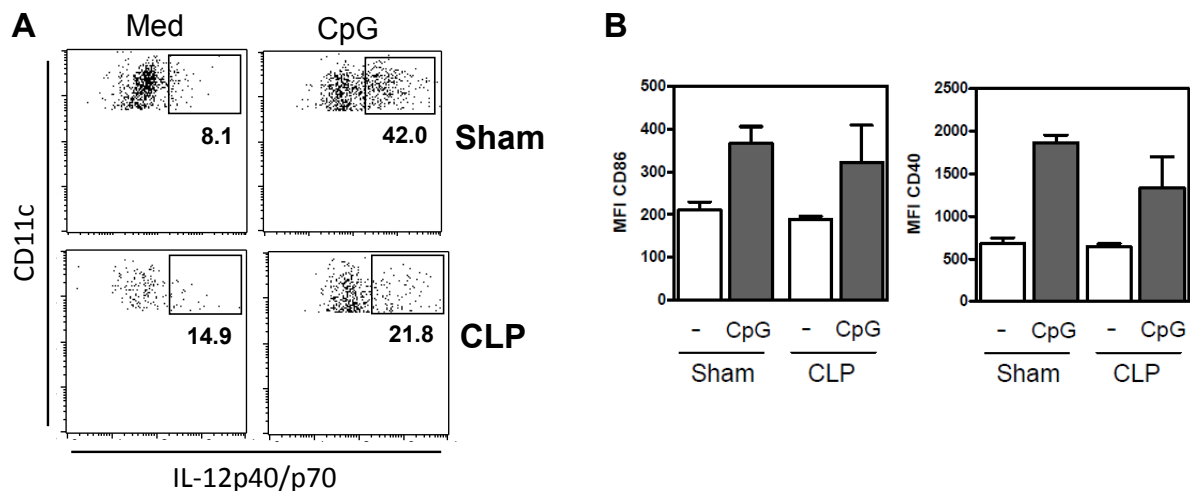


Abbildung 4.9 **IL-12-Sekretion und Expression costimulatorischer Moleküle der DC aus der Milz.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Zellen aus den Milzen der Sham- und CLP- operierten Mäuse isoliert (aus 3-5 Mäusen pro Gruppe). Je 1×10^6 der Milzzellen wurden für 18 bis 22 h in An- bzw. Abwesenheit von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG kultiviert. Die nicht-adhären Milzzellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c und IL-12p40/70, oder mit Antikörpern gegen CD40, CD86 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) DotPlot eines repräsentativen Experiments, welcher die Expression von intrazellulärem IL-12p40/70 zeigt. Die Grenze für IL-12p40/70⁺ Zellen wurde mittels Isotyp festgelegt. Die Zahlen bezeichnen jeweils den Prozentsatz der IL-12p40/70⁺ CD11c⁺ DC. Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis einer Messung, das repräsentativ für 4 unabhängige Versuche ist. (B) *Mean fluorescence intensity* (MFI) von CD40 und CD86 auf den CD11c⁺ DC. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von je 3 Versuchstieren pro Gruppe, repräsentativ für mindestens 3 Experimente.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine subletale Sepsis zu einem Verlust an DC, speziell der CD4⁺CD8⁻ Subpopulation, in den Milzen führt. Die in der Milz verbleibenden DC der septischen Tiere zeigten im Vergleich zu den DC der Milzen der Sham-Tiere eine veränderte Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. DC aus den Milzen septischer Tiere produzierten mehr IL-10 und weniger IL-12 nach CpG-Stimulation als DC von Sham-Tieren, während die Expression costimulatorischer Moleküle nicht beeinflusst wurde. Diese Befunde zu den Milz-DC stehen in Analogie zu den Beobachtungen über DC aus Milzen 24 h nach einer akuten Sepsis, welche nach bakterieller Stimulation ebenfalls eine verstärkte IL-10 Produktion bei gleichzeitig geringerer IL-12 Sekretion aufweisen [55]. Demnach sind auch 4 Tage nach einer subletalen Sepsis, wenn keine Bakterien in den Mäusen mehr nachweisbar sind, die neu-generierten DC dysfunktional. Dies lässt darauf schließen, dass während der Sepsis neue DC gebildet werden, die einen Defekt aufweisen.

4.4 Charakterisierung des Knochenmarks während Sepsis

Der Ort für die Generierung und Herkunft von DC findet sich im Knochenmark. Ob die subletale Sepsis einen Effekt auf die Zellzusammensetzung des Knochenmarks hatte, wurde im folgenden Versuchsabschnitt näher betrachtet.

4.4.1 Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks nach Sepsis

Um den Einfluss der Sepsis auf die Entwicklung der zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks zu untersuchen, wurden 4 Tage nach der Sham- oder CLP-Operation zunächst die Knochenmarkzellen präpariert und gezählt.

Die subletale Sepsis führte zu einer signifikanten Reduktion der Knochenmarkzellen. Im Vergleich zu den Sham-Tieren, die im Durchschnitt ungefähr 40×10^6 Knochenmarkzellen besaßen, zeigten die CLP-Mäuse mit durchschnittlich 25×10^6 eine deutlich niedrigere Anzahl von Knochenmarkzellen (s. Abbildung 4.11). Dies deutete auf Verlust von fast 30 % der Knochenmarkzellen bei den CLP-Versuchstieren hin.

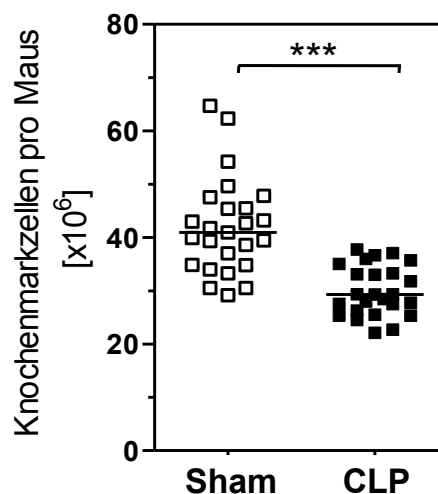


Abbildung 4.10 **Zahl der Knochenmarkzellen während Sepsis.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkzellen der Sham- (offene Quadrate) und CLP- (schwarze Quadrate) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und gezählt. Dargestellt als Quadrate sind die Einzelwerte der Zellzahlen pro Maus aus 25 durchgeführten Experimenten. Horizontale Linien zeigen den Median an. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des gepaarten „*Wilcoxon Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

Der allgemeine Verlust von Knochenmarkzellen der CLP-Tiere wurde weiterhin in Bezug auf die Art der verlorenen Zellen näher betrachtet. Dafür wurden die Knochenmarkzellen aus beiden Versuchsgruppen nach der Präparation aus den Knochen auf den Anteil von B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und DC mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Wie oben beschrieben, ist 4 Tage nach Induktion einer subletalen Sepsis die Anzahl der DC in der Milz deutlich reduziert. Um zu überprüfen, ob dies auch für die DC im Knochenmark der Fall ist, wurde zunächst die Anzahl von DC und deren Differenzierung in MHC Klasse II⁺ Zellen im Knochenmark bestimmt. Anhand der Abbildung 4.11 (A) ist zu erkennen, dass der Anteil der DC im Knochenmark pro Maus bei den septischen Tieren im Gegensatz zu den Sham-Tieren deutlich verringert war. Die absolute Zahl der CD11c⁺ Zellen pro Maus betrug bei den Sham-Tieren $0,7 - 1,5 \times 10^6$, während sie bei den CLP-Mäusen $0,2 - 0,4 \times 10^6$ pro

Maus betrug. Der Anteil an MHC Klasse II⁺ DC war um 50 % verringert im septischen Knochenmark im Vergleich zum Knochenmark aus Sham-Tieren (s. Abbildung 4.11 B).

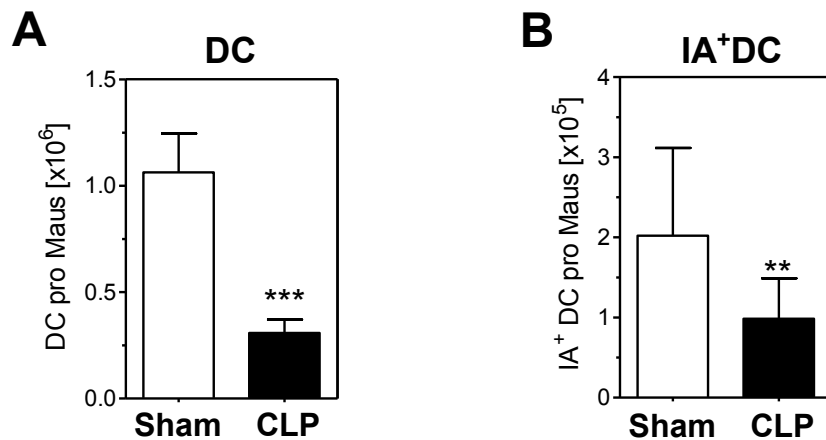


Abbildung 4.11 **DC im Knochenmark während Sepsis**. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und gezählt. Mittels Färbung der Knochenmarkszellen mit Antikörpern gegen CD11c und MHC Klasse II Moleküle (IA-Antikörper) und durchflusszytometrischer Messung wurde der (A) Anteil an DC (CD11c⁺) im Knochenmark bestimmt. Weiterhin wurde die Differenzierung der DC in (B) MHC Klasse II positive DC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Zellzahlen pro Maus aus 9 durchgeführten Experimenten. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des gepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits dargestellt werden, dass, unter anderem durch Apoptose, während einer Sepsis ein Verlust von T- und B-Zellen in verschiedenen lymphoiden Organen eintritt [6]. Um den Effekt der Sepsis auf die Anzahl anderer Zellpopulationen im Knochenmark zu betrachten, wurden die Knochenmarkszellen der Sham- und der septischen Versuchstiere 4 Tage nach Induktion der Sepsis isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Nach Induktion der subletalen Sepsis konnte im Knochenmark der septischen Tiere ein signifikant geringerer Anteil an CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, B-Zellen und NK-Zellen festgestellt werden. Abgesehen von den NK-Zellen kam es bei allen anderen Zellpopulationen im Knochenmark zu einem Rückgang um mehr als 50 % nach Sepsis verglichen mit der Sham-Kontrollgruppe (s. Abbildung 4.12 A - D). Besonders die Zahl der B-Zellen nahm während der Sepsis um mindestens 80 % ab im Vergleich zu der Zahl an B-Zellen im Knochenmark der Sham-Tiere (s. Abbildung 4.12 A).

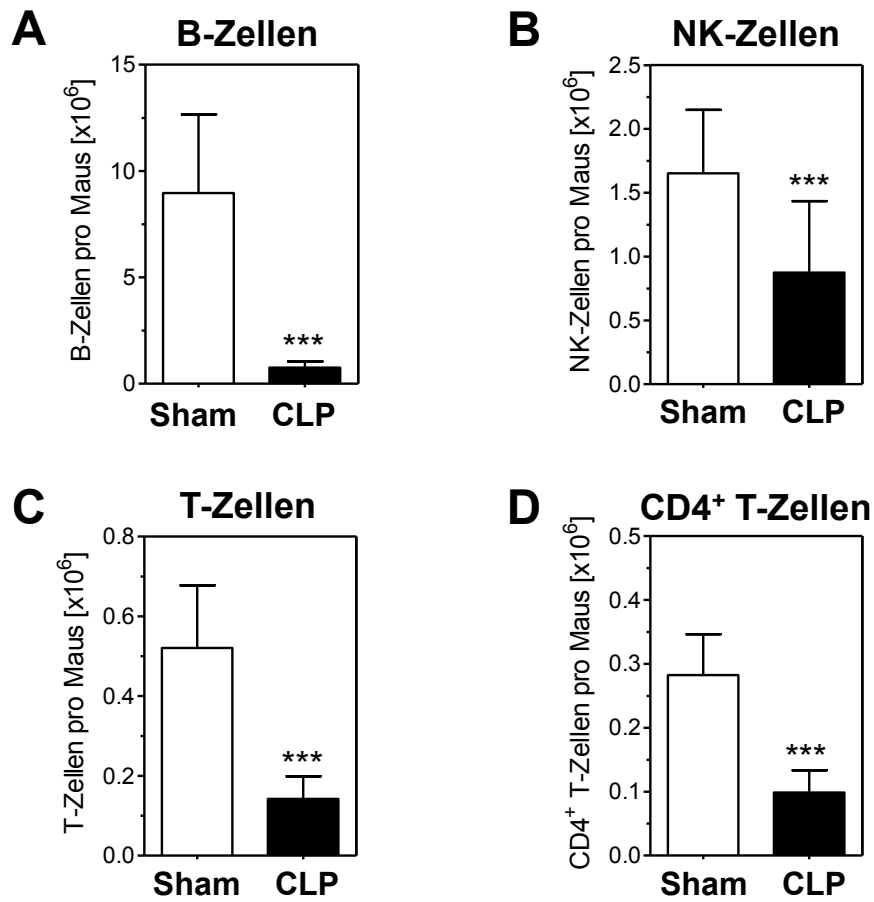


Abbildung 4.12 **Zellzusammensetzung des Knochenmarks während Sepsis.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkzellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse vereinigt, gezählt und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. (A) Für die Berechnung des Anteils der B-Zellen wurden die Knochenmarkzellen mit Antikörpern gegen CD11c und B220 gefärbt. B-Zellen wurden als CD11c⁺B220⁺ Zellen gated. (B) Durch Färbung mit Antikörpern gegen CD3 in Kombination mit Antikörpern gegen DX5 und Legen eines Gates auf die CD3⁺DX5⁺ Zellpopulation wurde der Anteil der NK-Zellen bestimmt. (C) Zur Bestimmung des Anteils an T-Zellen und (D) CD4⁺ T-Helferzellen wurden die Knochenmarkzellen mit Antikörpern gegen CD3 oder CD4 in Kombination CD11c gefärbt. Zur Bestimmung des Anteils an CD3⁺ T-Zellen wurde ein Gate auf die CD3⁺ Zellpopulation gelegt. Zur Bestimmung des Anteils an CD4⁺ T-Helferzellen wurde ein Gate auf die CD11c⁺CD4⁺ Zellpopulation gelegt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Zellzahlen pro Maus aus 10 durchgeführten Experimenten. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des gepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

So kann für die Zellzusammensetzung des Knochenmarks beobachtet werden, dass durch die Induktion einer subletalen Sepsis die Gesamtzahl der Knochenmarkzellen pro Maus abnahm. Die reduzierte Zellzahl basierte auf einem Rückgang der DC, der B-Zellen, T-Zellen, insbesondere der T-Helferzellen, und der NK-Zellen.

4.4.2 Entwicklung der Knochenmarkzellen aus septischen Tieren in Kultur

Die anhaltende Reduktion der Zahl der DC in der Milz nach einer Sepsis könnte durch eine verminderte Generierung von DC aus dem Knochenmark verursacht werden. Um diese Frage zu klären, wurden 4 Tage nach Sham oder CLP Operation Knochenmarkzellen isoliert und für 7 Tage in Gegenwart des Wachstumsfaktors GM-CSF kultiviert, um die Differenzierung von DC aus dem Knochenmark in Abwesenheit endogener Faktoren zu beobachten.

Zur aus dem Knochenmark generierten (im Weiteren als BMDC bezeichnet) DC wurden nach 7 Tagen von den Petrischalen geerntet, gruppenweise vereinigt und die Zellzahl pro Platte wurde bestimmt. Wie in Abbildung 4.13 A zu sehen ist, war die Fähigkeit der CLP-Knochenmarkzellen zur Proliferation im Gegensatz zur Proliferation der Knochenmarkzellen aus den Sham-Tieren signifikant erhöht. Während die Anzahl der Zellen pro Platte nach 7 Tagen Kultur bei den Knochenmarkzellen aus den Sham-Mäusen im Mittel $3,5 \times 10^6$ betrug, waren bei den Knochenmarkzellen aus den CLP-Mäusen durchschnittlich $5,8 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale enthalten. Demnach proliferierten die Knochenmarkzellen aus den CLP-Versuchstieren um einen Faktor von 1,6 stärker.

Die Entwicklung der DC in Kultur wurde untersucht, indem an Tag 7 die geernteten Zellen mit Antikörpern gegen CD11c (als Marker für konventionelle DC) gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt wurden. Nach 7 Tagen Kultur betrug der Prozentsatz an CD11c⁺ Zellen bei beiden Versuchsgruppen im Durchschnitt 60 - 70 % (s. Abbildung 4.13 B). Für die absolute Anzahl der DC pro Petrischale ergab sich im Gegensatz dazu bei den Zellen aus dem Knochenmark der CLP-Mäuse eine signifikant erhöhte Zahl an DC pro Platte im Vergleich zur Sham-Gruppe. Dies war zurückzuführen auf die erhöhte Zahl an Zellen pro Platte bei gleichem Prozentsatz an CD11c⁺ Zellen bei der CLP-Versuchsgruppe (s. Abbildung 4.13 C). Während sich so in den 7 Tagen Kultur aus den ursprünglich 2×10^6 Knochenmarkzellen der CLP-Tiere pro Petrischale 1,5 mal mehr DC ($3,40 \times 10^6$ DC pro Platte) entwickelten, konnten aus dem Knochenmark der Sham-Tiere durchschnittlich $2,35 \times 10^6$ DC pro Platte generiert werden. Trotzdem war, aufgrund der reduzierten Anzahl an Gesamt-Knochenmarkzellen in den CLP-Mäusen, die Fähigkeit pro Maus zur Generierung von CD11c⁺ Zellen aus dem Knochenmark bei beiden Versuchsgruppen gleich groß (s. Abbildung 4.13 D).

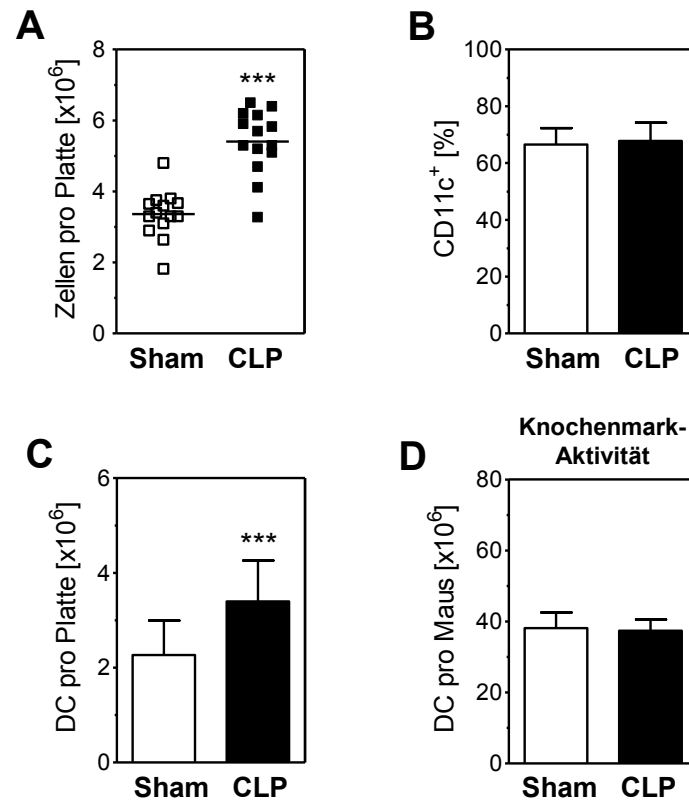


Abbildung 4.13 **Entwicklung der Knochenmarkszellen in Kultur.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken bzw. Rechtecke) und CLP- (schwarze Balken bzw. Rechtecke) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und mit Antikörpern gegen $CD11c$ gefärbt. (A) Absolute Anzahl an Zellen pro Zellkulturplatte. (B) Prozentualer Anteil der $CD11c^+$ Zellen an den Gesamtzellen. (C) Absolute Zahl an DC ($CD11c^+$ Zellen) pro Zellkulturplatte, berechnet aus dem prozentualen Anteil an $CD11c^+$ Zellen und der Zellzahl pro Platte. (D) Fähigkeit des Knochenmarks, DC auszubilden, berechnet aus (Zahl der $CD11c^+$ Zellen pro Platte) \times (Knochenmarkszellen pro Maus) / 2. Dargestellt sind Einzelwerte oder die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Zellzahlen pro Maus aus 14 durchgeführten Experimenten. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des gepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

4.4.3 Differenzierung der generierten BMDC nach Sepsis

Die endgültige Differenzierung der DC zeigt sich durch die Expression von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche. Um den Anteil der differenzierten DC ($CD11c^+$ MHC Klasse II⁺) an der Gesamtzahl aller kultivierten Zellen aus dem Knochenmark der septischen Mäuse und der Kontroll-Mäuse zu bestimmen, wurden alle Zellen an Tag 7 der Kultivierung geerntet, gezählt und mit Antikörpern gegen $CD11c$ in Kombination mit Antikörpern gegen die MHC Klasse II Moleküle (anti-IA) gefärbt.

Die Bestimmung des Anteils an differenzierten DC ($CD11c^+$ MHC Klasse II⁺) nach 7 Tagen der Kultivierung zeigte keinen Unterschied im prozentualen Anteil der MHC Klasse II⁺ BMDC zwischen der Sham-Gruppe und der CLP-Gruppe. Im Durchschnitt exprimierten die BMDC beider Versuchsgruppen auf mehr als 70 % ihrer $CD11c^+$ DC auch MHC Klasse II Moleküle

(s. Abbildung 4.14). Demnach war der Differenzierungsgrad der DC im Knochenmark der septischen Tiere genauso groß wie bei den Sham-Tieren.

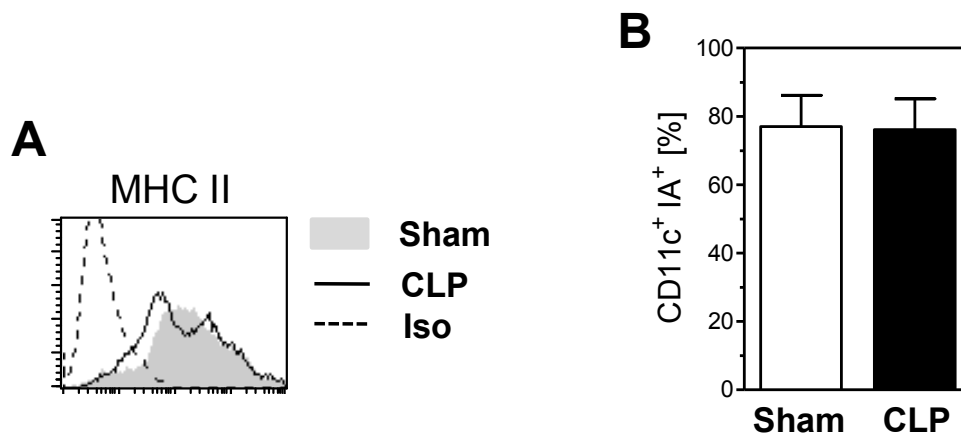


Abbildung 4.14 **Entwicklung der Differenzierung von DC in Kultur.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken bzw. graue Fläche) und CLP- (schwarze Balken bzw. Linie) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und mit Antikörpern gegen CD11c in Kombination mit Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (IA-Antikörper) gefärbt. Zur Kontrolle wurde ein Isotyp für den MHC Klasse II Antikörper verwendet. (A) Expression von MHC Klasse II Molekülen auf den CD11c⁺ BMDC dargestellt als Histogramm eines Experimentes. Hier bezeichnet die graue Fläche die Expression von MHC Klasse II auf den Sham-BMDC, die schwarze Linie die MHC Klasse II Expression auf den CLP-BMDC und die unterbrochene Linie markiert den Isotyp. (B) Prozentualer Anteil der MHC Klasse II⁺ CD11c⁺ BMDC an allen Zellen pro Zellkulturplatte. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Prozentzahlen aus 14 durchgeführten Experimenten.

Zur Bestimmung des Phänotyps der BMDC wurde die Expression von verschiedenen, für DC charakteristischen, Aktivierungs- und Subpopulationsmarkern analysiert. Wie anhand der Abbildung 4.15 zu erkennen ist, unterschieden sich die BMDC aus den septischen Mäusen und den Sham-Mäusen auch nicht in der Expression anderer Oberflächenmarker. Die Expression von MHC Klasse I, der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie die Expression anderer Marker, die spezifisch für bestimmte Untergruppen von BMDC sind, war gleich stark ausgeprägt auf den BMDC beider Versuchsgruppen. Zu den Subpopulationsmarkern zählen Gr-1, B220, CD11b und CD45RB.

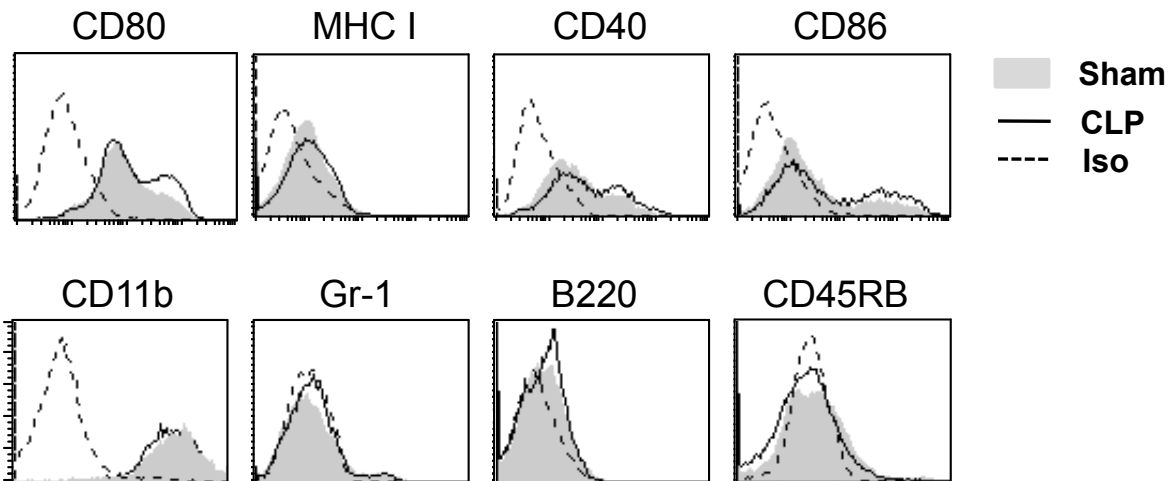


Abbildung 4.15 **Phänotyp der BMDC nach Kultivierung.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkzellen der Sham- (graue Fläche) und CLP- (schwarze Linie) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und mit Antikörpern gegen CD11c in Kombination mit Antikörpern gegen MHC Klasse I Moleküle (H-2k-Antikörper), CD11b, CD40, CD45RB, CD80, CD86, Gr-1 und B220 gefärbt. Als Kontrolle wurden entsprechende Isotypen verwendet. Dargestellt, als Histogramm, ist die Expression der verschiedenen Moleküle auf den CD11c⁺ BMDC. Hier bezeichnet die graue Fläche die Expression des entsprechenden Moleküls auf den Sham-BMDC, die schwarze Linie die Expression auf den CLP-BMDC und die unterbrochenen Linie markiert den Isotyp. Dargestellt ist jeweils ein Histogramm eines repräsentativen Experiments.

4.5 Charakterisierung der Funktion von BMDC bei Sepsis

Um die Reifung von DC nach Differenzierung aus dem Knochenmark unter dem Einfluss der Sepsis zu untersuchen, wurden die an Tag 7 gewonnenen BMDC mit verschiedenen Komponenten Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (LPS, CpG und PGN) kultiviert. Weiterhin wurden die ausgereiften BMDC auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung von T-Helferzellen und ihre Beteiligung an einer Sepsis-vermittelten Immunsuppression hin untersucht.

4.5.1 Sekretion von Zytokinen nach bakterieller Stimulation

Um Zytokin-Sekretionsmuster der DC nach Differenzierung aus dem Knochenmark unter dem Einfluss der Sepsis zu erstellen, wurden die an Tag 7 gewonnenen BMDC für 18 bis 22 h mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen (LPS, CpG und PGN) kultiviert. Die Überstände der Kulturen wurden in Bezug auf die Sekretion von IL-10, IL-12p70, IL-6 und TNF- α mit Hilfe von ELISA analysiert. Als Negativ-Kontrolle dienten BMDC, die nur in Medium kultiviert wurden. Die nur in Medium kultivierten BMDC, die als Kontrolle dienten, zeigten eine sehr geringe Sekretion aller untersuchten Zytokine, wobei zwischen den Sham- und den CLP-BMDC kein Unterschied zu erkennen war. Die bakteriellen Komponenten LPS, CpG und PGN induzierten die Sekretion aller Zytokine in den Kulturen der Sham- und der CLP-BMDC. Unter der Stimulation der BMDC mit LPS produzierten die CLP- und Sham-

BMDC vergleichbare Mengen an IL-10, IL-6 und TNF- α (s. Abbildung 4.16 A, C und D) □ Lediglich die Menge an produziertem IL-12p70 nach Stimulation mit LPS war in den Kulturen der CLP-BMDC signifikant erhöht im Gegensatz zur Kultur der Sham-BMDC (s. Abbildung 4.16 B). PGN als Stimulus induzierte die Produktion der untersuchten Zytokine bei den BMDC beider Versuchsgruppen in gleichem Maße. Mit der dreifachen Menge produzierten die CLP-BMDC im Vergleich zu den Sham-BMDC bei Zugabe von CpG zu den Kulturen signifikant mehr IL-10. Die Expression von IL-12p70, TNF- α und IL-6 war bei den CLP-BMDC im Vergleich zu den Sham-BMDC unter CpG-Stimulation auch etwas stärker, jedoch war besonders die sekretierte Menge an IL-10 besonders stark erhöht in den Überständen der Kulturen der CLP-BMDC im Vergleich zu den Sham-BMDC (s. Abbildung 4.16 A).

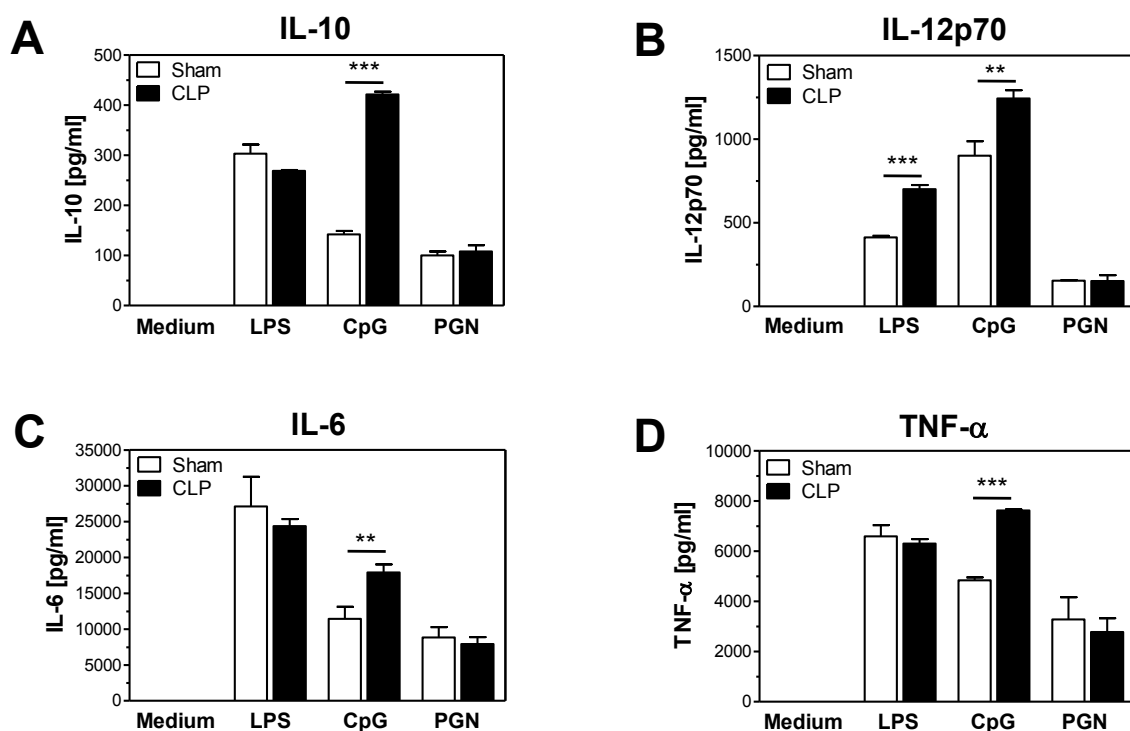


Abbildung 4.16 **Zytokinsekretion der BMDC als Antwort auf bakterielle Stimuli.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und für 18 - 22 h in Abwesenheit (Medium) oder Anwesenheit von 100 ng mL⁻¹ LPS, 5 μ g mL⁻¹ CpG oder 3 μ g mL⁻¹ PGN kultiviert. Die Überstände der Sham- (offene Balken) oder CLP- (schwarze Balken) BMDC wurden mittels ELISA auf die Anwesenheit von IL-10 (A), IL-12p70 (B), IL-6 (C) und TNF- α (D) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Zusätzlich zur Zytokinproduktion wurde auch die Expression der costimulatorischen Moleküle auf den Oberflächen der differenzierten, MHC Klasse II⁺ CD11c⁺, BMDC nach Inkubation mit den bakteriellen Komponenten LPS, CpG und PGN betrachtet. Mittels Färbung der BMDC mit Antikörpern gegen CD40, CD86, I-A (für MHC Klasse II), und CD11c wurde der

prozentuale Anteil der Expression von CD40 und CD86 auf den ausdifferenzierten BMDC bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Inkubation der BMDC mit LPS, CpG und PGN zu einer verstärkten Expression der costimulatorischen Moleküle führte, im Vergleich zu den unstimulierten BMDC. Zwischen den BMDC aus den septischen Versuchstieren und den BMDC aus den Sham-Tieren konnte kein Unterschied in der Expression von CD40 und CD86 beobachtet werden (s. Abbildung 4.17). So waren auch die BMDC aus den CLP-Tieren in der Lage, nach bakterieller Stimulation die Expression costimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche zu erhöhen.

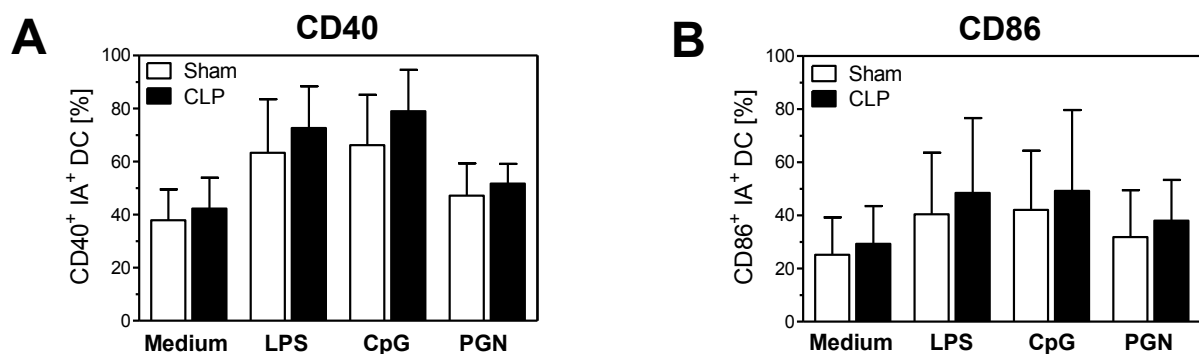


Abbildung 4.17 **Reifung der BMDC als Antwort auf bakterielle Stimulation.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und für 18 - 22 h in Abwesenheit (Medium) oder Anwesenheit von 100 ng mL^{-1} LPS, $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG oder $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ PGN kultiviert. Die Expression von (A) CD40 und (B) CD86 auf den IA⁺ (Antikörper für MHC Klasse II) CD11c⁺ Sham- (offene Balken) oder CLP- (schwarze Balken) BMDC wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 4 verschiedenen Experimenten.

Aus dem Knochenmark von septischen Tieren generierte DC wiesen ein verändertes Zytokin-Sekretionsmuster auf im Vergleich zu den DC, die aus dem Knochenmark von Sham-Tieren generiert wurden. Sie sezernierten, insbesondere nach Stimulation mit CpG in verstärktem Maße IL-10. Die Expression von MHC Klasse II und costimulatorischen Molekülen auf den Oberflächen der BMDC zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

4.5.2 Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung *in vivo*

Um die Fähigkeit der BMDC, eine Antigen-spezifische T_H-Antwort auszulösen, zu untersuchen, wurden die BMDC zur Simulation des Kontakts mit bakteriellen Komponenten mit einer Kombination aus OVA und CpG stimuliert. Da die Frequenz eines Antigen-spezifischen T-Zellklons sehr klein ist, ist die Aktivierung einer spezifischen T-Zelle nicht nachweisbar. Für das OVA als Antigen stehen spezifische T-Zellen zur Verfügung. Diese werden aus DO11.10 Mäusen gewonnen und können mittels Antikörpern gegen den OVA-

spezifischen T-Zell-Rezeptor detektiert werden. Die Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung umfasste aufgrund der wichtigen Rolle der CD4⁺ T-Helferzellen für die Immunität gegen bakterielle Infektionen nur die Untersuchung der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen.

4.5.2.1 Beladung der BMDC mit OVA und CpG-Stimulation

Als Vorbereitung für den Einsatz in der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung wurden die BMDC für 7 h mit OVA beladen und zusätzlich mit CpG stimuliert.

Wie anhand der Abbildung 4.18 A zu erkennen ist, war der Anteil an CD11c⁺ DC nach Beladung der BMDC mit OVA und Stimulation mit CpG nur unwesentlich größer als am Ende der 7-Tage Kultur. Bezüglich der Expression der MHC Klasse II Moleküle auf den 7 Stunden kultivierten BMDC konnte nach der Kultur ein Anstieg in der Expression bei beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. Zwischen den BMDC aus den Sham- und CLP-Tieren bestand jedoch kein Unterschied. Sowohl bei den BMDC aus den Sham-Versuchstieren, als auch bei den BMDC aus den CLP-Tieren betrug der Anteil der MHC Klasse II⁺ DC nach der Kultur mit OVA und CpG im Durchschnitt mehr als 90 % (s. Abbildung 4.18 B).

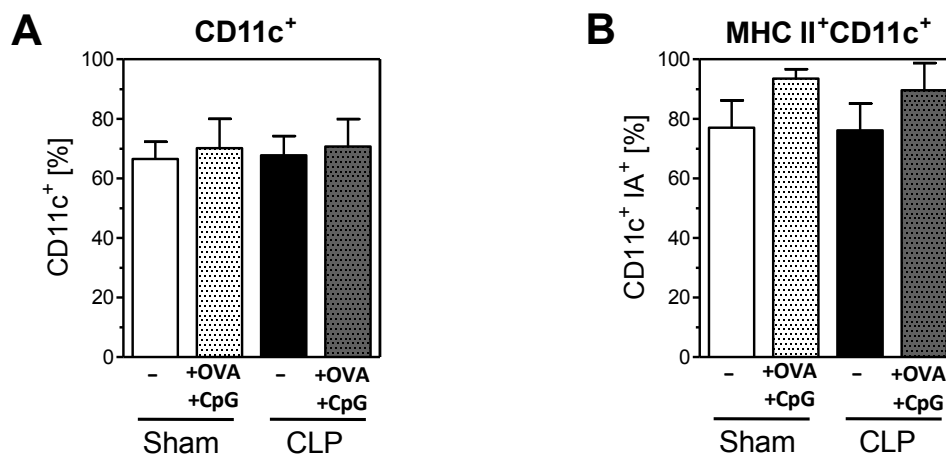


Abbildung 4.18 **Differenzierung der BMDC nach OVA-Beladung und CpG-Stimulation.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene bzw. schraffierte Balken) und CLP- (schwarze bzw. grau-schraffierte Balken) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. An Tag 7 wurden die BMDC geerntet, gezählt und für 7 h in Anwesenheit von 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CpG und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OVA kultiviert. Vor und nach Kultur wurden die BMDC mit Antikörper gegen CD11c und MHC Klasse II Moleküle (IA-Antikörper) gefärbt. (A) Expression von CD11c auf den BMDC vor und nach OVA-Beladung und CpG-Stimulation. (B) Expression von MHC Klasse II auf den CD11c⁺ BMDC vor und nach OVA-Beladung und CpG-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 14 unabhängigen Experimenten.

Da die Präsentation des Antigens (OVA) essentiell für die Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen ist, wurde neben der Expression der MHC Moleküle auf den BMDC auch die Fähigkeit zur Antigenaufnahme betrachtet. Hierfür wurden die BMDC mit FITC-konjugiertem OVA für 7 h inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde im Anschluss die Fluoreszenz-Intensität, als Maß für die Aufnahme des FITC-konjugierten OVA und

Prozessierung durch die BMDC gemessen. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die BMDC aus den Sham-Mäusen als auch die BMDC aus den CLP-Tieren das OVA aufgenommen hatten. Dies zeigte sich an der gleich starken Fluoreszenzintensität der CD11c⁺ BMDC (s. Abbildung 4.19 A).

Nach Abschluss der Beladung mit OVA wurden die Überstände der BMDC beider Versuchsgruppen gewonnen und mittels ELISA wurde die Produktion von IL-10, IL-6, IL-12p70 und TNF- α bestimmt. Die Zytokine IL-6 und IL-12p70 wurden durch die BMDC beider Versuchsgruppen nach CpG-Stimulation und OVA-Beladung gleich stark produziert (s. Abbildung 4.19 B). Auch bei der Freisetzung von TNF- α zeigte sich kein Unterschied zwischen den Sham- und CLP-BMDC (Daten nicht gezeigt). Für IL-10 wurde eine verstärkte Sezernierung durch die BMDC aus den CLP-Tieren im Vergleich zu den BMDC aus den Sham-Mäusen festgestellt. Im Durchschnitt produzierten die BMDC der septischen Tiere mehr als doppelt soviel IL-10 nach der Beladungs-Kultur (s. Abbildung 4.19 B).

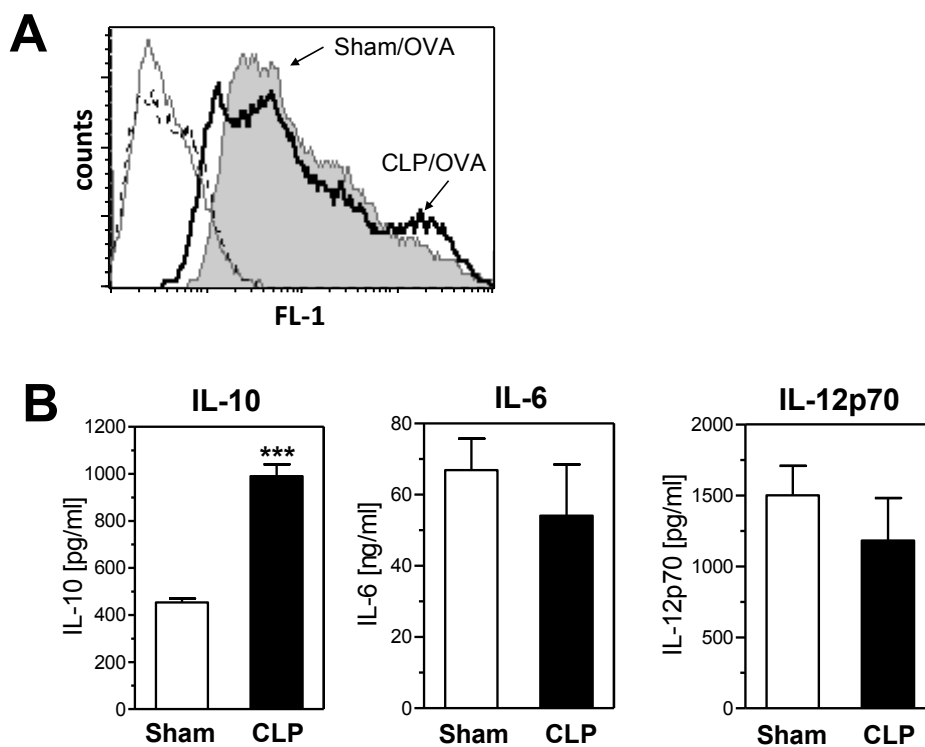


Abbildung 4.19 **OVA-Beladung der BMDC**. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden aus den Gesamtknochenmarkszellen der Sham- (offene Balken bzw. graue Fläche) und CLP- (schwarze Balken bzw. Linie) operierten Mäuse BMDC generiert. Die BMDC wurden für 7 h mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ OVA oder FITC-konjugiertem OVA kultiviert. (A) Nach Färbung der BMDC mit CD11c wurde die Fluoreszenz-Intensität in FL-1 bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm eines Experiments. Die unterbrochene Linie und die graue Linie stellen die Fluoreszenz-Intensität der Sham- und CLP-BMDC, ohne OVA-Inkubation, dar. Die Pfeile markieren die Fluoreszenz-Intensitäten der Sham- (graue Fläche) und CLP- (schwarze Linie) BMDC nach Inkubation mit FITC-konjugiertem OVA. (B) Die Überstände der Sham- (offene Balken) oder CLP- (schwarze Balken) BMDC wurden nach Inkubation mittels ELISA auf IL-10, IL-12p70 und IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

Zur weiteren Charakterisierung der BMDC wurden diese nach der 7 h-Kultur in An- oder Abwesenheit von CD40L weiterkultiviert. Die Zugabe von CD40L simuliert die Reaktion der BMDC nach Kontakt mit CD40L⁺ T-Zellen. Die Überstände wurden nach 18 bis 22 h abgenommen und auf IL-10, IL-12p70 und IL-6 untersucht. Weder die CLP-BMDC noch die Sham-BMDC sezernierten eine messbare Menge an IL-12p70, auch nicht unter der Zugabe von CD40L. Für IL-10 konnte dagegen eine gesteigerte Produktion durch die CLP-BMDC im Vergleich zu den BMDC aus den Sham-Tieren detektiert werden. Sowohl mit als auch ohne die Zugabe von CD40L war die IL-10 Produktion in den Kulturen der CLP-BMDC im Durchschnitt mehr als doppelt so hoch wie die IL-10 Produktion durch die Sham-BMDC (s. Abbildung 4.20 A). Die Zugabe von CD40L verstärkte insgesamt die IL-10 Produktion bei den BMDC beider Versuchsgruppen. Für die IL-6-Produktion konnte zwischen den BMDC der beiden Versuchsgruppen jedoch kein Unterschied beobachtet werden (s. Abbildung 4.20 B).

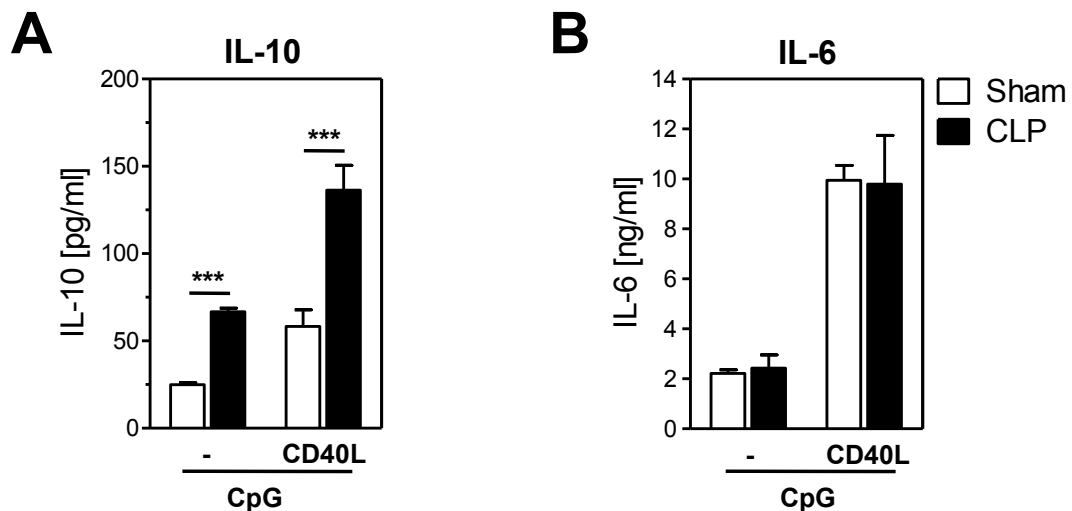


Abbildung 4.20 **Zytokin-Produktion der OVA-beladenen BMDC unter Einfluss von CD40L.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die Gesamt-Knochenmarkszellen der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse vereinigt (aus 2-5 Mäusen pro Gruppe) und in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert. Am Tag 7 wurden die geernteten BMDC für 7 h in Anwesenheit von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CpG und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ OVA kultiviert. Nach OVA-Kultur wurden die BMDC für weitere 18 bis 22 h in An- oder Abwesenheit von $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CD40L inkubiert. Die Überstände der Sham- oder CLP-BMDC wurden mittels ELISA auf die Anwesenheit von (A) IL-10 und (B) IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

4.5.2.2 Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay *in vivo*

Aus eigenen Versuchen ist bekannt, dass bei einer Kultivierung der OVA-beladenen und CpG-stimulierten BMDC zusammen mit Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kein Unterschied in der Fähigkeit zur Aktivierung der T-Helferzellen zwischen den BMDC aus den

Sham-Tieren und den BMDC aus den CLP-Tieren besteht. In einer *in vitro* Kultur der BMDC zusammen mit den Antigen-spezifischen T-Helferzellen waren die BMDC aus den CLP-Tieren ähnlich wie die Sham-BMDC in der Lage, die Expression von T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkern (CD25 und CD69), eine ähnliche Proliferationsrate der T-Zellen, sowie die Produktion von IFN- γ und IL-2 zu induzieren (Daten nicht gezeigt).

Für die Bestimmung der Fähigkeit der BMDC T-Helferzellen *in vivo* zu aktivieren, wurden OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen i.v. in unbehandelte BALB/c Mäuse injiziert. Nach einem Tag, folgte eine s.c. Applikation der mit OVA-beladenen und CpG-stimulierten BMDC in die Fußsohlen der Mäuse. Innerhalb der folgenden 7 Tage wanderten die BMDC von der Stelle der Injektion zu den nächst gelegenen poplitealen Lymphknoten. Dort konnten sie mit den OVA-spezifischen T-Zellen in Kontakt treten und diese Antigen-spezifisch, über die Präsentation von pOVA, aktivieren. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknotenzellen auf ihren Gehalt an OVA-spezifischen T-Zellen und deren Aktivierungszustand (Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD69) hin untersucht.

BMDC beider Gruppen induzierten in vergleichbarem Umfang die Expansion und die Aktivierung der OVA-spezifischen T-Zellen in den Lymphknoten naiver Tiere. Es gab keinen Unterschied im prozentualen Anteil der CD4⁺DO11.10⁺ T-Zellen in den mit CLP-BMDC und den mit Sham-BMDC behandelten Mäusen (s. Abbildung 4.21 A). Für die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vivo* konnten zwischen den beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Restimulation der Lymphknotenzellen mit pOVA und OVA wurden ebenfalls die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den OVA-spezifischen T-Zellen untersucht. Auch hier konnte kein Unterschied in der Expression zwischen den Lymphknotenzellen aus den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Durch die Restimulation erhöhte sich bei beiden Versuchsgruppen die Frequenz der CD25 und CD69 Moleküle auf den Oberflächen der CD4⁺ OVA-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Lymphknotenzellen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Produktion von IFN- γ während der Restimulation zeigte, dass die Injektion von CLP-BMDC zu einer drastisch verminderten IFN- γ -Synthese durch die OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen führte. Während bei den Lymphknotenzellen aus den Sham-Gruppen die IFN- γ Produktion durch die OVA-spezifischen T-Zellen unter der Zugabe von pOVA und OVA deutlich anstieg, war die durchschnittliche Zytokin-Produktion bei den Lymphknotenzellen aus den mit CLP-BMDC behandelten Tieren um mehr als die Hälfte reduziert (s. Abbildung 4.21 B). Das Zytokin IL-2 wurde von den OVA-spezifischen T-Zellen unter der Zugabe von pOVA und OVA in verstärktem Maße produziert. Als Vergleich dienten Zell-Kultur-Ansätze, in denen jede Art von Stimulierung fehlte. Zwischen

den Lymphknotenzellen aus den beiden Versuchsgruppen gab es keinen Unterschied in der Sekretion von IL-2 (s. Abbildung 4.21 B).

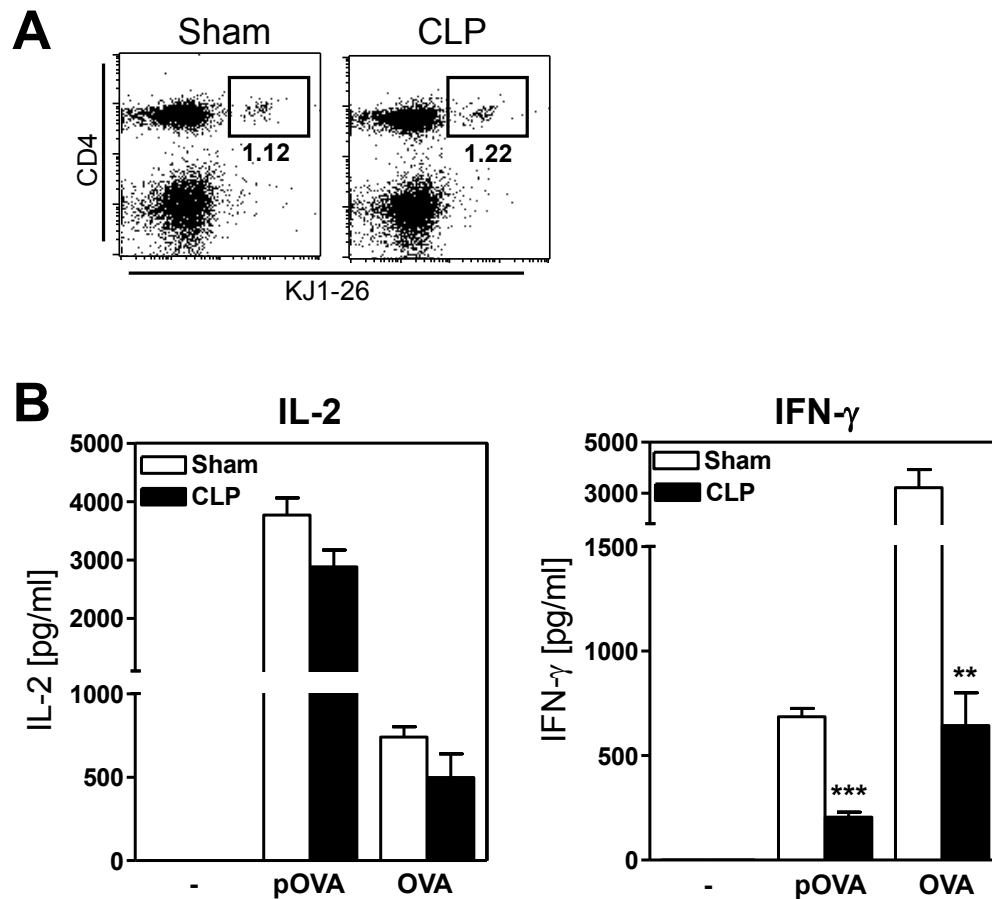


Abbildung 4.21 **Kapazität der BMDC zur Aktivierung von T-Helferzellen *in vivo***. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC für 7 h mit OVA beladen und mit CpG stimuliert. Die OVA-beladenen BMDC wurden s.c. in naïve BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor OVA-spezifische T-Helferzellen appliziert bekommen hatten, injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknotenzellen mit Antikörpern gegen CD4 und den spezifischen T-Zell-Rezeptor (KJ1-26) gefärbt, um den Prozentsatz an Antigen-spezifischen T-Zellen zu bestimmen. (A) Repräsentativer DotPlot, bei dem die Zahlen den Prozentsatz an CD4⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen bezeichnen. Die Lymphknotenzellen wurden für 3 Tage mit 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pOVA der 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OVA restimuliert. (B) In den Überständen wurden mittels ELISA IFN- γ und IL-2 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des ungepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Um eine mögliche Beeinflussung der T-Zellen durch die Antigen-präsentierenden Zellen in den Lymphknotenzellen während der Restimulation auszuschließen, wurden die CD4⁺ T-Zellen isoliert und durch Kreuzvernetzung der CD3 und CD28 Moleküle mittels immobilisierten Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert. Für die CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten wurden hohe Produktionen von IFN- γ und IL-2 für die Kulturen mit Zellen aus den Mäusen, denen Sham-BMDC injiziert worden waren, festgestellt. Durch die Injektion von

CLP-BMDC sank die Produktion von IFN- γ durch die CD4⁺ Lymphknotenzellen im Vergleich zu den Zellen aus der Sham-Gruppe um mehr als 70 % und die Produktion von IL-2 verringerte sich um mehr als 40 % (s. Abbildung 4.22 A und B).

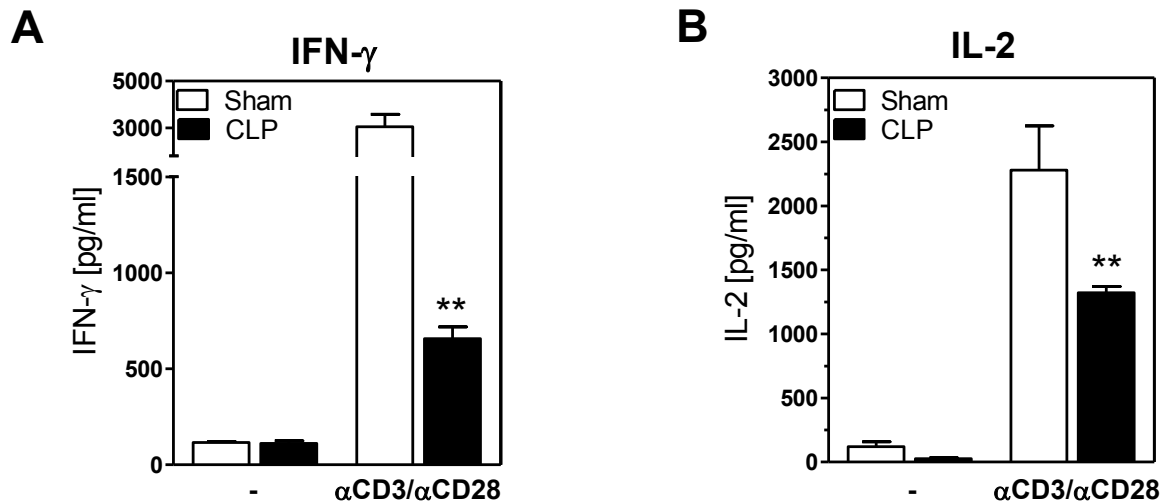


Abbildung 4.22 **Zytokin-Produktion von *in vivo* aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit von α CD3 und α CD28.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC für 7 h mit OVA beladen und mit CpG stimuliert. Die OVA-beladenen BMDC wurden s.c. in naive BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor OVA-spezifische T-Helferzellen appliziert bekommen hatten, injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknotenzellen entnommen und nach Aufreinigung der CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknotenzellen wurden jeweils 1×10^5 CD4⁺ Zellen auf eine mit PBS oder anti-CD3 und anti-CD28 beschichtete Platte transferiert. Die Überstände der Kulturen wurden nach 3 Tagen abgenommen und auf (A) IFN- γ und (B) IL-2 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen der CLP- und der Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des ungepaarten „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** $p < 0,01$.

Mit Hilfe eines CBA wurden auch die Zytokine IL-10, IL-4 und IL-13 in den Überständen der Kulturen der Lymphknotenzellen bestimmt. Da die Zytokinmengen kaum nachweisbar waren, und kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen bestand, entfällt eine graphische Darstellung.

Zusammenfassend konnte für die CLP-BMDC unter der Beladung mit OVA und Stimulierung mit CpG im Vergleich zu den Sham-BMDC eine erhöhte Produktion von IL-10 festgestellt werden. Die Fähigkeit der BMDC zur Polarisierung von T-Zellen in Richtung IFN- γ -sezernierender TH1-Zellen war bei den CLP-BMDC *in vivo* im Vergleich zu den Sham-BMDC deutlich vermindert. Dies zeigte sich durch eine verringerte Produktion von IFN- γ durch die restimulierten Lymphknotenzellen und durch die stimulierten CD4⁺ T-Zellen.

4.6 Analyse möglicher Mechanismen der supprimierten TH1-Polarisierung durch CLP-BMDC *in vivo*

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Kapazität zur Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen in Richtung TH1 durch die BMDC aus den septischen Mäusen *in vivo* stark vermindert war.

Dadurch, dass diese verringerte IFN- γ -Produktion der T-Zellen im *in vitro* T-Zell-Assay, in dem BMDC mit OVA-spezifischen T-Zellen kokultiviert worden waren, nicht beobachtet werden konnte, lässt darauf schließen, dass neben den DC *in vivo* weitere Zellen an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, oder Einfluss auf die DC nehmen könnten. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für die Beteiligung von Tregs (Foxp3⁺ Zellen), PD-1⁺ T-Zellen oder TGF- β produzierenden T-Zellen an der durch CLP-BMDC vermittelten Hemmung der TH1-Polarisierung in den Lymphknoten (Daten nicht gezeigt).

4.6.1 Untersuchung der Wanderung von BMDC in die Lymphknoten

Eine mögliche Ursache für die supprimierte TH1-Polarisierung durch die CLP-BMDC könnte eine reduzierte Migration der DC in die drainierenden Lymphknoten nach s.c. Injektion sein.

Um dies zu überprüfen, wurden die BMDC beider Versuchsgruppen vor der OVA-Beladung und CpG-Stimulation mit CFSE markiert und 24 h nach s.c. Injektion in naive Mäuse wurden die Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die BMDC beider Versuchsgruppen in geringer Anzahl in den Lymphknoten zu finden waren (s. Abbildung 4.23 A). Zwischen den BMDC der septischen Versuchstiere und den BMDC, die aus den Sham-Tieren generiert worden waren, gab es keinen signifikanten Unterschied in der absoluten Anzahl in den Lymphknoten. Tendenziell waren mehr der CLP-BMDC in den Lymphknoten der naiven BALB/c nach s.c. Applikation zu finden (s. Abbildung 4.23 B).

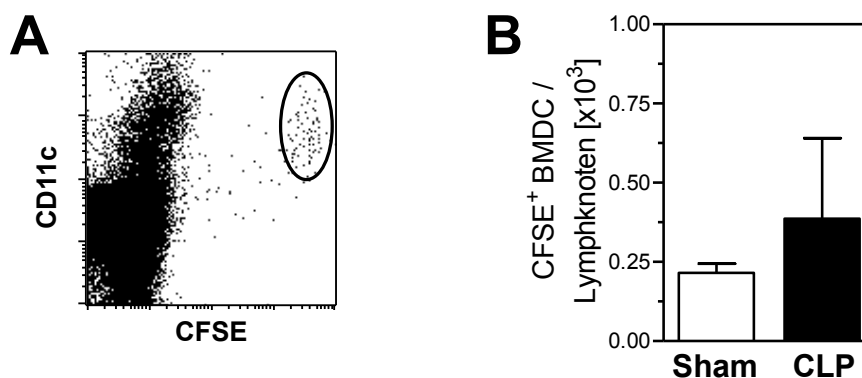


Abbildung 4.23 **Migration der BMDC nach s.c. Applikation.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC vor der OVA-Beladungs-Kultur mit CFSE markiert und je $0,5 \times 10^6$ wurden s.c. in beide Fußsohlen naiver BALB/c injiziert. Nach 24 h wurden die Lymphknoten aufgereinigt, vereinigt und mit Antikörpern gegen CD11c gefärbt. (A) Repräsentativer DotPlot der Lymphknoten, bei dem das Gate die injizierten CD11c⁺CFSE⁺ BMDC markiert. (B) Absolute Anzahl der CFSE⁺CD11c⁺ Zellen in den Lymphknoten. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Streubereich zweier Experimente mit 3 bis 4 Mäusen pro Gruppe.

4.6.2 Untersuchung der Beteiligung von IL-10

Für die BMDC aus den septischen Versuchstieren konnte nach Stimulation mit CpG und gleichzeitiger Kultur mit CD40L eine deutlich verstärkte Produktion von IL-10 im Vergleich zu den Sham-BMDC beobachtet werden. Dadurch, dass die Produktion von IL-12 nach bakterieller Stimulation der CLP-BMDC im Vergleich zu den Sham-BMDC nicht vermindert war (s. Abbildung 4.16 und 4.19), äußerte sich die Dysfunktion der BMDC aus den septischen Versuchstieren in einem abweichenden IL-10/IL-12-Verhältnis, welches einen Einfluss auf die Polarisierung der T-Helferzellen haben könnte.

Um den Effekt von IL-10 während der Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Helferzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde den naiven Mäusen, die die OVA-spezifischen T-Zellen und die BMDC erhalten hatten, zusätzlich 50 µg eines Antikörpers gegen IL-10 i.p. injiziert. Nach Restimulation der Lymphknotenzellen zeigte sich, dass die Neutralisierung von IL-10 zu einer verstärkten Sekretion von IFN-γ durch die OVA-spezifischen T-Zellen führte.

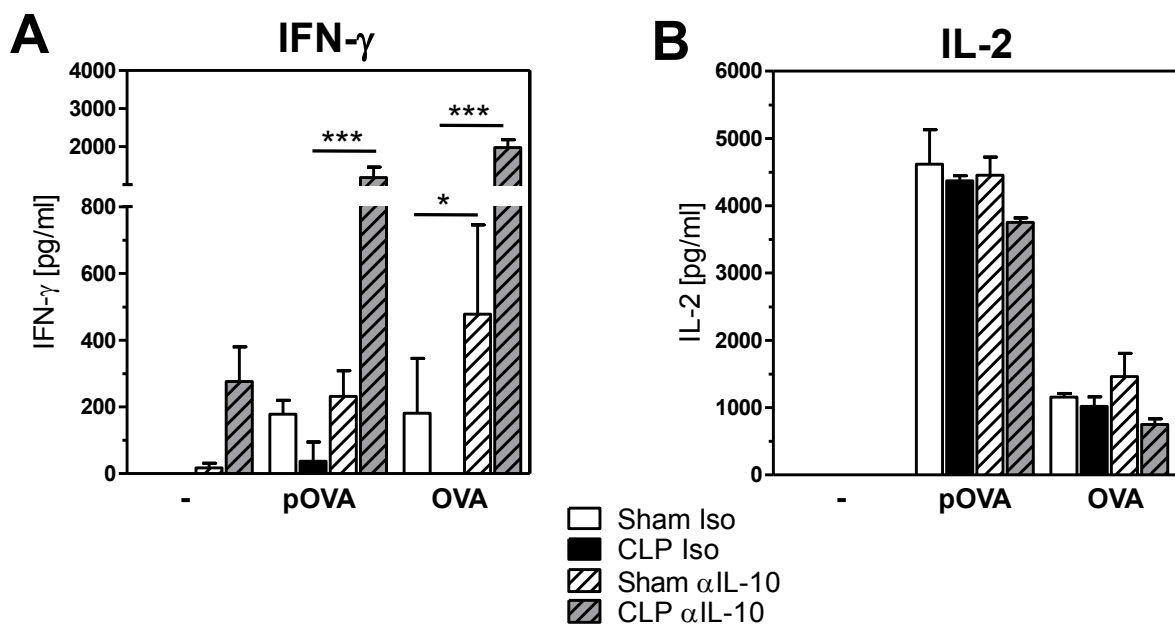


Abbildung 4.24 **Zytokin-Expression nach Restimulation der Lymphknotenzellen aus den *in vivo* T-Zell Assays nach IL-10-Neutralisierung.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis oder Sham-Operation wurden die BMDC der Sham- und CLP-operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC mit OVA beladen und CpG stimuliert. Die OVA-beladenen BMDC wurden s.c. in naive BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor OVA-spezifische T-Helferzellen appliziert bekommen hatten, injiziert. Zusätzlich wurden 50 µg eines αIL-10 Antikörpers oder eines Isotyps i.p. appliziert. Die Lymphknotenzellen wurden für 3 Tage mit 1 µg mL⁻¹ pOVA oder 100 µg mL⁻¹ OVA restimuliert. Mittels ELISA wurden (A) IFN-γ und (B) IL-2 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen den CLP- und den Sham-Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * p < 0,05; *** p < 0,001.

Besonders die Lymphknotenzellen aus den Mäusen, denen die CLP-BMDC und der α IL-10 Antikörper appliziert worden waren, sezernierten nach Restimulation signifikant erhöhte Mengen an IFN- γ im Vergleich zu den Antigen-spezifischen T-Zellen, die aus den Mäusen stammten, denen die CLP-BMDC allein injiziert worden waren (s. Abbildung 4.24 A). Auf die Produktion von IL-2 hatte die Applikation des α IL-10-Antikörpers keinen Einfluss. Die Lymphknotenzellen aus den Mäusen, denen nur die BMDC injiziert worden waren, und die Lymphknotenzellen aus den Mäusen, denen die BMDC in Kombination mit α IL-10 verabreicht worden waren, sezernierten nach Restimulation vergleichbare Mengen an IL-2 (s. Abbildung 4.24 B).

Mittels der Neutralisierung von IL-10 während der Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Helferzellen *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Suppression der TH1-Polarisierung durch CLP-BMDC von IL-10 abhängt.

4.6.3 Untersuchung der Beteiligung von NK/NKT-Zellen

NK-Zellen sind dafür bekannt, dass sie die Interaktion von DC mit T-Zellen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können [101]. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach einer s.c. Injektion von reifen DC in die Fußsohlen von naiven Mäusen die Rekrutierung von NK-Zellen in die drainierenden Lymphknoten induziert wird, wo die NK-Zellen eine frühe Quelle für IFN- γ darstellen und damit die TH1-Polarisierung fördern [175].

Im Rahmen der Versuche zur Aktivierung von T-Helferzellen *in vivo* wurde überprüft, in wieweit die Injektion von BMDC in die Fußsohlen naiver BALB/c zu einer Veränderung des Anteils von NK-Zellen in den drainierenden Lymphknoten führt. Hierfür wurden die Lymphknoten der naiven Tiere 7 Tage nach der Injektion der BMDC durchflusszytometrisch charakterisiert. Im Vergleich zu den Lymphknoten unbehandelter Mäuse, die im Durchschnitt weniger als 1 % NK-Zellen enthielten, betrug der Anteil an NK-Zellen 7 Tage nach der s.c. Applikation von BMDC 1 - 1,5 %. Somit konnte eine leichte Zunahme der NK-Zellen in den Lymphknoten beobachtet werden. Dies war jedoch unabhängig von der Herkunft der BMDC aus den septischen Tieren oder den Sham-Tieren (s. Abbildung 4.25 A). Auf die Rekrutierung endogener DC in die Lymphknoten hatte die s.c. Injektion der BMDC ebenfalls keinen Einfluss. Sowohl nach Applikation der Sham-BMDC als auch nach Applikation der CLP-BMDC betrug der Anteil der DC in den Lymphknoten 1 - 2% (s. Abbildung 4.25 B).

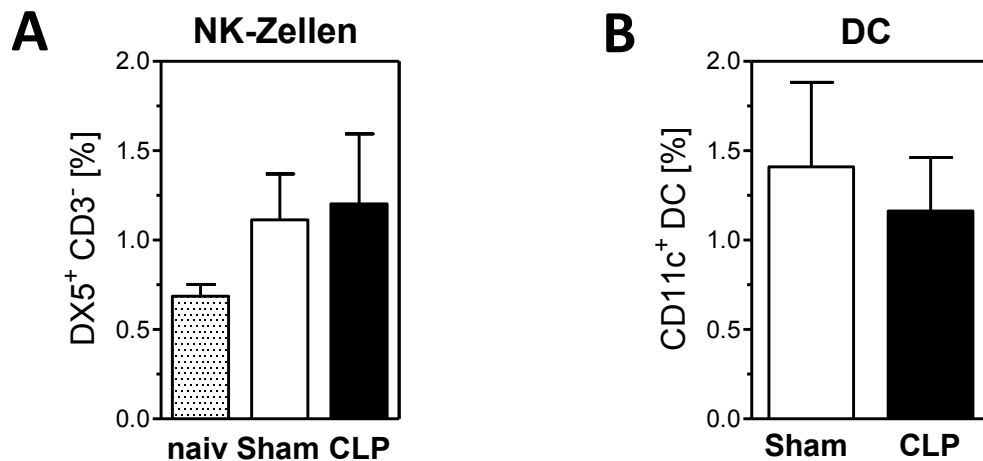


Abbildung 4.25 **Zellzusammensetzung der Lymphknoten nach s.c. Applikation von BMDC.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden je $0,5 \times 10^6$ der BMDC wurden s.c. in beide Fußsohlen naiver BALB/c injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknotenzellen aufgereinigt, gruppenweise vereinigt und mit Antikörpern gegen CD11c oder mit Antikörpern gegen CD3 in Kombination mit DX5 gefärbt. (A) Prozentualer Anteil der CD3⁻DX5⁺ NK-Zellen in den Lymphknoten. (B) Prozentualer Anteil der CD11c⁺ DC in den Lymphknoten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 Experimenten mit 3 bis 4 Mäusen pro Gruppe.

Eine mögliche Beteiligung von NK-Zellen an der oben beschriebenen reduzierten Fähigkeit von CLP-BMDC zur TH1-Polarisierung wurde im *in vivo* System über die Inhibierung der NK/NKT-Zellen untersucht. Zwecks Inaktivierung/Depletion der NK/NKT-Zellen wurden 50 µl eines anti asialo GM1 Serums pro Maus i.p. injiziert. Zur Überprüfung der Wirkung des Serums auf die NK/NKT-Zellen in den Lymphknoten wurden 24 h nach der Injektion des Serums die Lymphknotenzellen eines naiven Versuchstieres isoliert und mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung wurde der Anteil der DX5⁺ NK/NKT-Zellen bestimmt. Als Vergleich dienten die Lymphknotenzellen einer Maus, die nicht mit anti asialo Serum behandelt worden war. Die durchflusszytometrische Messung ergab, dass der Anteil der NK-Zellen an den Lymphknotenzellen von 0,5 % bis 0,7 % auf ungefähr die Hälfte (0,25 % bis 0,35 %) abnahm (s. Abbildung 4.26). Der prozentuale Anteil der NKT-Zellen änderte sich dagegen nicht (0,8 bis 1,2 %). Damit wurde gezeigt, dass das anti asialo Serum zu einer Depletion von NK-Zellen führt.

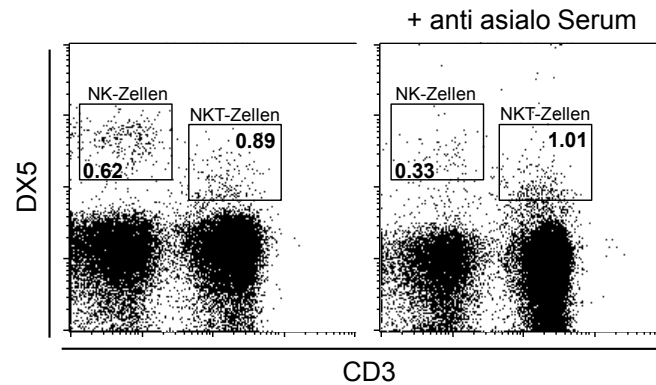


Abbildung 4.26 **NK-Zell-Depletion durch anti asialo Serum im Lymphknoten.** Zur Überprüfung der Wirkung des anti asialo Serums auf die Population der NK/NKT-Zellen im Lymphknoten wurde je zwei naiven BALB/c 50 μ l des anti asialo Serums i.p. injiziert. Nach 24 h wurden die Lymphknoten der anti asialo behandelten und die Lymphknoten zwei naiver Mäuse entnommen und die Lymphknotenzellen wurden mit Antikörpern gegen DX5 und CD3 gefärbt und der Prozentsatz der DX5⁺CD3⁻ (NK-Zellen), sowie der DX5⁺CD3⁺ (NKT-Zellen) wurde bestimmt. Dargestellt ist exemplarisch die Messung der Lymphknotenzellen je einer Maus.

Zur Untersuchung der OVA-spezifischen T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit der Gegenwart von NK-Zellen wurde nach der Injektion der OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in naive Mäuse das anti asialo Serum bzw. ein Kontrollserum (Kaninchenserum) appliziert. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung *in vivo*.

Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bestand bezüglich des absoluten Anteils der DO11.10⁺ CD4⁺ T-Zellen, sowie des prozentualen Anteils der CD25⁺ und CD69⁺ Zellen an den DO11.10⁺ CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknotenzellen kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt). Durch die Inaktivierung/Depletion der NK-Zellen wurde der Aktivierungszustand der CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten demnach nicht beeinflusst.

4.6.3.1 Effekt der NK/NKT-Zell-Inaktivierung auf die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung *in vivo*

Um zu überprüfen, ob die Gegenwart von NK-Zellen einen Einfluss auf die T-Helferzell-Polarisierung durch die BMDC nimmt, wurden die Lymphknotenzellen aus den Tieren, die vor der Applikation von BMDC ein Kontroll- oder anti asialo Serum erhalten hatten, mit pOVA und OVA restimuliert.

Unter Einfluss des Kontrollserums konnte beobachtet werden, dass die BMDC aus den septischen Tieren nach *in vivo* Applikation im Vergleich zu den Sham-BMDC eine verminderte IFN- γ -Produktion der Antigen-spezifischen T-Helferzellen induzierten. Sowohl nach Stimulation mit pOVA, als auch OVA sezernierten die Lymphknotenzellen, die aus den Mäusen stammten, denen CLP-BMDC appliziert worden waren, weniger IFN- γ als die Lymphknotenzellen aus den Mäusen, die Sham-BMDC injiziert bekommen hatten (s. Abbildung 4.27 A). Die Depletion der NK-Zellen führte dazu, dass die Lymphknotenzellen aus den Mäusen, die CLP-BMDC erhalten hatten, gleich viel IFN- γ produzierten, wie die

Lymphknotenzellen aus den Sham-BMDC injizierten Mäusen ohne NK-Zell-Depletion. Nach Stimulation mit OVA zeigte sich, dass eine vorherige Depletion der NK-Zellen durch das anti asialo Serum nach Applikation von CLP-BMDC sogar zu einer signifikant verstärkten Produktion von IFN- γ durch die Lymphknotenzellen führte (s. Abbildung 4.27 A).

Die Depletion der NK-Zellen durch das anti asialo Serum hatte keinen Einfluss auf die IL-2-Produktion nach Restimulation. Die Lymphknotenzellen der Tiere, die Sham-BMDC erhalten hatten, oder denen CLP-BMDC appliziert worden waren, sezernierten ähnliche Mengen an IL-2 unabhängig von der vorhergehenden Depletion der NK-Zellen (s. Abbildung 4.27 B).

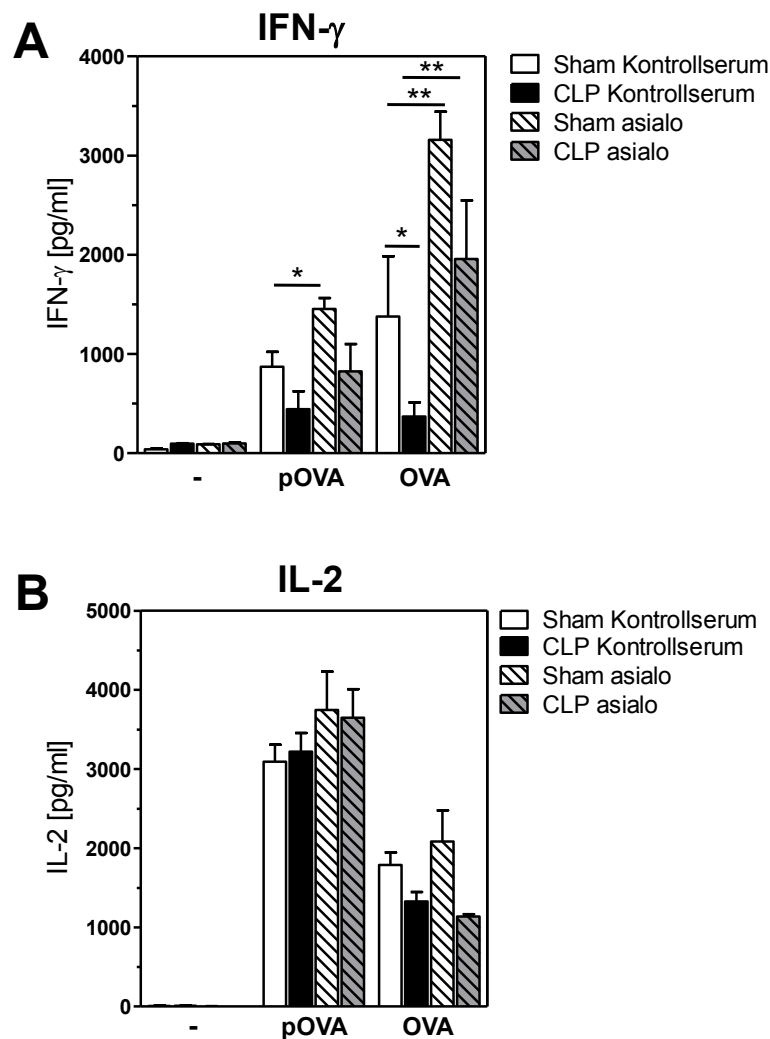


Abbildung 4.27 **Zytokin-Expression der Lymphknotenzellen aus den *in vivo* T-Zell Assays nach NK-Zell-Depletion.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis oder Sham-Operation wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC für 7 h mit OVA beladen und mit CpG stimuliert. Die OVA-beladenen BMDC wurden s.c. in naïve BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor OVA-spezifische T-Helferzellen appliziert bekommen hatten, injiziert. Zusätzlich wurden 50 μ l anti asialo Serum oder Kontrollserum i.p. appliziert. Nach 7 Tagen wurden die Lymphknotenzellen entnommen und für 3 Tage mit 1 μ g mL⁻¹ pOVA oder 100 μ g mL⁻¹ OVA restimuliert. In den Überständen wurden mittels ELISA (A) IFN- γ und (B) IL-2 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen den CLP- und den Sham-Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * p < 0,05; ** p < 0,01.

Auch in diesem Versuchsansatz wurden die aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknotenzellen unabhängig von Antigen-präsentierenden Zellen mit immobilisierten anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern aktiviert. Wie zuvor gezeigt (s. Abbildung 4.22), war die Produktion von IL-2 und IFN- γ durch die CD4⁺ T-Zellen der Lymphknotenzellen, die aus den mit CLP-BMDC behandelten Mäusen stammten, stark vermindert.

Nach Depletion der NK-Zellen durch das anti asialo Serum führte die Injektion von Sham-BMDC in die naiven Versuchstiere zu keinem Unterschied in der IFN- γ -Produktion durch die CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollserum. Dagegen sezernierten CD4⁺ T-Zellen aus Mäusen, denen vor der Applikation der CLP-BMDC die NK-Zellen depletiert worden waren, 2,5-mal mehr IFN- γ als die T-Zellen aus Tieren, die das Kontrollserum erhalten hatten (s. Abbildung 4.28 A). Dieser positive Effekt der NK-Zell-Depletion auf die Sekretion von IFN- γ durch die CD4⁺ T-Zellen, die *in vivo* mit CLP-BMDC in Kontakt gekommen waren, wurde jedoch nicht für die Produktion von IL-2 unter den beschriebenen Bedingungen beobachtet. Wie anhand der Abbildung 4.28 B zu erkennen ist, war die Produktion von IL-2 durch die CD4⁺ T-Zellen aus den Mäusen, denen CLP-BMDC injiziert worden waren, stark vermindert im Vergleich zur Applikation von Sham-BMDC und veränderte sich nicht durch die vorhergehende Depletion der NK-Zellen.

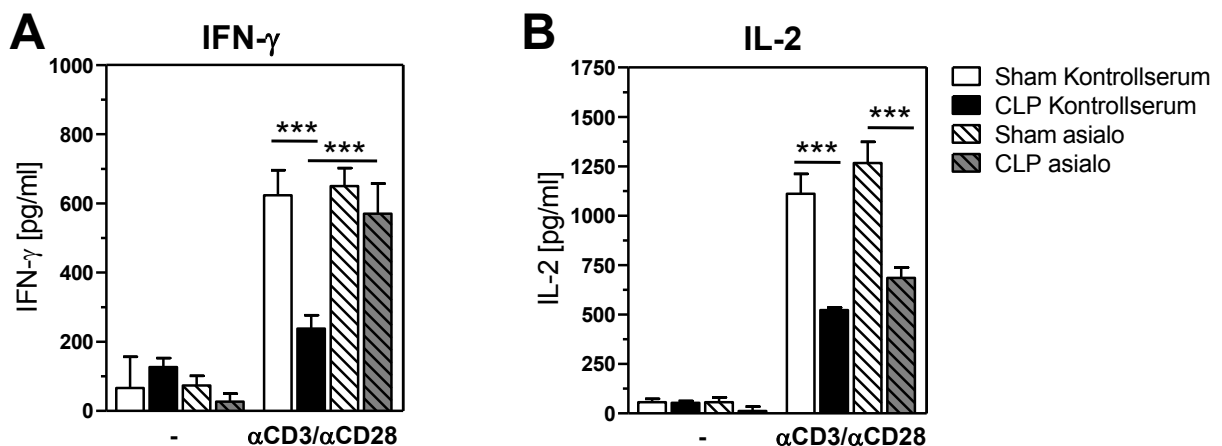


Abbildung 4.28 **Zytokin-Produktion von *in vivo* aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit von α CD3 und α CD28.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse generiert. An Tag 7 wurden die BMDC mit OVA beladen und mit CpG stimuliert. Die OVA-beladenen BMDC wurden s.c. in naive BALB/c Mäuse, die am Tag zuvor OVA-spezifische T-Helferzellen appliziert bekommen hatten, injiziert. Zusätzlich wurden 50 μ l anti asialo Serum oder Kontrollserum i.p. appliziert. Nach 7 Tagen wurden die CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknotenzellen aufgereinigt und in jeweils 1×10^5 CD4⁺ Zellen auf eine mit PBS oder anti-CD3 und anti-CD28 beschichtete Platte transferiert. Die Überstände der Kulturen wurden nach 3 Tagen abgenommen und auf (A) IFN- γ und (B) IL-2 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen den CLP- und Sham-Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

Bezüglich der CLP-BMDC vermittelten Suppression der TH1-Polarisierung kann zusammenfassend festgestellt werden, dass regulatorische Foxp3⁺ T-Zellen, das inhibitorisch wirkende PD-1 und TGF- β nicht an der Hemmung der TH1-Polarisation beteiligt sind. Eine verminderte Wanderung von BMDC in den drainierenden Lymphknoten nach s.c. Applikation konnte ebenfalls als mögliche Ursache der TH1-Suppression ausgeschlossen werden. Durch die Depletion der NK-Zellen im *in vivo* Modell wurde gezeigt, dass NK-Zellen bei der Inhibierung der Polarisation der T-Helferzellen in Richtung TH1 durch die CLP-BMDC eine Rolle spielen. Die vor der NK-Zell-Depletion supprimierte TH1-Polarisation wird aber nicht durch eine verminderte Rekrutierung der NK-Zellen in den Lymphknoten vermittelt. Bei Depletion der NK-Zellen vor der Applikation von CLP-BMDC in die naiven Mäuse konnte eine Verminderung der IFN- γ -Produktion durch die OVA-spezifischen T-Helferzellen aufgehoben werden. Auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 ist an der Suppression einer T-Helferzell-Polarisierung in Richtung TH1 durch die CLP-BMDC beteiligt. Durch die gesteigerte Produktion von IFN- γ durch die Antigen-spezifischen T-Helferzellen nach Neutralisierung von IL-10 im *in vivo* Modell wurde dies deutlich.

4.7 Untersuchung der Beteiligung von BMDC an der Sepsis-induzierten Immunsuppression

Eine subletale Sepsis induziert innerhalb von 4 Tagen eine erhöhte Anfälligkeit für eine sekundäre *P. aeruginosa* Infektion. DC sind möglicherweise an der Entstehung der Immunsuppression beteiligt, da die intratracheale Gabe von naiven DC zeitgleich mit der *P. aeruginosa* Infektion zu einer verbesserten Abwehr der Lungeninfektion führt [14].

DC, die aus dem Knochenmark nach CLP differenzierten, hemmten die Polarisation der T-Helferzellen in Richtung TH1. Ob die DC auch Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem haben, wurde mittels *P. aeruginosa* Infektion untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe von CFSE-markierten Sham- und CLP-BMDC überprüft, ob BMDC nach i.n. Applikation in die Lunge von naiven Mäusen gelangen. Wie anhand der Abbildung 4.29 zu erkennen ist, führte die i.n. Applikation der BMDC in naive Versuchstiere ohne zusätzliche *P. aeruginosa* Infektion zu einer gleichartigen Verteilung der BMDC beider Versuchsgruppen in den Lungen. Sowohl der Prozentsatz an BMDC pro Lunge, als auch die absolute Anzahl an BMDC pro Lunge war vergleichbar zwischen beiden Gruppen.

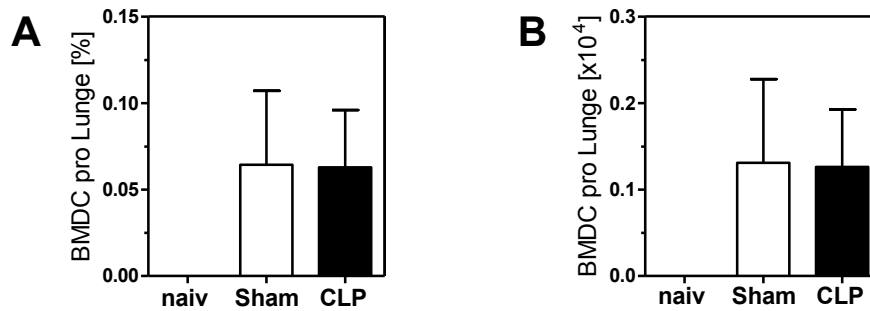


Abbildung 4.29 **Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von CFSE-markierten BMDC.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Balken) und CLP- (schwarze Balken) operierten Mäuse in Anwesenheit von GM-CSF generiert. An Tag 7 wurden die BMDC mit CFSE markiert und 5×10^6 der BMDC wurden i.n. in naive BALB/c injiziert. Nach 18 h wurden die Lungenzellen aufgereinigt und mit Antikörpern gegen CD11c gefärbt. (A) Prozentualer Anteil der CFSE⁺ CD11c⁺ (BMDC) Zellen pro Lunge. (B) Absolute Anzahl an CFSE⁺ CD11c⁺ (BMDC) Zellen pro Lunge. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Prozentzahlen oder der Zellzahlen der BMDC pro Maus aus 3 durchgeführten Experimenten mit je 3 bis 4 Versuchstieren pro Gruppe.

Anschließend wurden 1×10^6 BMDC aus Sham- und CLP-Tieren zusammen mit 1×10^9 CFU *P. aeruginosa* i.n. in naive BALB/c Mäuse injiziert. Vierundzwanzig h später wurden die Lungen auf die bakterielle Beladung, die zelluläre Zusammensetzung und den Gehalt an Zytokinen hin untersucht.

Verglichen mit der Applikation von Sham-BMDC enthielten die Lungen der CLP-BMDC-injizierten Tiere deutlich mehr *P. aeruginosa* Bakterien (s. Abbildung 4.30 A). Die Lungenhomogenisate wurden mittels ELISA auf den Gehalt an Zytokinen untersucht. Das Zytokinprofil der Lungen nach *P. aeruginosa* Infektion zeigte eine verminderte Produktion von IL-12p70 und IFN- γ nach der gleichzeitigen Applikation von BMDC aus septischen Mäusen im Vergleich zur Applikation von Sham-BMDC (s. Abbildung 4.30 B). Für IL-10 konnte eine leichte, wenn auch nicht signifikante Erhöhung in den Lungen der Tiere, die mit CLP-BMDC und *P. aeruginosa* behandelt worden waren, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Für andere Zytokine wie z. B. TNF- α wurde kein Unterschied zwischen den Lungen der beiden Versuchsgruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

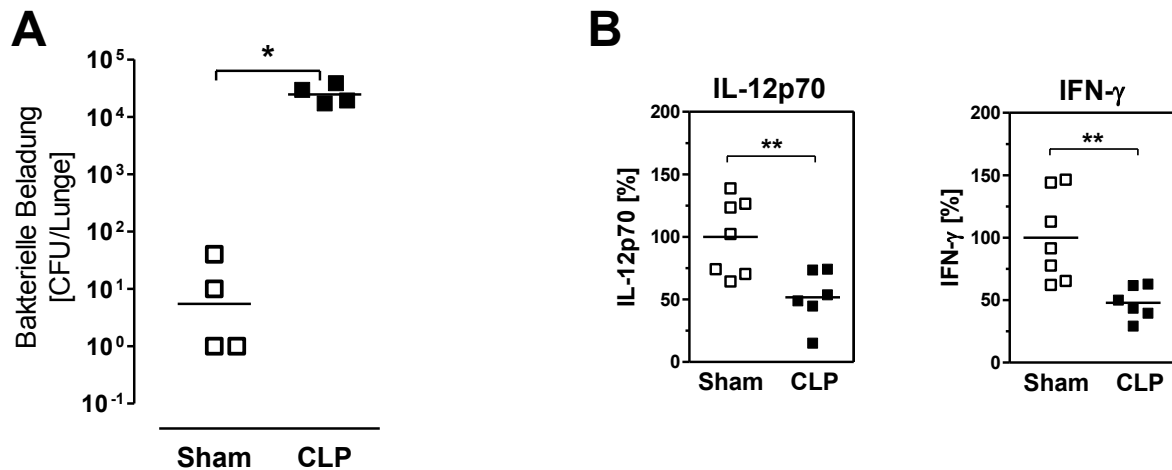


Abbildung 4.30 **Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und *P. aeruginosa***. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- (offene Rechtecke) und CLP- (schwarze Rechtecke) operierten Mäuse in Anwesenheit von GM-CSF generiert. An Tag 7 wurden die BMDC zusammen mit 1×10^9 CFU *P. aeruginosa* i.n. in naive BALB/c injiziert. Nach 24 h wurden die Lungen entnommen und homogenisiert. Die Homogenisate wurden (A) für die Bestimmung der bakteriellen Beladung der Lungen mit Saponin verdaut und auf Agarplatten über Nacht inkubiert. (B) In den Homogenisaten wurde mittels ELISA IFN- γ und IL-12p70 quantifiziert. Die Daten zeigen den Median der CFU/Lunge einzelner Mäuse (A), den Prozentsatz von pg Zytokin / mg Protein in Relation zum Mittelwert der Sham-Gruppe (B) und sind repräsentativ für 2 Experimente. Ergebnisse wurden mittels „Mann Whitney-U Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Da Granulozyten und NK-Zellen eine wichtige Aufgabe bei der Beseitigung von *P. aeruginosa* in der Lunge zukommt [83, 184], wurde neben den Zytokinen auch die zelluläre Zusammensetzung der Lungen nach *P. aeruginosa* Infektion und BMDC Applikation näher charakterisiert. Vier h nach Infektion der naiven Tiere mit *P. aeruginosa* und Applikation von BMDC konnte ein Anstieg in der Zahl der Granulozyten beobachtet werden. Verglichen mit den Lungen naiver Tiere, die deutlich weniger als 10 % Granulozyten enthielten, stieg der Prozentsatz an Ly6G⁺ Granulozyten in den Lungen der *P. aeruginosa* infizierten Tiere auf mehr als das doppelte an (s. Abbildung 4.31 A). Dies geschah unabhängig von der Anwesenheit der Sham-BMDC, während die gleichzeitige Applikation der CLP-BMDC zusammen mit *P. aeruginosa* zu einem tendenziell geringeren Anstieg der Granulozytenzahl in den Lungen führte (s. Abbildung 4.31 B). Bezüglich der Makrophagen konnte kein Unterschied in der absoluten Anzahl in den Lungen festgestellt werden. Die Infektion mit *P. aeruginosa* führte zu einer geringen Reduktion der Makrophagen in den Lungen der infizierten Tiere, jedoch hatte die gleichzeitige Applikation der BMDC keinen Effekt auf die Makrophagenzahl (s. Abbildung 4.31 C). Die absolute Anzahl der NK-Zellen in den Lungen änderte sich weder durch die Infektion mit *P. aeruginosa*, noch durch die Injektion der BMDC (s. Abbildung 4.31 D).

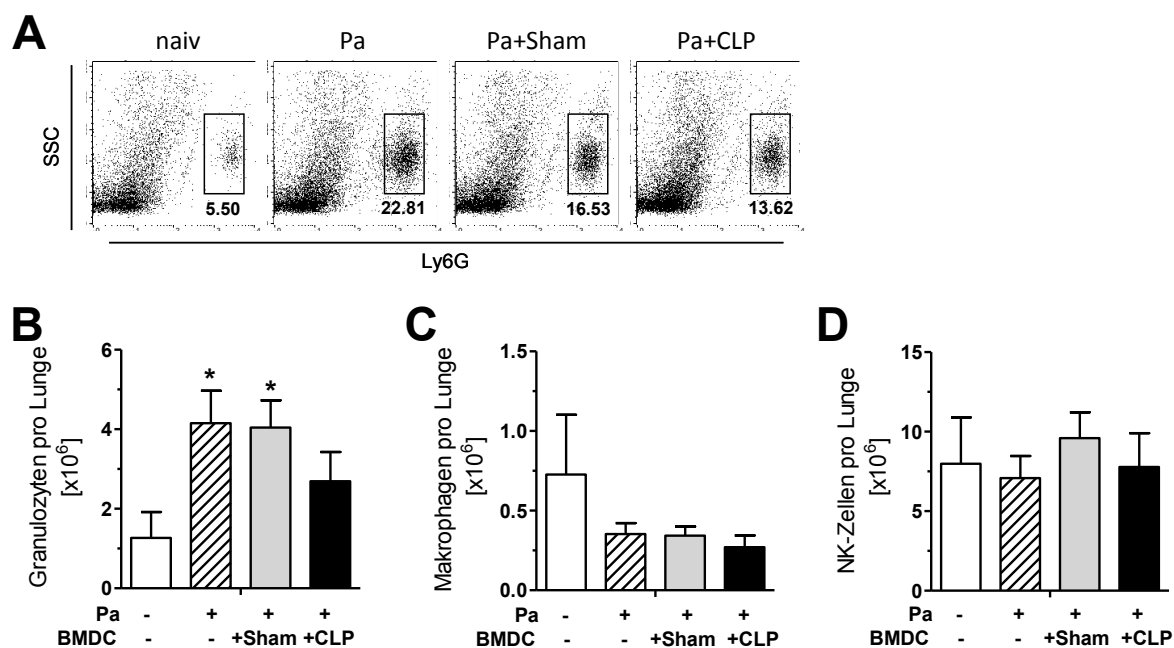


Abbildung 4.31 **Zellzusammensetzung der Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und *P. aeruginosa***. Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- und CLP-operierten Mäuse in Anwesenheit von GM-CSF generiert. An Tag 7 wurden die BMDC zusammen mit 1×10^9 CFU *P. aeruginosa* i.n. in naive BALB/c injiziert. Nach 4 h wurden die Lungenzellen aufgereinigt und mit Antikörpern gegen Ly6G, CD11b, CD11c, CD3 und DX5 gefärbt. (A) Repräsentativer DotPlot der Gating-Strategie der Ly6G⁺ Granulozyten. Die Zahlen bezeichnen den Prozentsatz der Granulozyten. (B) Absolute Anzahl an Ly6G⁺ Granulozyten pro Lunge. (C) Absolute Anzahl an CD11c^{lo}CD11b^{int} Makrophagen pro Lunge. (D) Absolute Anzahl an CD3⁻DX5⁺ NK-Zellen pro Lunge. Die Daten (B, C, D) zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment mit n=3 Mäusen pro Gruppe und sind repräsentativ für 2 Experimente. Die Ergebnisse wurden mittels „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch * < 0,05.

Wie bereits beschrieben, ist die IFN- γ Produktion durch die NK-Zellen wichtig für die Beseitigung der *P. aeruginosa* Bakterien in den Lungen. Da die Zahl der NK-Zellen in den Lungen sich durch die *P. aeruginosa* nicht veränderte, bestand die Vermutung, dass die reduzierte IFN- γ Expression in der Lunge nach Applikation der CLP-BMDC auf einer verminderten IFN- γ Produktion durch die NK-Zellen beruhte. Um die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Lungenzellen der *P. aeruginosa* infizierten Tiere 4 h nach der Infektion aufgereinigt und die NK-Zellen (CD3⁻DX5⁺) wurden für intrazelluläres IFN- γ gefärbt. Bezüglich der Produktion von IFN- γ konnte jedoch kein Unterschied bei den NK-Zellen aus den Lungen der Mäuse nach *P. aeruginosa* Infektion beobachtet werden. Durch die *P. aeruginosa* Infektion wurde zwar die Sekretion von IFN- γ in den NK-Zellen der Lungen der infizierten Versuchstiere induziert, jedoch führte die gleichzeitige Applikation der BMDC beider Versuchsgruppen zu einer leicht verminderten IFN- γ Freisetzung durch die NK-Zellen (s. Abbildung 4.32 A).

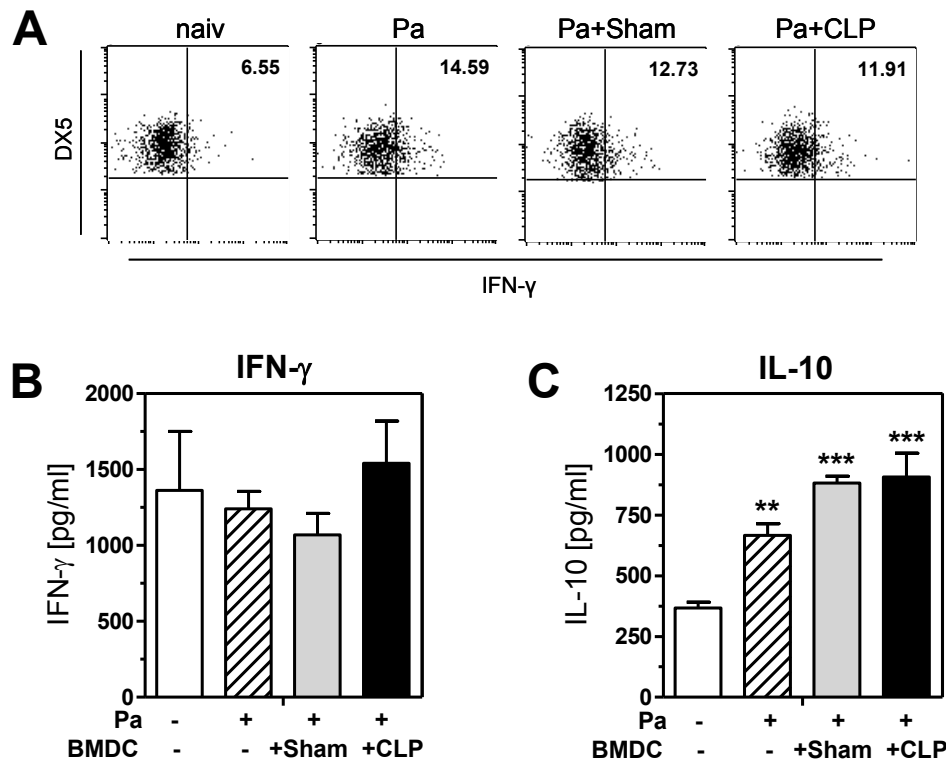


Abbildung 4.32 **Zytokinproduktion der Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und *P. aeruginosa*.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- und CLP-operierten Mäuse in Anwesenheit von GM-CSF generiert. 1×10^6 der BMDC wurden zusammen mit 1×10^9 CFU *P. aeruginosa* (Pa) i.n. in naive BALB/c injiziert. Nach 4 h wurden die Lungenzellen aufgereinigt und 8×10^5 Zellen wurden in 200 μ l in Quadruplikaten mit 3 ng mL^{-1} rIL-2 kultiviert. (A) Nach Zugabe von Monensin wurden die Lungenzellen 5 h später mit Antikörpern gegen CD3, IFN- γ , CD11b und DX5 gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentativer DotPlot der IFN- γ Produktion der CD3⁺ CD11b⁺ DX5⁺ NK-Zellen. Die Zahlen bezeichnen den Prozentsatz an IFN- γ ⁺ Zellen. Die Grenze für positive Zellen wurde mittels Isotyp für IFN- γ bestimmt. Nach 18 - 22 h wurden die Überstände der Zellkultur gewonnen und mittels ELISA auf (B) IFN- γ und (C) IL-10 untersucht. Die Daten (B, C) zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment mit n=3 Mäusen pro Gruppe und sind repräsentativ für 2 Experimente. Die Ergebnisse wurden mittels „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch ** < 0,01; *** < 0,001.

Neben intrazellulärem IFN- γ wurde auch die Zytokinproduktion der Lungenzellen mittels ELISA bestimmt. Nach Kultur der Lungenzellen für 18 - 22 h konnte für die Menge an IFN- γ in den Überständen der Zellkultur kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (s. Abbildung 4.32 B). Die Infektion der Tiere mit *P. aeruginosa* führte in den Lungen zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10 Sekretion verglichen mit der Menge an IL-10 in den Lungen von nicht-infizierten Tieren. Die gleichzeitige Applikation von BMDC verstärkte die IL-10-Produktion noch etwas, jedoch unabhängig davon, ob die BMDC aus den Sham- oder den CLP-Tieren generiert worden waren (s. Abbildung 4.32 C).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die BMDC aus den septischen Tieren nach Applikation in naive Mäuse eine Immunsuppression nach *P. aeruginosa* Infektion vermitteln, die in einer erhöhten Anfälligkeit für *P. aeruginosa* resultiert. Die CLP-BMDC-

vermittelte Immunsuppression war unabhängig von einer verminderten Wanderung der CLP-BMDC in die Lungen, einer verminderten IFN- γ Produktion durch NK-Zellen in der Lunge oder von einer reduzierten Rekrutierung von Granulozyten.

4.7.1 Interaktion von NK-Zellen und BMDC *in vitro*

Um zu überprüfen, ob eine Modulation von NK-Zellen durch BMDC stattfinden kann, wurde die Interaktion von den generierten BMDC und NK-Zellen *in vitro* betrachtet.

Hierfür wurden aus den Milzen naiver Mäuse mittels MACS-Technik NK-Zellen aufgereinigt und zusammen mit den BMDC der septischen Versuchstiere und den BMDC aus Sham-Tieren kultiviert. Zur Stimulation der Co-Kultur wurden UV-inaktivierte *P. aeruginosa* verwendet, da aufgrund der Lungen-Kultur bekannt war, dass die *P. aeruginosa*-Stimulation zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen führt. Des Weiteren handelt es sich bei *P. aeruginosa* um ein Bakterium, das auch für die Charakterisierung einer Immunsuppression im Mausmodell Verwendung findet und eine klinische Relevanz besitzt. Nach 18 - 22 h wurden die Zellen der Kultur durchflusszytometrisch analysiert und in den Überständen wurden die Zytokine quantifiziert.

Die Stimulation naiver NK-Zellen mit *P. aeruginosa* induzierte eine deutliche Produktion von IFN- γ . Nach Zugabe von BMDC aus Sham-Tieren und gleichzeitiger *Pa*-Stimulation wurde die IFN- γ -Produktion durch die NK-Zellen leicht verringert. Die Co-Kultur der naiven NK-Zellen mit CLP-BMDC unter *P. aeruginosa*-Stimulation führte demgegenüber zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Produktion der NK-Zellen im Vergleich zur Co-Kultur von NK-Zellen und Sham-BMDC und im Vergleich zur alleinigen Kultur von naiven NK-Zellen (s. Abbildung 4.33 A). Das Zytokin IL-10, welches durch die CLP-BMDC unter CpG-Stimulation vermehrt produziert wird, wurde in dem *in vitro* Versuchsansatz nicht nur durch die BMDC produziert, sondern in geringer Menge auch durch die naiven NK-Zellen nach Stimulation. Die Zugabe der Sham- und der CLP-BMDC zu der Kultur der naiven NK-Zellen führte zu einer signifikant erhöhten Menge an IL-10 in den Überständen (s. Abbildung 4.33 B).

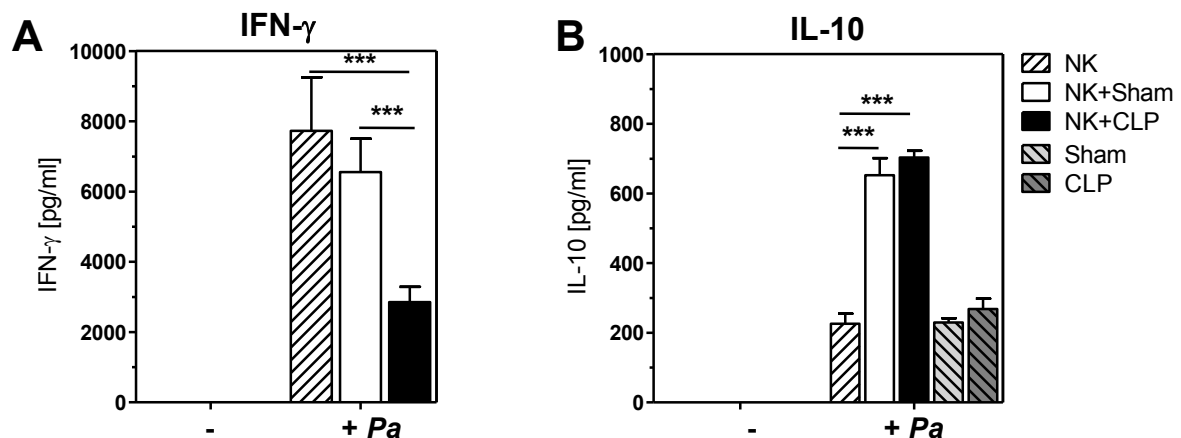


Abbildung 4.33 **Zytokin-Produktion von *in vitro* stimulierten NK-Zellen in Co-Kultur mit BMDC.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- und CLP-operierten Mäuse generiert. Für die Co-Kultur wurden 1×10^5 NK-Zellen aus naiven BALB/c allein (hell-schraffierte Balken) oder zusammen mit $0,125 \times 10^5$ der Sham-BMDC (offene Balken) und der CLP-BMDC (schwarze Balken) für 18 - 22 h in An- oder Abwesenheit von 5×10^6 UV-inaktivierten *P. aeruginosa* (*Pa*) kultiviert. Auch Sham-BMDC (hell-grau-schraffierte Balken) oder CLP-BMDC (dunkel-grau-schraffierte Balken) ohne Zugabe von NK-Zellen wurden kultiviert. Die Kultur erfolgte in Quadruplikaten in einem Volumen von 150 μ l in 96well-Rundbodenplatten unter Zugabe von 3 ng mL^{-1} rmlL-2. Die Überstände der Zellkultur wurden mittels ELISA auf (A) IFN- γ und (B) IL-10 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment. Die Unterschiede zwischen den NK-Zellen, sowie den NK-Zellen zusammen mit den BMDC der CLP- und Sham-Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt durch *** $p < 0,001$.

Ob die verminderte IFN- γ -Produktion durch die naiven NK-Zellen nach Kultivierung mit den CLP-BMDC Zellkontakt-abhängig war, wurde durch Experimente überprüft, bei denen die BMDC und die NK-Zellen durch den Einsatz von Membranen räumlich voneinander getrennt kultiviert wurden. Hierbei war lediglich der Austausch von löslichen Mediatoren zwischen den beiden Zell-Populationen möglich.

Wie bereits beschrieben, wurde auch in diesem Versuchsansatz bei einer direkten Kultur der naiven NK-Zellen zusammen mit den BMDC aus den CLP-Tieren die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen nach *P. aeruginosa*-Stimulation gehemmt. Nach räumlicher Trennung der NK-Zellen von den CLP-BMDC durch den Einsatz von *transwells* konnte diese verminderte Produktion von IFN- γ nicht mehr beobachtet werden (s. Abbildung 4.34 A). Bezüglich der Produktion von IL-10 durch die NK-Zellen und die BMDC der beiden Versuchsgruppen konnten nach Einsatz der *transwells* keine Unterschiede im Vergleich zur direkten Co-Kultivierung beobachtet werden (s. Abbildung 4.34 B).

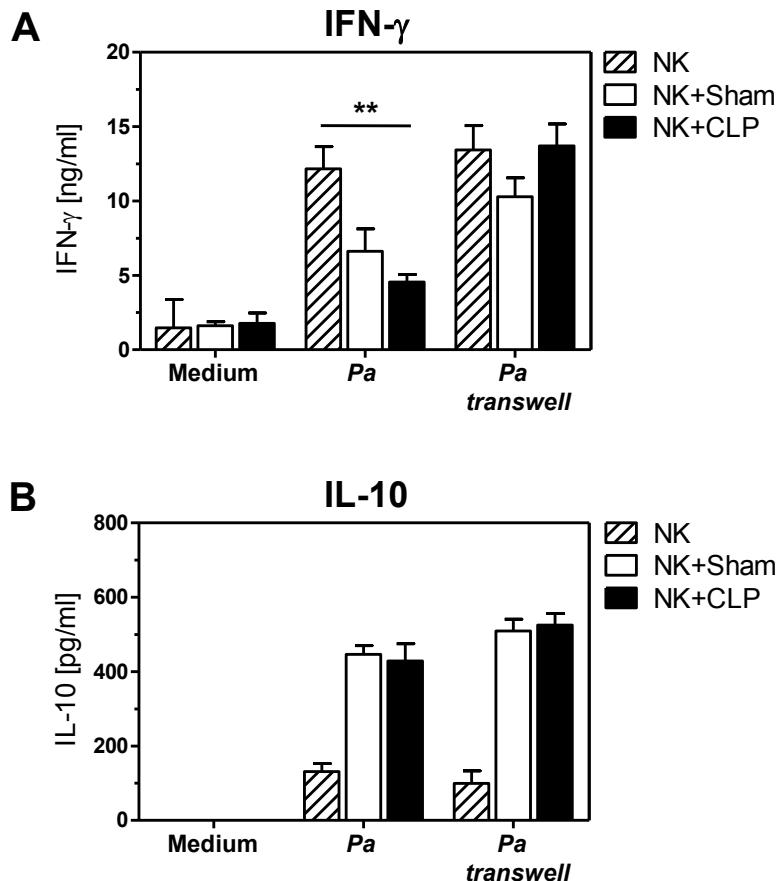


Abbildung 4.34 **Zellkontakt-abhängige Zytokin-Produktion von *in vitro* stimulierten NK-Zellen in Co-Kultur mit BMDC.** Vier Tage nach Induktion einer Sepsis wurden die BMDC der Sham- und CLP-operierten Mäuse generiert. Für die Co-Kultur wurden 1×10^5 NK-Zellen aus naiven BALB/c allein (schraffierte Balken) oder zusammen mit 1×10^5 der Sham-BMDC (offene Balken) und der CLP-BMDC (schwarze Balken) für 18 - 22 h in An- oder Abwesenheit von $2,5 \times 10^6$ UV-inaktivierten *P. aeruginosa* (*Pa*) kultiviert. Die Kultur erfolgte in Triplikaten mit oder ohne *transwell*-Einsätze in *96well*-Rundbodenplatten unter Zugabe von 3 ng mL^{-1} rIL-2. BMDC befanden sich in den *transwell*-Einsätzen und die NK-Zellen in der Rundbodenplatte. Die *Pa*-Stimulation erfolgte sowohl in die Einsätze, als auch direkt in die Rundbodenplatten-Vertiefungen. Die Überstände wurden mittels ELISA auf (A) IFN- γ und (B) IL-10 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des „one-way ANOVA Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt durch ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend für die *in vitro* Co-Kultur von naiven NK-Zellen und BMDC lässt sich demnach feststellen, dass die BMDC aus den septischen Versuchstieren die IFN- γ -Produktion naiver NK-Zellen hemmen konnten. Die Vermittlung der Hemmung war dabei vom direkten Zellkontakt der NK-Zellen und der CLP-BMDC abhängig. Welche Oberflächenmoleküle an der Vermittlung der Hemmung beteiligt waren, konnte nicht festgestellt werden. Die durchflusszytometrische Charakterisierung der NK-Zellen und der BMDC nach Co-Kultur zeigte bezüglich der Expression der NK-Zell-Rezeptoren NKG2D (aktivierender Rezeptor) und NKG2A (inhibierender Rezeptor) und der entsprechenden Liganden auf den BMDC (RAE-1 bzw. Qa-1) keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Dendritische Zellen spielen als äußerst effektive Antigen-präsentierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunität gegen eindringende Pathogene. Durch die Präsentation von Antigenen an die Zellen des adaptiven Immunsystems induzieren DC nicht nur primäre Immunantworten, sondern sie können auch die Immunantwort in Richtung eines pro- oder anti-inflammatorischen Phänotyps lenken, und damit das angeborene und adaptive Immunsystem koordinieren. Die Anwesenheit funktionell intakter DC ist essentiell für eine wirksame Immunantwort und das Überleben während einer polymikrobiellen Sepsis [14, 148]. Jedoch kann die während einer schweren Sepsis auftretende Dysfunktion von DC zur Entwicklung einer Immunsuppression führen, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für sekundäre Infektionen einhergeht. Die Dysfunktion der DC aus der Milz umfasst den Verlust der Fähigkeit, das TH1-fördernde Zytokin IL-12 zu sezernieren bei gleichzeitig gesteigerter Sekretion von IL-10 und verstärkter Expression costimulatorischer CD40 und CD86 Moleküle [55]. Auch ein Verlust von DC in der Milz und anderen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen wird während Sepsis beobachtet [6, 49, 69]. Die Entwicklung solcher DC-Dysfunktionen könnte möglicherweise einen generellen Pathomechanismus bei systemischen Infektionen darstellen und für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Sekundärinfektionen nach Überstehen einer Sepsis verantwortlich sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Dysfunktion von DC und die Entwicklung einer Immunsuppression während Sepsis durch eine veränderte Differenzierung von DC aus dem Knochenmark vermittelt wird.

5.1 DC und Immunsuppression während Sepsis

Zur Untersuchung der Differenzierung von DC während einer Sepsis wurde das CLP-Modell verwendet. Es ist bekannt, dass Versuchstiere bereits kurz nach Induktion einer Sepsis durch CLP eine Dysfunktion von DC entwickeln, die auch noch lange Zeit nach Überstehen der primären Infektion bestehen bleibt. Die Dysfunktion von DC ist dabei charakterisiert durch eine verminderte Fähigkeit der DC IL-12 zu produzieren und damit eine protektive TH1-Immunantwort zu vermitteln [55, 182]. Weiterhin sind dysfunktionale DC nach Sepsis an der Entstehung einer lang-anhaltenden Immunsuppression beteiligt, die durch eine erhöhte Anfälligkeit für sekundäre bakterielle oder Pilz-Infektionen, wie z. B. eine Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* oder *Aspergillus fumigatus*, gekennzeichnet ist [13, 127].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Modell einer subletalen Sepsis zeigte, dass 4 Tage nach der Sepsis-Induktion, wenn die Versuchstiere die akute Phase der Sepsis überstanden hatten und keine Anzeichen einer Krankheit mehr zeigten, eine Immunsuppression vorlag. Diese äußerte sich durch eine erhöhte Anfälligkeit der septischen

Tiere für *P. aeruginosa*, die sich durch eine höhere bakterielle Beladung der Lungen auszeichnete (s. Abbildung 4.2 A). Eine erhöhte Sterblichkeit der septischen Versuchstiere, wie sie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte [112], wurde nicht beobachtet, da mit 2×10^8 CFU eine relativ geringe Menge an Bakterien i.n. appliziert wurde. Die gesteigerte bakterielle Beladung der Lungen mit den *P. aeruginosa* nach Sepsis war verbunden mit einer verminderten Anzahl an T- und NK-Zellen (s. Abbildung 4.1) und einer geringeren IFN- γ Produktion in den Lungen (s. Abbildung 4.2). Dass die NK-Zellen eine Quelle von IFN- γ waren, konnte durch intrazelluläre Färbungen belegt werden (s. Abbildung 4.4). Ob der Verlust von NK-Zellen und/oder die verminderte IFN- γ Produktion die Ursache für eine erhöhte Infekt-Anfälligkeit war, konnte nicht geklärt werden. Studien belegen jedoch, dass die Aktivierung von NK-Zellen über NKG2D während *P. aeruginosa* Infektion zu einer besseren bakteriellen Beseitigung und einer effizienteren Phagozytose der Bakterien in den Lungen der infizierten Tiere und damit einem besseren Überleben der Versuchstiere führt. Gleichzeitig stellten die NK-Zellen in diesem Versuchsansatz die primäre Quelle von IFN- γ dar [184]. Die Blockade des aktivierenden NKG2D Rezeptors auf NK-Zellen mittels Antikörpern während *P. aeruginosa* Infektion resultierte dementsprechend in einer inhibierten Eliminierung der *P. aeruginosa*, verbunden mit einer verminderten TNF- α und IFN- γ Freisetzung in den Lungen der infizierten Tiere [20, 184]. Auch eine generelle Neutralisierung von IFN- γ induziert eine deutlich verschlechterte Beseitigung von *P. aeruginosa* in der Lunge [112]. In welcher Weise IFN- γ die Immunantwort bei *P. aeruginosa* Infektion moduliert, ist dabei unklar. Alveolar-Makrophagen zeigen eine starke Phagozytose-Aktivität und können reaktive Sauerstoffspezies, sowie TNF- α produzieren [59]. Ihre Aktivierung kann durch IFN- γ in Kombination mit bakterieller Stimulation erfolgen [38]. So wird angenommen, dass bei Fehlen von IFN- γ die Funktion der Alveolar-Makrophagen und Epithelzellen in der Lunge inhibiert wird [20]. Dass Alveolar-Makrophagen eine Rolle bei der *P. aeruginosa* Infektion nach Sepsis spielen, wird unterstützt durch Beobachtungen, dass Alveolar-Makrophagen aus CLP-Tieren eine reduzierte Fähigkeit zur Aufnahme und Elimination von *P. aeruginosa ex vivo* besitzen [160]. Eine Auswirkung der Reduktion von IFN- γ auf Alveolar-Makrophagen in der Lunge nach Sepsis könnte auch in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sein und zur verminderten Infektabwehr in der Lunge beitragen.

Wie bereits erwähnt, sind auch neutrophile Granulozyten für die Beseitigung von *P. aeruginosa* in der Lunge essentiell, denn Mäuse mit einer Neutropenie sterben schon nach sehr geringer Dosis von *P. aeruginosa* (10 – 100 CFU) an den Folgen der Lungeninfektion [83]. Eine Neutropenie in den Lungen der CLP-Mäuse wurde 4 Tage nach der Sepsis-Induktion nicht beobachtet (s. Abbildung 4.1). Somit konnte eine Reduktion der Anzahl von Granulozyten in den hier durchgeführten Versuchen nicht der erhöhten

bakteriellen Beladung der Lunge zugrunde liegen. Auch nach der zusätzlichen *P. aeruginosa* Infektion waren die CLP-Mäuse im Vergleich zur Sham-Gruppe in der Lage, weitere Granulozyten in die Lungen zu rekrutieren (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden keine Hinweise für eine gestörte Funktion der Granulozyten in septischen Tieren in Form einer verminderten Fähigkeit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies gefunden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Funktion von neutrophilen Granulozyten in der Lunge besteht darin, die Produktion von IL-10 [93], vermutlich durch Alveolar-Makrophagen [91, 121], zu induzieren. Als Mechanismus wird hier vermutet, dass ähnlich wie bei Knochenmark-generierten Makrophagen beobachtet, IL-10 nach der Phagozytose von apoptotischen Granulozyten, produziert wird [95]. Dieser Mechanismus könnte hier eine Rolle spielen, da sowohl in den Lungenzellen, als auch in den Lungenhomogenisaten nach Sepsis erhöhte Mengen an IL-10 gemessen wurden (s. Abbildung 4.2 und 4.3), wurde jedoch nicht näher betrachtet.

Die stärkste Auffälligkeit der CLP-Tiere nach *P. aeruginosa* Infektion lag im veränderten Zytokinmuster der Lungen. Die Lungenhomogenisate der *P. aeruginosa* infizierten CLP-Mäuse enthielten große Mengen an IL-10, während die IL-12-, IL-6-, TNF- α - und IFN- γ -Level im Vergleich zur Sham-Gruppe verringert waren (s. Abbildung 4.2). Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie, in der septische Mäuse mit *P. aeruginosa* infiziert worden waren, und das Lungen-Zytokinprofil eine hohe IL-10 Menge bei gleichzeitiger Reduktion des IL-12-Levels aufwies [160]. Aufgereinigte DC aus der Lunge von septischen Mäusen sezernierten nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten wenig IL-12 und TNF- α , jedoch mehr IL-10 [14]. Für IFN- γ wurde beschrieben, dass die Menge im Plasma nach Sepsis und *P. aeruginosa* Infektion im Vergleich zur Sham-Gruppe stark vermindert ist [112]. Das veränderte Zytokinprofil in der Lunge von septischen Tieren lässt darauf schließen, dass es nach Sepsis zur Dysbalance des pro- und anti-inflammatorischen Gleichgewichts in der Lunge kommt, welche gekennzeichnet ist durch eine Reduktion der Inflammation.

Der genaue Mechanismus, der einer erhöhten Infektanfälligkeit von septischen Tieren für *P. aeruginosa* oder andere Lungeninfektionen zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Wie bereits beschrieben, sind die Auswirkungen einer Sepsis vielfältig. Im hier angewendeten Modell der subletalen Sepsis entwickeln NK-Zellen einen Funktionsverlust, der durch die reduzierte IFN- γ Produktion gekennzeichnet ist, und der sich auf Alveolar-Makrophagen und die Eliminierung von *P. aeruginosa* auswirken könnte. Granulozyten in der Lunge scheinen bezüglich der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nicht beeinträchtigt zu sein.

Das veränderte Zytokinprofil in der Lunge zeigte eine Reduktion von IFN- γ , welches den NK-Zellen zugeordnet werden konnte. NK-Zellen sind bekannt dafür mit DC zu interagieren,

wobei das von DC produzierte IL-12 die IFN- γ Sekretion der NK-Zellen bedingt [173]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass auch die BMDC aus den septischen Tieren die Produktion von IFN- γ der NK-Zellen *in vitro* supprimieren konnten (s. Abbildung 4.33). Möglicherweise sind auch DC in der Lunge nach Sepsis durch eine verminderte IL-12-Sekretion an der reduzierten IFN- γ Freisetzung der NK-Zellen beteiligt. Ein Hinweis dafür ist zum einen die Reduktion von IL-12p70 in den Lungenhomogenisaten aus den CLP-Tieren (s. Abbildung 4.2) und Befunde über DC aus Lungen von septischen Tieren, die nach Stimulation mit bakteriellen Komponenten weniger IL-12 produzierten [14].

Eine direkte Dysfunktion von DC in der Lunge konnte mit den hier durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden, da eine intrazelluläre Färbung von IL-12 nicht durchführbar war und DC nicht aufgereinigt wurden. Die reduzierten Mengen an IL-12p70 (s. Abbildung 4.7) in den Lungenzell-Kulturen und in den Lungenhomogenisaten (s. Abbildung 4.2) der septischen Tiere deutete jedoch auf einen Einfluss der Sepsis auf die Lungen-DC hin, könnten aber auch auf die verminderte Anzahl von DC in der Lunge zurückzuführen sein (s. Abbildung 4.5). Ob die Immunsuppression, die in den durchgeführten Versuchen beobachtet werden konnte, auch auf dysfunktionale DC zurückzuführen war, konnte demnach nicht geklärt werden. Ein positiver Einfluss von funktionell intakten DC während einer Sekundärinfektion nach Sepsis wurde aber von PENE et al. und BENJAMIM et al. anhand eines Lungeninfektionsmodells mit *P. aeruginosa* bzw. *Aspergillus* beschrieben. Hier führte eine gleichzeitige i.n. Gabe von BMDC aus gesunden Mäusen zu einer deutlich geringeren Mortalität der septischen Tiere nach sekundärer Infektion [14, 127].

Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise DC in der Lunge nach Sepsis moduliert sind, weniger IL-12 produzieren und damit die IFN- γ Produktion der NK-Zellen hemmen. Ein zusätzliches Indiz für eine bestehende Dysfunktion von DC in der Lunge nach Sepsis sind die bekannten Funktionsverluste von DC aus der Milz septischer Tiere, die im Folgenden untersucht wurden.

Im Gegensatz zur Lunge sind die DC in der Milz von septischen Mäusen bereits gut charakterisiert worden. Durch Experimente in der eigenen Arbeitsgruppe konnte für eine schwere Sepsis gezeigt werden, dass Milz-DC in der frühen Phase der Sepsis eine Dysfunktion entwickeln. Diese ist charakterisiert durch eine verminderte Fähigkeit zur IL-12 Produktion bei gleichzeitig erhöhter IL-10 Sekretion trotz starker Expression der costimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach bakterieller Stimulation [55]. Hinweise auf solch eine DC-Dysfunktion wurden auch von anderen beschrieben [14, 46]. Im Verlauf der Sepsis kommt es zusätzlich zu einem Verlust von DC, vor allem der CD4⁺CD8⁻ Population, in der Milz und anderen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen [6, 49, 55, 69].

Die Reduktion der Zellzahl und der damit verbundene Verlust der CD4⁺ DC, sowie die veränderte Zytokinproduktion wurde auch noch 4 Tage nach Induktion der subletalen Sepsis beobachtet (s. Abbildung 4.7 und 4.8). Es ist bekannt, dass die Halbwertszeit aller DC-Populationen in der Milz von Mäusen bei 1,5 bis 2,9 Tagen liegt [79]. Dies lässt vermuten, dass sich 4 Tage nach Induktion der Sepsis nicht mehr dieselben DC in der Milz befanden wie zum Zeitpunkt der Sepsis-Induktion, und dass daher auch die neu gebildeten DC eine Dysfunktion entwickelt hatten. Da DC im Knochenmark kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen und dann über die Blutbahn die Milz besiedeln [10], bestand die Vermutung, dass schon die Vorläufer der DC im Knochenmark während einer Sepsis verändert sind und die stark reduzierte Zahl an DC in den Milzen der septischen Versuchstiere könnte durch eine eingeschränkte Fähigkeit des Knochenmarks zur Generierung von DC erklärt werden. Experimente der eigenen Arbeitsgruppe konnten durch die Applikation von BrdU (Bromo-deoxy-Uridin) während Sepsis zeigen, dass *de novo*-generierte DC sowohl in den Milzen der Sham- als auch der CLP-Mäuse in gleichem Maße erschienen. Bei BrdU handelt es sich um eine Base, die während der Replikation in DNA eingebaut wird und sich teilende Zellen sichtbar machen kann. Vier Tage nach Sepsis enthielten die Milzen der septischen Mäuse einen höheren Anteil an BrdU⁺ DC als die Milzen der Sham-Mäuse. Da die absolute Zahl an DC in den Milzen der septischen Tiere im Vergleich zur Sham-Gruppe jedoch verringert war, entsprach die absolute Zahl an BrdU⁺ DC in etwa der der Sham-Mäuse. Die Neubildung von DC war demnach unverändert, jedoch beeinflusste die Sepsis die Verteilung der DC-Subpopulationen. Hierfür konnte mittels BrdU gezeigt werden, dass weniger der neu-gebildeten DC der CD4⁺ DC-Population angehörten [125]. Auch die durchgeführten *in vitro* Versuche bestätigten die unbeeinflusste Fähigkeit des Knochenmarks zur Generierung neuer DC während Sepsis, da nach 7-tägiger Kultur der Knochenmarkszellen mit GM-CSF kein Unterschied im prozentualen Anteil der DC an allen kultivierten Zellen zwischen septischen Versuchstieren und Sham-Tieren zu beobachten war (s. Abbildung 4.13). Weiterhin war der Differenzierungszustand bei den aus dem Knochenmark von septischen Tieren generierten DC nicht eingeschränkt (s. Abbildung 4.14). Demnach war das Potential des Knochenmarks zur Generierung und Differenzierung von DC während einer subletalen Sepsis nicht beeinträchtigt. Dieser Befund wird unterstützt durch Beobachtungen über Monozyten aus dem Blut von Patienten mit Peritonitis, die bei der *in vitro* Kultivierung schneller DC generierten als Monozyten, die aus gesunden Spendern gewonnen worden waren [52]. Dass trotz der intakten Fähigkeit des Knochenmarks aus septischen Tieren, DC zu bilden, die Zahl der DC in der Milz reduziert war, deutete so auf einen kontinuierlichen Verlust von „alten“ DC hin. Die reduzierte Zahl neu-generierter CD4⁺ DC ließ eine gestörte Ausbildung von bestimmten DC-Populationen vermuten.

Der Verlust von DC während Sepsis wird häufig Apoptose zugeschrieben [7, 46]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass viele Apoptose-Nachweis-Verfahren für Phagozyten, wie DC oder Makrophagen ein falsch positives Ergebnis liefern können, da auch durch Phagozytose aufgenommene apoptotische Zellen innerhalb der Phagozyten detektiert werden [107]. Mittels eines Maus-Modells, bei dem anti-apoptotisch wirkende Proteine der Bcl-2 Familie auf MHC Klasse I⁺ Zellen überexprimiert wurden, konnte ein Rückgang von DC in der Milz nach CLP-Induktion verhindert werden. Im Einklang damit führte die Defizienz des pro-apoptotisch wirksamen Bim-Moleküls im Maus-Modell der Sepsis auch zum Rückgang des DC-Verlusts [126], so dass der Verlust von DC während Sepsis trotz allem auf Apoptose hindeutet. Apoptose von DC in der Milz konnte durch Experimente der eigenen Arbeitsgruppe jedoch nicht nachgewiesen werden.

Als Ursache für die Dysfunktion von neu-generierten DC während Sepsis in der Milz ist eine Veränderung der Progenitoren von DC denkbar. Die DC, die die Milzen nach einer Sepsis besiedeln, können nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch von endogenen, sich selbst-erneuernden Progenitoren in der Milz stammen. Langzeit-Kulturen von Stroma-abhängigen Milzzellen zeigten, dass diese *in vitro* für lange Zeit (mehrere Jahre) eine Quelle für DC darstellen [120]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das lokale Zytokin-Milieu einen Einfluss auf die Differenzierung von DC besitzt. Der Kontakt mit Stromazellen und TGF- β fördert die Differenzierung von regulatorischen DC, die die T-Zell-Proliferation supprimieren konnten [195].

Versuche zur Rolle von Vorläuferzellen von DC in der Milz und dem lokalen Zytokin-Milieu der Milz wurden hier jedoch nicht untersucht. Außerdem wiesen auch die DC, die aus dem Knochenmark der septischen Mäuse unabhängig von jeglichen endogenen Faktoren generiert worden waren, eine veränderte Funktion bezüglich der T-Zell-Aktivierung auf (s. Abschnitt 4.5). Diese Beobachtung spricht gegen den alleinigen Einfluss des lokalen Zytokin-Milieus auf die Entwicklung der Dysfunktion von DC in der Milz während einer Sepsis.

5.2 Mögliche Ursachen für die Modulation der Vorläuferzellen von DC im Knochenmark

Für die anhaltende Dysfunktion der DC in der Milz ist eine chronische Ursache zu suchen, die entweder bei den aus dem Knochenmark neu gebildeten DC liegt oder bei den sich selbst erneuernden Progenitoren der DC in der Milz. Die Ergebnisse der *in vitro* Generierung von DC aus dem Knochenmark zeigten, dass nach CpG-Stimulation und OVA-Beladung die DC aus dem Knochenmark von septischen Tieren vermehrt IL-10 sezernierten und in ihrer Fähigkeit zur Polarisierung von T-Helferzellen in Richtung T_H1 gehemmt waren. Damit

wiesen sie einen ähnlichen Phänotyp auf wie DC in den Milzen von septischen Tieren. Die Faktoren, die die Generierung von DC aus dem Knochenmark beeinflussen, sind weitgehend unbekannt.

Die Gegenwart von LPS während ihrer Differenzierung aus dem Knochenmark führt zu DC, die nur geringe Mengen an MHC Klasse II Molekülen exprimieren und die Anergie von T-Zellen induzieren [99]. Durch die Verwendung des *Limulus Amebocyte Lysate Assay*, ein Test, der LPS-Mengen von bis zu 10^{-13} g detektieren kann, wurde schon bei früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen, dass das Knochenmark nach Sepsis detektierbare Mengen an LPS enthält. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass Endotoxine während der Generierung der BMDC für die Dysfunktion der CLP-BMDC verantwortlich sind. DC, die *in vitro* in der Anwesenheit von IL-10 reifen, besitzen *in vivo* eine verminderte Kapazität, eine TH1-Antwort zu induzieren, so dass es zur Ausbildung von T-Helferzellen des Typs 2 kommt [40]. Unter Zugabe von IL-10 kultivierte DC zeigen weiterhin eine reduzierte Fähigkeit zur Reifung, die mit einer Inhibition der Expression costimulatorischer Moleküle, wie CD86, verbunden ist [159]. Die aus dem Knochenmark von septischen Tieren differenzierten DC zeigten zum Teil ähnliche Eigenschaften (reduzierte Fähigkeit zur Polarisierung von TH1-Zellen, s. Abbildung 4.21) wie die in Gegenwart von IL-10 kultivierten DC. Jedoch konnte eine Verschiebung der Polarisation der T-Helferzellen in Richtung TH2 durch die DC aus dem septischen Knochenmark nicht beobachtet werden, da die TH2-typischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 oder IL-13 [149] in den Kulturen der restimulierten Lymphknotenzellen nicht detektiert werden konnten. Da außerdem die Überstände der Knochenmarkszellen von septischen Tieren kein IL-10 (frühere Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe) enthielten, ist es unwahrscheinlich, dass IL-10 für die Entwicklung der Dysfunktion der DC verantwortlich ist.

Eine weitere Möglichkeit der Modulation von Vorläuferzellen der DC im Knochenmark während Sepsis besteht durch den Einfluss von IFN- γ . Die Generierung von DC aus dem Knochenmark und die Reifung *in vitro* sind bei IFN- γ *knockout* (-/-) Mäusen nicht beeinflusst, die Produktion von IL-12 durch die BMDC aus diesen Mäusen ist jedoch nach Stimulation der Zellen mit LPS im Vergleich zu BMDC aus Wildtyp-Mäusen erhöht. Weiterhin besitzen die BMDC der IFN- γ -/- Mäuse eine erhöhte Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen [190]. IFN- γ besitzt demnach eine negative Funktion bei der Differenzierung von DC aus dem Knochenmark. Diese regulatorische Aktivität von IFN- γ im Knochenmark ist in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich, da nach Sepsis Lymphozyten im Knochenmark reduziert waren (s. Abbildung 4.12) und daher die mögliche Quelle von IFN- γ gering war.

Für die Infektion mit dem Parasiten *Leishmania donovani*, welche in der Milz und im Knochenmark persistieren, wurde gezeigt, dass die durch Stroma-Zellen produzierten Chemokine CXCL12 und CCL8 hämatopoetische Progenitoren anlocken, die in

regulatorische DC differenzieren können [116]. In eigenen Versuchen wurden aus naivem Knochenmark in der Anwesenheit von Überständen aus Knochenmarkkulturen von septischen Mäusen BMDC generiert. Diese naiven BMDC zeigten in Bezug auf ihr Zytokinprofil und die Polarisierung von T_H1-Helferzellen keine Störungen, so dass der Einfluss löslicher Komponenten (wie IFN- γ oder Chemokine) auf die Differenzierung von DC im Knochenmark nach Sepsis nicht von Bedeutung zu sein scheint.

Das Stroma-Gewebe des Knochenmarks besteht aus einem Netzwerk hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese. *In vivo* existieren viele verschiedene Subtypen von DC (u. a. konventionelle DC, plasmazytoide DC, Langerhans Zellen). Diese gehen alle aus einem allgemeinen DC Vorläufer (CDP, s. Abbildung 1.3) im Knochenmark hervor und weisen eine einheitliche Morphologie und den CD11c⁺-Phänotyp auf. So geht man davon aus, dass das lokale Milieu der DC (Mikroumgebung), z. B. in der Milz, in der Haut oder im Thymus, und nicht Zell-intrinsische Faktoren für die Expression charakteristischer Marker und Funktionen der DC verantwortlich sind. Dabei kann die DC-Mikroumgebung aus Stroma-Zellen, Wachstumsfaktoren, extrazellulärer Matrix und Signalmolekülen (Zytokinen) bestehen [42, 43]. Nach Infektionen oder Stammzelltransplantation fördern T-Helferzellen die Hämatopoese von myeloiden Zellen, insbesondere der neutrophilen Granulozyten. Mäuse, denen die T-Zellen fehlen, weisen eine reduzierte Zahl von Neutrophilen in der Peripherie auf. Ein adoptiver Transfer von CD4⁺ T-Zellen kann die Granulozytenzahl wieder herstellen. Weiterhin stellen CD4⁺ Zellen im Knochenmark eine Quelle für IFN- γ und IL-4 dar [106]. Neben Granulozyten ist auch die Zahl von Langerhans Zellen (DC in der Epidermis), im Vergleich zu Wildtyp Tieren bei T-Zell-defizienten Mäusen reduziert [153]. Dadurch, dass IFN- γ sich auf die Differenzierung von DC im Knochenmark auswirkt [190], könnte die T-Zell-Defizienz einen indirekten Einfluss auf die DC-Entwicklung besitzen. Die Untersuchung des Knochenmarks als Ursprung der DC zeigte, dass die induzierte Sepsis zu einer Reduktion der Zellzahl, und insbesondere zur einer signifikanten Verminderung der Anzahl von CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und DC führte (s. Abbildung 4.11 und 4.12). Die reduzierte Zahl an T-Zellen im Knochenmark der septischen Tiere könnte daher an der hier beschriebenen Modulation der Generierung und Differenzierung von DC während einer Sepsis beteiligt sein. Aus eigenen Arbeiten ist bekannt, dass die Depletion von CD11c⁺ DC aus dem Knochenmark von Sham-Mäusen vor der Generierung von BMDC zu einer Ausreifung von DC führte, die im Gegensatz zu den undepletierten Sham-BMDC eine gesteigerte Produktion von IL-10 und eine reduzierte Fähigkeit zur Polarisierung von T_H1-Zellen aufzeigten. Damit induzierte die CD11c⁺-Depletion einen ähnlichen BMDC-Phänotyp wie die Sepsis-Induktion. Möglicherweise beeinflussen residierende DC im Knochenmark die *de novo*-Differenzierung

von DC und der während Sepsis beobachtete Rückgang an CD11c⁺ DC im Knochenmark (s. Abbildung 4.11) könnte an der Ausbildung einer Dysfunktion von DC beteiligt sein [125].

Wie von anderen Arbeiten bekannt, könnten auch epigenetische Modifizierungen, zu denen DNA-Methylierungen, Histon-Modifikationen oder Chromatin-Remodelierungen gezählt werden, für die Langzeit-Genexpressionsmuster und damit auch für die Dysfunktionen von DC nach einer schweren Sepsis verantwortlich sein. Das veränderte Methylierungsmuster am Promotor des IL-12-Gens führte nach CLP-Induktion bei DC aus der Milz zu einer verringerten IL-12 Expression [183].

Inwieweit B-Zellen oder NK-Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung von DC haben, ist nicht bekannt. Teil weiterer Forschung bleibt demnach die Suche nach zusätzlichen unbekanntem löslichen oder zellulären Faktoren, sowie Zellkontakt-abhängigen oder unabhängigen Signalwegen, die die Differenzierung von dysfunktionalen DC während Sepsis begünstigen. Insgesamt muss das Knochenmark-Mikromilieu noch näher charakterisiert werden, um das Zusammenspiel aller Faktoren genau zu verstehen.

5.3 Dysfunktion aus dem Knochenmark differenzierter DC während Sepsis

Die Dysfunktion der DC, die aus dem Knochenmark der septischen Versuchstiere generiert worden waren, ähnelte der Dysfunktion der Milz-DC nach Sepsis. Die veränderte Funktion von CLP-BMDC bestand, trotz identischer Kulturbedingungen mit den Sham-BMDC, in einer stark erhöhten IL-10-Sekretion (s. Abbildung 4.16, 4.19 und 4.20), einer verstärkten Fähigkeit zur Suppression von NK-Zellen (s. Abbildung 4.33) und einer verminderten Fähigkeit zur Polarisierung von T-Helferzellen in Richtung T_H1 *in vivo* (s. Abbildung 4.21 und 4.22). Im Gegensatz zu den Milz-DC waren die BMDC aus den septischen Tieren jedoch nach bakterieller Stimulation nicht in ihrer Fähigkeit, IL-12 zu produzieren, gestört.

Die Beobachtung, dass BMDC aus septischen Mäusen mehr als doppelt so viel IL-10 produzierten bei leicht erhöhter IL-12 Produktion (s. Abbildung 4.16 und 4.19) und einer unveränderten Fähigkeit zur MHC Klasse II (s. Abbildung 4.18) und CD40/CD86 Expression (s. Abbildung 4.17) nach bakterieller Stimulation steht im Kontrast zu anderen Studien. PENE et al. berichteten, dass BMDC von septischen Mäusen im Vergleich zu Sham-BMDC nur wenig MHC Klasse II und costimulatorische Moleküle exprimierten, weniger IL-12 produzierten, und dass die IL-10 Sekretion nicht verändert war [127]. Als Ursache für diese abweichenden Beobachtungen kann die Benutzung eines anderen Mausstamms (C57BL/6 anstelle von BALB/c) ausgeschlossen werden, da eigene Versuche mit C57BL/6 Mäusen nach CLP auch BMDC hervorbrachten, die eine erhöhte IL-10 Produktion zeigten (Daten nicht gezeigt). Die von PENE et al. angewendeten Kulturbedingungen wiesen jedoch

deutliche Unterschiede zu dem bei dieser Arbeit verwendeten Protokoll auf, so dass hierdurch der abweichende BMDC-Phänotyp erklärt werden könnte.

Die verminderte Fähigkeit der CLP-BMDC zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen *in vivo* zeigte sich durch die deutlich geringere Sezernierung des TH1-assoziierten Zytokins IFN- γ durch die restimulierten Lymphknotenzellen (s. Abbildung 4.21). Eine Verschiebung der TH-Zell-Antwort in Richtung TH2 konnte nicht beobachtet werden, da die TH2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 nicht vermehrt durch von CLP-BMDC *in vivo* aktivierten T-Helferzellen sezerniert wurden. Anergie TH-Zellen, welche nach TCR-Stimulation in Abwesenheit eines costimulatorischen Signals generiert werden, zudem wenig IL-2 produzieren und nicht in der Lage sind zu proliferieren [76, 80], konnten auch nicht detektiert werden, da eine Fähigkeit zur IL-2 Produktion der *in vivo* aktivierten Antigen-spezifischen T-Zellen vorhanden war (s. Abbildung 4.21). Das Fehlen von IL-10 im Überstand der restimulierten Lymphknotenzellen wies darauf hin, dass die CLP-BMDC *in vivo* auch nicht die Polarisierung von bestimmten regulatorischen T-Zellen (Treg oder iTreg) begünstigten. Bis auf eine stark erhöhte IL-10 Freisetzung nach bakterieller Stimulation und gleichzeitigem CD40L-Kontakt, welcher die Bindung von T-Zellen *in vitro* simulieren kann, zeigten die BMDC aus septischen Tieren keinen Unterschied in ihrem Phänotyp im Vergleich zu den Sham-BMDC. Wichtige Faktoren für die T-Zell-Aktivierung, wie die Antigenaufnahme (s. Abbildung 4.19), die Expression von MHC Klasse II (s. Abbildung 4.18) und costimulatorischen Molekülen (s. Abbildung 4.17), die Migration in den drainierenden Lymphknoten (s. Abbildung 4.23) und die Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten (s. Abbildung 4.21 A) waren bei den CLP-BMDC in gleichem Maße ausgeprägt wie bei den Sham-BMDC. Auch die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den OVA-spezifischen T-Zellen wurde gleich stark durch die BMDC beider Versuchsgruppen induziert (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen kann zusätzlich von außen durch andere Zelltypen beeinflusst werden. Zu solchen Zellen mit regulatorischer Aktivität gehören CD8⁺ regulatorische T-Zellen, Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen [24, 92, 101, 166, 169]. In den Lymphknoten der naiven Mäuse, denen sowohl CD4⁺ OVA-spezifische T-Zellen, sowie Sham- oder CLP-BMDC injiziert worden waren, konnte jedoch kein Anhaltspunkt für die Expansion von Tregs gefunden werden. Dass Tregs nicht an der Suppression der T-Helferzellen durch die CLP-BMDC beteiligt waren, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die regulatorische Aktivität der Tregs aus den Lymphknoten nicht eingehend geprüft wurde. Trotz gleichbleibender Expansion hätte eine verstärkte Aktivität von Tregs vorliegen können.

Zusätzlich zeigten *in vitro* Kulturen von OVA-spezifischen T-Helferzellen und den BMDC aus den Sham- bzw. CLP-Mäusen, dass keine Suppression der T_H1 -Polarisierung, gekennzeichnet durch eine reduzierte $IFN-\gamma$ Produktion, durch die CLP-BMDC vorlag (Daten nicht gezeigt). So wird vermutet, dass *in vivo* dennoch weitere Zellen an der Suppression der T-Helferzell-Antwort durch die CLP-BMDC beteiligt waren.

Dass generell Antigen-präsentierende Zellen, nach Kontakt zu den applizierten BMDC, in den Lymphknoten die Suppression einer T_H1 -Antwort in der Restimulation vermitteln, konnte ausgeschlossen werden. Auch die aufgereinigten $CD4^+$ T-Zellen (mit einer Reinheit von 98 - 99 % nach MACS) aus den CLP-BMDC injizierten Mäusen produzierten, unabhängig von Antigen-präsentierenden Zellen, nach $\alpha CD3/ \alpha CD28$ -Stimulation weniger $IFN-\gamma$ als die $CD4^+$ T-Zellen aus der Sham-Gruppe. (s. Abbildung 4.22). Im Gegensatz zur Restimulation der Lymphknoten produzierten die isolierten $CD4^+$ T-Zellen der Mäuse, denen CLP-BMDC appliziert worden waren, auch weniger IL-2 als die T-Zellen aus den Lymphknoten der Mäuse, denen Sham-BMDC gespritzt worden waren (s. Abbildung 4.22). Die Sezernierung von IL-2 scheint damit durch die Antigen-präsentierenden Zellen beeinflusst zu werden.

In Abwesenheit bzw. nach Inaktivierung der NK-Zellen *in vivo* induzierten die CLP-BMDC und Sham-BMDC gleichermaßen eine T_H1 -Antwort, zu erkennen an der gesteigerten $IFN-\gamma$ Produktion (s. Abbildung 4.27). Auch bei Applikation der Sham-BMDC in Kombination mit der NK-Zell-Depletion wurde eine erhöhte $IFN-\gamma$ Produktion der Antigen-spezifischen T-Zellen nach Restimulation festgestellt. So wird angenommen, dass NK-Zellen generell die DC-vermittelte Aktivierung von T-Zellen beeinflussten und speziell an der Suppression der T-Helferzellen durch CLP-BMDC beteiligt waren.

Ein Indiz dafür, dass NK-Zellen eine Rolle bei der Induktion der T-Helferzell-Antwort im Lymphknoten spielen, könnte die leicht erhöhte Zahl der NK-Zellen in den Lymphknoten nach s.c. Applikation der BMDC sein. Noch 7 Tage nach der Applikation der BMDC enthielten die Lymphknoten im Durchschnitt mehr als 1 % NK-Zellen, während Lymphknoten naiver unbehandelter Mäuse durchschnittlich weniger als 0,6 bis 0,9 % NK-Zellen aufwiesen (s. Abbildung 4.25). Diese Beobachtung stimmt mit Berichten überein, bei denen LPS-aktivierte BMDC s.c. in naive Mäuse appliziert wurden. Dabei kam es zu einer Rekrutierung von bis zu 3 % endogenen NK-Zellen in die Lymphknoten schon 12 h nach der Applikation von BMDC [103]. Ein Unterschied im NK-Zell-Anteil in den Lymphknoten wurde in der vorliegenden Arbeit nach Applikation von CLP- oder Sham-BMDC nicht beobachtet. Dies ist, zusammen mit den Ergebnissen aus den Versuchen zur NK-Zell-Depletion ein Hinweis dafür, dass nicht der Anteil an NK-Zellen, sondern die Funktion der NK-Zellen für die CLP-BMDC vermittelte Hemmung der T_H1 -Polarisierung entscheidend ist.

NK-Zellen sind bekannt dafür, dass sie über einen sogenannten „*cross-talk*“ in engem Kontakt zu DC stehen. So können aktivierte NK-Zellen die Reifung von DC über die Freisetzung von TNF- α , IFN- γ und den Zell-Kontakt über Nkp30 auf den NK-Zellen induzieren. Während unreife DC der Lyse durch NK-Zellen ausgesetzt sind, führt die Reifung der DC zu einem Schutz. Aktivierte reife DC wiederum induzieren über die Sekretion von IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- α/β die Proliferation, das zytotoxische Potential und die IFN- γ Produktion der NK-Zellen [180]. Im CLP-Modell und anderen Modellen der bakteriellen Infektion konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen einen schädlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf besitzen. Die Depletion von NK-Zellen vor CLP mittels anti asialo GM1 Antikörpern senkte die Mortalität der Mäuse [151]. NK-Zellen wandern während der CLP-induzierten Sepsis aus dem Blut und der Milz in das entzündete Peritoneum und verstärken dort die Hyperinflammation, indem sie Peritoneal-Makrophagen und Gr-1⁺ myeloide Zellen aktivieren [51]. Für eine *Escherichia coli* induzierte Peritonitis konnte den NK-Zellen eine Beteiligung an der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und der Mortalität nachgewiesen werden, da beide Parameter durch die NK-Zell-Depletion reduziert werden konnten [8]. Welche Funktion NK-Zellen bei einer Infektion zukommt, hängt demnach maßgeblich vom Erreger der Infektion, aber auch vom Stadium der Infektion ab. In der Frühphase der polymikrobiellen Sepsis scheinen sich NK-Zellen über die Verstärkung der pro-inflammatorischen Antwort nachteilig auszuwirken, während in einer späteren Phase NK-Zellen eine regulatorische Funktion (möglicherweise über den Kontakt mit DC) erlangen und dabei ungünstig die Immunabwehr beeinflussen. Untersuchungen stellen bei systemischen Infektionen von Mäusen mit *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* und *Yersinia pestis* keine Verstärkung der pro-inflammatorischen Antwort, sondern eine regulatorische Funktion von NK-Zellen fest. Hierbei produzierten NK-Zellen nach Aktivierung über IL-12, welches durch DC sezerniert worden war, anti-inflammatorisch wirksames IL-10, welches dann wieder die IL-12 Produktion von DC inhibierte [129]. Eine regulatorische Funktion von NK-Zellen könnte auch bei den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten von Bedeutung sein. Sowohl die aus den Sham- als auch aus den CLP-Mäusen generierten BMDC waren *in vitro* in der Lage nach bakterieller Stimulation IL-12 zu produzieren (s. Abbildung 4.16). In weiteren, hier nicht gezeigten Versuchen, wurde nach CFSE-Markierung und s.c Applikation der BMDC in naive Mäuse eine verminderte IL-12p40 Produktion der CLP-BMDC im Vergleich zu den Sham-BMDC in den Lymphknoten beobachtet [125]. Dies lässt vermuten, dass die BMDC in den Lymphknoten weitere Signale, vermutlich von NK-Zellen, erhalten hatten. In wieweit sich das von den CLP-BMDC vermehrt produzierte IL-10 auf die NK-Zellen *in vivo* auswirkt, konnte hier nicht weiter geklärt werden.

Die Wirkung der bei der Interaktion mit NK-Zellen von den DC sezernierten Zytokine auf die NK-Zellen wird dabei noch kontrovers diskutiert. Murine regulatorische DC sezernieren als Antwort auf die Stimulierung mit LPS mehr IL-10 und weniger IL-12p70 als unreife DC. Dies führt zu einer Inhibierung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bei einer Antigen-spezifischen T-Helferzell-Aktivierung. Die Aktivierung der NK-Zellen wird durch das von den regulatorischen DC sezernierte IL-10 vermittelt [133]. Gestützt werden diese Befunde durch die Beobachtungen, dass exogenes IL-10 die IFN- γ -Level von murinen NK-Zellen erhöht, wenn die NK-Zellen gleichzeitig mit IL-12 und IL-18 kultiviert werden [152]. In einem Maus-Modell der septischen Peritonitis wurde dagegen beobachtet, dass IL-10 supprimierend auf die NK-Zell-Aktivität wirkt, denn die gleichzeitige Behandlung mit anti-IL-10 Antikörpern während der Sepsis-Induktion führte zu einer stärkeren Aktivierung und höheren IFN- γ Produktion, verbunden mit einer erhöhten Mortalität [147]. Durch diese Versuche wird deutlich, dass NK-Zellen während der frühen Phase einer Sepsis eine Hyperinflammation vermitteln und ihre Hemmung (durch IL-10) protektiv ist. Dies steht in Analogie zu den Studien zu NK-Zellen, die bei einer Depletion der NK-Zellen während der Sepsis eine verminderte Mortalität erkennen [151]. Für die Aktivierung der NK-Zellen durch dysfunktionale DC in einer späteren Phase der adaptiven Immunität konnten nur Indizien gefunden werden.

Um die Rolle von IL-10 weiter zu untersuchen, wurde mittels Antikörpern das IL-10 in den naiven Mäusen gleichzeitig mit der s.c. Applikation von BMDC *in vivo* neutralisiert. Im Vergleich zur Behandlung mit Isotyp-Antikörper resultierte die IL-10-Antikörper-Applikation in einer erhöhten IFN- γ Produktion durch die restimulierten Lymphknotenzellen der Mäuse, denen die CLP-BMDC injiziert worden waren (s. Abbildung 4.24). Betrachtet man die Wirkung des α IL-10 zusammen mit der Auswirkung der NK-Zell-Depletion im *in vivo* Modell der T-Helferzell-Aktivierung, so sieht man, dass bei Entfernung beider Faktoren die CLP-BMDC vermittelte Suppression der TH1-Polarisierung aufgehoben werden kann. Möglicherweise wirkt IL-10 supprimierend auf NK-Zellen, so dass die NK-Zellen weniger IFN- γ produzieren. Durch NK-Zellen produziertes IFN- γ kann wiederum das *Priming* von TH1-Zellen im Lymphknoten vermitteln [103]. Ob jedoch das IL-10 direkt von den CLP-BMDC im Lymphknoten produziert wird und zu einer Suppression der TH1-Polarisierung führt, oder modulierend auf die NK-Zellen wirkt, konnte mit Neutralisierung des IL-10 nicht ermittelt werden, da auch andere Zelltypen IL-10 bilden können. Hierzu zählen u. a. NK-Zellen [129].

Die Wirkung der CLP-BMDC konnte nicht nur auf die T-Helferzell-Polarisierung, sondern auch auf das angeborene Immunsystem verdeutlicht werden. Der gleichzeitige i.n. Transfer von BMDC, die aus dem Knochenmark septischer Mäuse gereift waren, zusammen mit *P. aeruginosa* in naive Mäuse reichte aus, um einen Immunstatus der infizierten Mäuse zu

induzieren, der ähnlich dem der septischen Tiere nach *P. aeruginosa* war. Der negative Effekt auf die Immunantwort der infizierten Mäuse nach CLP-BMDC Applikation zeigte sich an der höheren bakteriellen Beladung der Lungen aus den Mäusen, die *P. aeruginosa* und CLP-BMDC erhalten hatten im Vergleich zu naiven Mäusen, denen Sham-BMDC zusammen mit *P. aeruginosa* appliziert worden waren (s. Abbildung 4.30). Dieser Unterschied zwischen der bakteriellen Beladung in den Lungen der Sham- und CLP-BMDC-applizierten Mäuse konnte nicht auf eine unterschiedliche Anzahl an BMDC in den Lungen zurückgeführt werden (s. Abbildung 4.29). Verbunden mit der höheren bakteriellen Beladung zeigten die Lungen der naiven *P. aeruginosa* infizierten Mäuse bei CLP-BMDC Applikation auch eine verminderte IL-12 und IFN- γ Produktion (s. Abbildung 4.30). Weiterhin wurde festgestellt, dass Sham-BMDC nicht zu einer verbesserten Bekämpfung der Bakterien in den Lungen beitragen (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen wird, dass die CLP-BMDC aktiv die Beseitigung von *P. aeruginosa* verschlechterten. NK-Zellen und Granulozyten besitzen eine zentrale Funktion bei der Eliminierung von *P. aeruginosa* in der Lunge [83, 184]. Die reduzierte Elimination der Bakterien ließ sich nicht auf einen Einfluss der CLP-BMDC auf die Rekrutierung der Granulozyten oder NK-Zellen in die Lungen der infizierten Mäuse zurückführen, da sich die Zahl an NK-Zellen und Granulozyten in den Lungen der Mäuse, denen Sham- oder CLP-BMDC appliziert worden waren, nicht signifikant unterschieden (s. Abbildung 4.31). Wie bereits erwähnt, entstammt das nach *P. aeruginosa* Infektion sezernierte IFN- γ den NK-Zellen. Hierbei widersprechen sich die Ergebnisse der gemessenen IFN- γ -Mengen in den Lungenhomogenisaten und die Zytokinwerte aus der Kultur der Lungenzellen nach *P. aeruginosa* Infektion. Während die Applikation von CLP-BMDC nach *P. aeruginosa* Infektion *in vivo* zu einer Reduktion des IFN- γ in den Lungenhomogenisaten führte, produzierten die Lungenzellen der CLP-BMDC applizierten naiven Mäuse nach *P. aeruginosa* Infektion *in vitro* gleichviel IFN- γ im Vergleich zu den Lungenzellen aus den Sham-BMDC injizierten Mäusen (s. Abbildung 4.32). Dass diese verminderte IFN- γ Produktion durch die Lungenzellen *in vitro* nicht beobachtet werden konnte, könnte den Versuchsbedingungen zugeschrieben werden, die der *in vivo* Situation nicht vollständig entsprachen. Möglicherweise bestehen in der Lunge während der *P. aeruginosa* Infektion *in vivo* essentielle Zellkontakte, die in einer *ex vivo* Kultur der Lungenzellen zerstört werden. Eine weitere Abweichung in den Bedingungen der Lungenzellkulturen bestand im Zeitpunkt der Lungenentnahme nach Infektion. Während die Lungenhomogenisate, bei denen eine Verminderung der IFN- γ Produktion beobachtet werden konnte, 24 h nach Infektion hergestellt wurden, erfolgte die Lungenentnahme zur Zellgewinnung schon 4 h nach der Infektion. So könnte der Zeitpunkt zu früh gewesen sein, um eine CLP-BMDC vermittelte Suppression der IFN- γ Produktion zu messen. Es könnte in

weiteren Versuchen überprüft werden, ob auch 24 h nach *P. aeruginosa* Infektion in einer Kultur von Lungenzellen durch CLP-BMDC eine Modulation der IFN- γ Freisetzung stattfindet. Hierdurch könnte ein Einfluss von BMDC auf NK-Zellen *in vivo* gezeigt werden.

In der *in vitro* Kultur der CLP-BMDC mit naiven NK-Zellen unter *P. aeruginosa* Stimulation dagegen produzierten die NK-Zellen weniger IFN- γ im Vergleich zur Co-Kultur von NK-Zellen mit Sham-BMDC (s. Abbildung 4.33). Möglicherweise wurde diese Hemmung der IFN- γ Produktion der NK-Zellen durch das von CLP-BMDC produzierte IL-10 vermittelt. Die Co-Kultur von NK-Zellen und BMDC zeigte jedoch keine Unterschiede in der IL-10 Produktion zwischen den beiden Versuchsgruppen (s. Abbildung 4.33). Da eine intrazelluläre Färbung von IL-10 nicht möglich war, konnte die Quelle von IL-10 in der Co-Kultur aus NK-Zellen und BMDC nicht ermittelt werden. Dass neben löslichen Mediatoren aber Zell-Kontakt-abhängige Signale an der Suppression der NK-Zellen durch die CLP-BMDC *in vitro* beteiligt waren, zeigte die wiederhergestellte IFN- γ Produktion der NK-Zellen unter Verwendung von *transwell*-Einsätzen in der Zellkultur (s. Abbildung 4.34). Eine Beteiligung spezifischer aktivierender bzw. inhibierender Rezeptoren, wie NKG2D oder NKG2A, auf den NK-Zellen, oder deren Liganden RAE-1 bzw. Qa-1 auf den BMDC, an der Interaktion von NK-Zellen und BMDC konnte nicht nachgewiesen werden. Sowohl die durchflusszytometrische Analyse der Lymphknotenzellen aus den *in vivo* Versuchen, als auch die der *in vitro* Co-Kulturen zeigte keinen Unterschied in Bezug auf die Expression der oben beschriebenen Oberflächenmoleküle zwischen den Zellen der beiden Versuchsgruppen. Daher bleibt die Identität der für die durch CLP-BMDC vermittelte Hemmung der NK-Zellen verantwortlichen Zellkontakte unbekannt.

Die Versuche zur T-Helferzell-Aktivierung *in vivo* und zur *P. aeruginosa* Infektion konnten eine Dysfunktion der DC, die aus dem Knochenmark der septischen Mäuse generiert worden waren, zeigen. Der Transfer von CLP-BMDC vermittelte eine Suppression des angeborenen Immunsystems, die zu einer erhöhten Anfälligkeit naiver Mäuse für *P. aeruginosa* führte. Auch das adaptive Immunsystem konnte durch CLP-BMDC moduliert werden, indem die Polarisierung der T-Helferzellen in Richtung T_H1 in Abhängigkeit von IL-10 und NK-Zellen inhibiert wurde.

6 Zusammenfassung

Sepsis ist verbunden mit der Entwicklung einer Immunsuppression und Organdysfunktion, die zu Multiorganversagen und dem Tod der Patienten führen kann. Die Komplikationen bei septischen Patienten umfassen eine Persistenz der Primärinfektion und eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen. Dendritische Zellen, die äußerst potente Antigen-präsentierende Zellen darstellen, spielen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung einer T-Helferzell-Antwort, welche essentiell für die effektive Abwehr von bakteriellen Infektionen ist. Während einer akuten Sepsis entwickeln DC in der Milz eine Dysfunktion, die sich auszeichnet durch eine verminderte Fähigkeit das TH1-polarisierende Zytokin IL-12 zu produzieren und so eine protektive TH1-Zell Antwort zu induzieren, während die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels CLP-Modell, welches über die Freisetzung von Bakterien nach Ligation und Punktion des Darms eine Sepsis in Mäusen induziert, untersucht, ob eine fehlerhafte Differenzierung von DC aus dem Knochenmark die Dysfunktion von DC vermittelt und so die Entwicklung einer Immunsuppression während Sepsis begünstigt. Vier Tage nach Induktion einer subletalen Sepsis, wenn die Mäuse keine Anzeichen einer Erkrankung mehr zeigten, bestand eine anhaltende Immunsuppression der Mäuse, charakterisiert durch eine erhöhte Anfälligkeit für *P. aeruginosa* in Kombination mit einem veränderten Lungen-Zytokin-Profil. Die DC aus der Milz zeigten eine Dysfunktion, die sich in einer verminderten IL-12 Produktion bei gleichzeitig erhöhter IL-10 Expression äußerte. BMDC, differenziert aus dem Knochenmark von septischen Versuchstieren, sezernierten nach Stimulation mit bakteriellen Komponenten vermehrt IL-10 und hemmten eine Polarisierung von TH1-Zellen *in vivo*. In Abwesenheit von IL-10 oder NK-Zellen *in vivo* konnte eine TH1-Hemmung vermindert werden. *In vitro* zeigten die DC aus dem Knochenmark septischer Tiere eine Suppression der IFN- γ Produktion von naiven NK-Zellen. Adoptiver Transfer von DC aus septischen Tieren vermittelte weiterhin eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas* in naiven Tieren.

Eine subletale Sepsis induziert demnach eine abweichende Differenzierung von DC aus dem Knochenmark, eventuell vermittelt durch eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks. So entstehen dysfunktionale DC, die lymphoide und nicht-lymphoide Organe besiedeln, eine protektive TH1-Antwort hemmen, und eine Immunsuppression vermitteln können. Eine effektive Immunabwehr während und nach einer Sepsis wird verhindert. Strategien, die zur Aufhebung der Dysfunktionen von DC während einer Sepsis führen, könnten daher Patienten nach Überleben einer Sepsis vor tödlichen Sekundärinfektionen schützen.

7 Literaturverzeichnis

1. Agrawal S, Tripathi P, Naik S (2008) Roles and mechanism of natural killer cells in clinical and experimental transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 4:79-91
2. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511
3. Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA (2004) Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526
4. Assarsson E, Kambayashi T, Schatzle JD, Cramer SO, von Bonin A, Jensen PE, Ljunggren HG, Chambers BJ (2004) NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 173:174-180
5. Ayala A, Deol ZK, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH (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* 56:579-585
6. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH (1996) Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 87:4261-4275
7. Ayala A, Urbanich MA, Herdon CD, Chaudry IH (1996) Is sepsis-induced apoptosis associated with macrophage dysfunction? *J Trauma* 40:568-573; discussion 573-564
8. Badgwell B, Parihar R, Magro C, Dierksheide J, Russo T, Carson WE, 3rd (2002) Natural killer cells contribute to the lethality of a murine model of *Escherichia coli* infection. *Surgery* 132:205-212
9. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252
10. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811
11. Beaulieu LM, Freedman JE (2010) The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res* 125:205-209
12. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL (2003) Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 163:2605-2617
13. Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL (2004) The chronic consequences of severe sepsis. *J Leukoc Biol* 75:408-412
14. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL (2005) Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 105:3588-3595
15. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480
16. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK (2004) Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 200:79-87
17. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19:652-657
18. Bone RC (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115:457-469
19. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997) Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112:235-243

20. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, Young L, Lau GW (2006) The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74:2578-2586
21. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO (2006) Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166
22. Capron A, Dessaint JP, Capron M, Joseph M, Torpier G (1982) Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol Rev* 61:41-66
23. Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K, Zappacosta S (1999) Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29:4022-4029
24. Carreno BM, Collins M (2002) The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:29-53
25. Casey LC, Balk RA, Bone RC (1993) Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119:771-778
26. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272
27. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184:747-752
28. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787
29. Chambers BJ, Ljunggren HG (2010) Unique features of NK cell development during ontogeny revealed in studies of RAG-1-deficient mice. *Immunol Cell Biol* 88:105-106
30. Chang SH, Dong C (2007) A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 17:435-440
31. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886
32. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80:2012-2020
33. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3:413-425
34. Cooper EH, Ward AM (1979) Acute phase reactant proteins as aids to monitoring disease. *Invest Cell Pathol* 2:293-301
35. Cooper MD, Alder MN (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124:815-822
36. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H (2000) T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 165:4848-4853
37. Cumberbatch M, Kimber I (1995) Tumour necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 84:31-35

38. Cunha FQ, Assreuy J, Moncada S, Liew FY (1993) Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology* 79:408-411
39. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635
40. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27:1229-1235
41. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, O'Malley KA, Wynn JL, Antonenko S, Al-Quran SZ, Swan R, Chung CS, Atkinson MA, Ramphal R, Gabrilovich DI, Reeves WH, Ayala A, Phillips J, Laface D, Heyworth PG, Clare-Salzler M, Moldawer LL (2007) MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204:1463-1474
42. Despars G, O'Neill HC (2006) Splenic endothelial cell lines support development of dendritic cells from bone marrow. *Stem Cells* 24:1496-1504
43. Despars G, Tan J, Periasamy P, O'Neill HC (2007) The role of stroma in hematopoiesis and dendritic cell development. *Curr Stem Cell Res Ther* 2:23-29
44. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188:373-386
45. Dimasi N, Moretta L, Biassoni R (2004) Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res* 30:95-104
46. Ding Y, Chung CS, Newton S, Chen Y, Carlton S, Albina JE, Ayala A (2004) Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* 22:137-144
47. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC (2007) Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315:107-111
48. Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel DN (2001) Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect Immun* 69:7271-7276
49. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, Hotchkiss R, Clare-Salzler M, Moldawer LL (2004) Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 173:3035-3043
50. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33:606-618
51. Etogo AO, Nunez J, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER (2008) NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J Immunol* 180:6334-6345
52. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A (2007) Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 147:426-439

53. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351
54. Flanders SA, Collard HR, Saint S (2006) Nosocomial pneumonia: state of the science. *Am J Infect Control* 34:84-93
55. Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohe S, Schade FU (2006) Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol* 79:473-481
56. Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P (1998) CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* 188:297-304
57. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336
58. Frank MM, Fries LF (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12:322-326
59. Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, Steinmuller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L (1996) Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 157:3097-3104
60. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P (2008) Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol* 180:6941-6946
61. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661
62. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333
63. Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930
64. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1045-1056
65. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H (1999) Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* 163:583-589
66. Hayakawa Y, Smyth MJ (2006) CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 176:1517-1524
67. Henry CB, Duling BR (2000) TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2815-2823
68. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952-6963
69. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168:2493-2500

70. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15:496-497
71. Ishizaka T, Ishizaka K (1984) Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. *Prog Allergy* 34:188-235
72. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995
73. Jakubzick C, Tacke F, Llodra J, van Rooijen N, Randolph GJ (2006) Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 176:3578-3584
74. Janeway CA (2005) *Immunobiology : the immune system in health and disease ; [CD-ROM inside ; animations, videos and figures from the book]*, 6. edn. Garland Science, New York [u.a.]
75. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
76. Jenkins MK, Schwartz RH (1987) Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165:302-319
77. Jiang HR, Muckersie E, Robertson M, Xu H, Liversidge J, Forrester JV (2002) Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture. *J Leukoc Biol* 72:978-985
78. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML (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. *J Immunol* 161:2804-2809
79. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K (2000) The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 165:6762-6770
80. Kang SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, Lenardo MJ (1992) Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257:1134-1138
81. Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993
82. Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T (1980) A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 10:175-180
83. Koh AY, Priebe GP, Ray C, Van Rooijen N, Pier GB (2009) Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 77:5300-5310
84. Kolls JK, Linden A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-476
85. Konig R, Huang LY, Germain RN (1992) MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356:796-798
86. Kucia M, Reza R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005) Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 19:1118-1127
87. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274
88. Lever A, Mackenzie I (2007) Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *Bmj* 335:879-883

89. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31:1250-1256
90. Li Q, Zhang Z, Chen X, Wang B, Zhou Z, Yan L, Jiang J (2003) [The change of cryptdin-4 mRNA expression in the intestine of mouse with experimental pancreatitis]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 34:92-94
91. Lim S, Caramori G, Tomita K, Jazrawi E, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM (2004) Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 59:505-514
92. Liu W, Huber SA (2011) Cross-talk between cd1d-restricted nkt cells and gammadelta cells in t regulatory cell response. *Virol J* 8:32
93. Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, Gregory S, Biffl W, Ayala A (2006) Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L51-58
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
95. Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A (2003) Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol* 171:2610-2615
96. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26:503-517
97. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C (2009) Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 15:352-358
98. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223:77-92
99. Lutz MB, Kukutsch NA, Menges M, Rossner S, Schuler G (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* 30:1048-1052
100. Mackay CR, Marston WL, Dudler L (1990) Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 171:801-817
101. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P (2003) Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171:2366-2373
102. Martignoni A, Tschop J, Goetzman HS, Choi LG, Reid MD, Johannigman JA, Lentsch AB, Caldwell CC (2008) CD4-expressing cells are early mediators of the innate immune system during sepsis. *Shock* 29:591-597
103. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265
104. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826
105. Mikhak Z, Farsidjani A, Luster AD (2009) Endotoxin augmented antigen-induced Th1 cell trafficking amplifies airway neutrophilic inflammation. *J Immunol* 182:7946-7956

106. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A (2005) Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood* 105:1484-1491
107. Moraes TJ, Downey GP (2006) Death of the septic monocyte: is more better? *Crit Care* 10:146
108. Moreland JG, Bailey G, Nauseef WM, Weiss JP (2004) Organism-specific neutrophil-endothelial cell interactions in response to *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 172:426-432
109. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-223
110. Moser M, Murphy KM (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1:199-205
111. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, Unsinger J, Dunne WM, Hotchkiss RS (2006) Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock* 26:565-570
112. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS (2010) Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun* 78:1582-1592
113. Muller U, Vogel P, Alber G, Schaub GA (2008) The innate immune system of mammals and insects. *Contrib Microbiol* 15:21-44
114. Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944
115. Newman KC, Riley EM (2007) Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7:279-291
116. Nguyen Hoang AT, Liu H, Juarez J, Aziz N, Kaye PM, Svensson M (2010) Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. *J Immunol* 185:2360-2371
117. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A (1992) A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6550-6554
118. O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Scott B, Hertzog P, Tatarczuch L, Shortman K (2003) Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* 101:1453-1459
119. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH (2006) T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7:507-516
120. O'Neill HC, Ni K, Wilson H (1999) Long-term stroma-dependent cultures are a consistent source of immunostimulatory dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 77:434-441
121. Oltmanns U, Schmidt B, Hoernig S, Witt C, John M (2003) Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Res* 29:315-328
122. Ouellette AJ (2004) Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:405-419
123. Parish CR (1999) Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77:499-508

124. Parnes JR (1989) Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 44:265-311
125. Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, Rani M, Agrawal H, Schade FU, Zhang Y, Flohe SB (2011) Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 186:977-986
126. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, McDonough JS, Perlman H, McDunn JE, Hotchkiss RS (2009) Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages. *Shock* 31:359-366
127. Pene F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, Tazi A, Mira JP, Chiche JD (2008) Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol* 181:8513-8520
128. Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP (1995) Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *Jama* 274:338-345
129. Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, Karp CL, Johnson LL, Smiley ST, Mohrs M (2009) Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 6:503-512
130. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195:335-341
131. Picker LJ (1993) Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues. *Am Rev Respir Dis* 148:S47-54
132. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V (1999) Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *Int Immunol* 11:1519-1526
133. Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, Xu H, Cao X (2006) TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood* 108:2307-2315
134. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN (1997) Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *Jama* 277:1058-1063
135. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S (2008) Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 26:293-316
136. Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE, Locksley RM (2006) T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr Opin Immunol* 18:271-277
137. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776-787
138. Rodriguez S, Chora A, Goumnerov B, Mumaw C, Goebel WS, Fernandez L, Baydoun H, HogenEsch H, Dombkowski DM, Karlewicz CA, Rice S, Rahme LG, Carlesso N (2009) Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood* 114:4064-4076
139. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK (2001) Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68-79
140. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST (1999) Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162:2472-2475

141. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (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. *J Exp Med* 182:389-400
142. Sato Y, Van Eeden SF, English D, Hogg JC (1998) Pulmonary sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from bone marrow in bacteremic infection. *Am J Physiol* 275:L255-261
143. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203
144. Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K (1992) Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 154:253-264
145. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN (2002) Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196:1079-1090
146. Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 148:3433-3440
147. Scott MJ, Hoth JJ, Turina M, Woods DR, Cheadle WG (2006) Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine* 33:79-86
148. Scumpia PO, McAuliffe PF, O'Malley KA, Ungaro R, Uchida T, Matsumoto T, Remick DG, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL, Efron PA (2005) CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 175:3282-3286
149. Seder RA, Paul WE (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-673
150. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A (2005) NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106:609-616
151. Sherwood ER, Enoh VT, Murphey ED, Lin CY (2004) Mice depleted of CD8+ T and NK cells are resistant to injury caused by cecal ligation and puncture. *Lab Invest* 84:1655-1665
152. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, Justice JP, Van Scott MR, Myrvik QN, Metzger WJ (1998) Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol* 161:4283-4288
153. Shreedhar V, Moodycliffe AM, Ullrich SE, Bucana C, Kripke ML, Flores-Romo L (1999) Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity* 11:625-636
154. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837
155. Silva MT (2010) Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol* 87:805-813
156. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510

157. Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, Dudziak D, Nussenzweig MC, Steinman RM (2007) A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* 204:1095-1106
158. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28:2045-2054
159. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772-4780
160. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ (1999) IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 162:392-399
161. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162
162. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296
163. Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, Xu M, Reinhardt RL, Scheu S, Kelly BL, Locksley RM (2004) Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol* 83:163-189
164. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31:318-324
165. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457:557-561
166. Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM (2008) Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Hum Immunol* 69:781-789
167. Takeuchi M, Kosiewicz MM, Alard P, Streilein JW (1997) On the mechanisms by which transforming growth factor-beta 2 alters antigen-presenting abilities of macrophages on T cell activation. *Eur J Immunol* 27:1648-1656
168. Tateda K, Moore TA, Deng JC, Newstead MW, Zeng X, Matsukawa A, Swanson MS, Yamaguchi K, Standiford TJ (2001) Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of Legionella pneumophila pneumonia. *J Immunol* 166:3355-3361
169. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296
170. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664
171. Trinchieri G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376
172. Trinchieri G (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin Immunol* 7:83-88
173. Trinchieri G (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13:251-276

174. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T (2002) Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 169:2026-2033
175. van Berkel ME, Oosterwegel MA (2006) CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett* 105:115-122
176. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A (2005) NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106:566-571
177. Vivier E, Nunes JA, Vely F (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306:1517-1519
178. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K (2000) CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164:2978-2986
179. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL (1996) Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 64:4733-4738
180. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258
181. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821-852
182. Wen H, Hogaboam CM, Gauldie J, Kunkel SL (2006) Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *Am J Pathol* 168:1940-1950
183. Wen H, Schaller MA, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL (2008) Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity: the role for epigenetic changes. *J Leukoc Biol* 83:439-446
184. Wesselkamper SC, Eppert BL, Motz GT, Lau GW, Hassett DJ, Borchers MT (2008) NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J Immunol* 181:5481-5489
185. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189-201
186. Willmann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1998) The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28:2025-2034
187. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM (2007) Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 282:13447-13455
188. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C (2007) IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 4:269-275
189. Wu L, Dakic A (2004) Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* 1:112-118
190. Wu X, Hou W, Sun S, Bi E, Wang Y, Shi M, Zang J, Dong C, Sun B (2006) Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *J Immunol* 177:934-943

191. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T (2005) Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 163:24-30
192. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T (2001) Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 69:698-704
193. Yokoyama WM, Kim S, French AR (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22:405-429
194. Young JW, Steinman RM (1990) Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* 171:1315-1332
195. Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, Guo J, Huang X, Chen T, Wang J, Cao X (2004) Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5:1124-1133
196. Zhou LJ, Tedder TF (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2588-2592
197. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489
198. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL (2004) Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173:3716-3724
199. Zou W, Restifo NP (2010) T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10:248-256

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle

B

BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cell</i>
BrdU	Bromo-deoxy-Uridin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	zirka
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Lymphozytendifferenzierungsgruppe)
cDC	<i>conventional dendritic cell</i> (konventionelle/klassische Dendritische Zelle)
CDP	<i>common dendritic cell precursor</i>
CF	Carboxyfluorescein
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CFU	<i>colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRP	C-reaktives Protein
CTL	<i>cytotoxic T cell</i> (Zytotoxische T-Zelle)
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i> (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen)
Cy	Cyanin
Cy7/ Cy5.5	Cyaninfarbstoffe

D

DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i> (dendritische Zelle)
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>

E

EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalitis</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EU	<i>Endotoxin unit</i>

F

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
FL2-H	<i>rot fluoreszierender Farbkanal</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward-scattered</i> (Vorwärtsstreulicht)

G

G	Gauge
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-/ macrophage-colony-stimulating factor</i>

H

HEPES	<i>N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HRP	<i>Horseradish</i> (Meerrettich) Peroxidase
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> (hämatopoetische Stammzelle)

I

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>inducible co-stimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
INOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	intraperitoneal
iTreg	induzierbare T-regulatorische Zelle
i.v.	intravenös

K

KCl	Kaliumchlorid
KO	<i>knockout</i>

L

LP	<i>lymphoid progenitor</i> (lymphoide Vorläuferzelle)
lpDC	lamina propria Dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharid

M

MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
M-CSF	<i>Makrophage-Colony stimulating factor</i>
MDP	<i>monocyte/macrophages and DC precursors</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MODS	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
MOF	<i>Multi organ failure</i> (Multi-Organversagen)
MP	<i>myeloid progenitor</i> (myeloide Vorläuferzelle)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>

N

NaCl	Natriumchlorid
NKG	<i>natural killer group</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NO	Stickstoffmonoxid

O

OVA	Ovalbumin-Protein
-----	-------------------

P

PAMP	<i>pathogen</i> oder <i>pattern associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphat-buffered Saline</i>
PD	<i>programmed death</i>
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i> (plasmazytoide Dendritische Zelle)
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PECy7	<i>Phycoerythrin konjugiert mit Cy7</i>
PerCP	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein</i>
PerCPCy5.5	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein konjugiert mit Cy5.5</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGN	Peptidoglycan
PMT	<i>Photomultiplier</i>
pOVA	Ovalbumin-Peptid
PRR	<i>pathogen</i> oder <i>pattern recognition receptors</i>

R

RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RAE	<i>RNA export factor</i>
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur

S

s.	siehe
SAV	Streptavidin
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SLC	<i>secondary lymphoid chemokine</i>
s.c.	subkutan
SSC	<i>side-scattered</i> (Seitwärtsstreulicht)

T

Tbet	<i>T box expressed in T cells</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helferzelle
T _H 1/2	T-Helferzelle des Typs 1/2
TipDC	<i>TNF and iNOS-producing DC</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TSA	<i>tryptic soy agar</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>

TRAIL *TNF-related apoptosis inducing ligand*
Treg T-regulatorische Zelle
Tween-20 Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat

U

u. a. unter anderem
UV Ultraviolett

V

v/ v *by volume*
VLE *very low endotoxin*

Z

z. B. zum Beispiel
ZTL Zentrales Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI-(Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Das Gleichgewicht der inhibierenden und stimulierenden Signale der NK-Zellen entscheidet über die Interaktion mit Zielzellen	3
Abbildung 1.2 Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in Subpopulationen von T-Helferzellen	8
Abbildung 1.3 Differenzierung von Dendritischen Zellen in der Maus	10
Abbildung 1.4 Polarisierung von T-Helferzellen durch DC	13
Abbildung 1.5 Bidirektionaler „Cross-Talk“ zwischen NK-Zellen und DC	14
Abbildung 1.6 Das inflammatorische Sepsis-Netzwerk	17
Abbildung 3.1 Ablauf der CLP-Operation zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis	29
Abbildung 3.2 Prinzip der positiven Selektion mittels MACS[®]	36
Abbildung 3.3 Versuchsablauf zur Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	38
Abbildung 3.4 Versuchsablauf zur NK-Zell-Depletion bei Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung	39
Abbildung 3.5 Versuchsablauf zur IL-10-Neutralisierung bei Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	39
Abbildung 3.6 Prinzip der Durchflusszytometrie	41
Abbildung 3.7 Prinzip des Mechanismus der CFSE-Markierung von Zellen	43
Abbildung 3.8 Prinzip des Cytometric Bead Array	46
Abbildung 4.1 Zellzusammensetzung der Lungen nach Sepsis	49
Abbildung 4.2 Charakterisierung der Lungen nach sekundärer <i>P. aeruginosa</i> Infektion	50
Abbildung 4.3 Zytokinproduktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach <i>P. aeruginosa</i> Stimulation <i>in vitro</i>	51
Abbildung 4.4 Intrazelluläre IFN-γ Produktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach <i>P. aeruginosa</i> Stimulation <i>in vitro</i>	53
Abbildung 4.5 Zahl der DC in der Lunge während Sepsis	54
Abbildung 4.6 IL-12p70-Produktion der Lungenzellen von Sham- und CLP-Tieren nach <i>P. aeruginosa</i> Stimulation <i>in vitro</i>	55
Abbildung 4.7 Zahl und Phänotyp der DC in der Milz während Sepsis	56
Abbildung 4.8 Zytokinprofil der DC aus der Milz	57

Abbildung 4.9 IL-12-Sekretion und Expression costimulatorischer Moleküle der DC aus der Milz	58
Abbildung 4.10 Zahl der Knochenmarkzellen während Sepsis	59
Abbildung 4.11 DC im Knochenmark während Sepsis	60
Abbildung 4.12 Zellzusammensetzung des Knochenmarks während Sepsis	61
Abbildung 4.13 Entwicklung der Knochenmarkzellen in Kultur	63
Abbildung 4.14 Entwicklung der Differenzierung von DC in Kultur	64
Abbildung 4.15 Phänotyp der BMDC nach Kultivierung	65
Abbildung 4.16 Zytokinsekretion der BMDC als Antwort auf bakterielle Stimuli	66
Abbildung 4.17 Reifung der BMDC als Antwort auf bakterielle Stimulierung	67
Abbildung 4.18 Differenzierung der BMDC nach OVA-Beladung und CpG-Stimulation	68
Abbildung 4.19 OVA-Beladung der BMDC	69
Abbildung 4.20 Zytokin-Produktion der OVA-beladenen BMDC unter Einfluss von CD40L	70
Abbildung 4.21 Kapazität der BMDC zur Aktivierung von T-Helferzellen <i>in vivo</i>	72
Abbildung 4.22 Zytokin-Produktion von <i>in vivo</i> aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit von αCD3 und αCD28	73
Abbildung 4.23 Migration der BMDC nach s.c. Applikation	74
Abbildung 4.24 Zytokin-Expression nach Restimulation der Lymphknotenzellen aus den <i>in vivo</i> T-Zell Assays nach IL-10-Neutralisierung	75
Abbildung 4.25 Zellzusammensetzung der Lymphknoten nach s.c. Applikation von BMDC	77
Abbildung 4.26 NK-Zell-Depletion durch anti asialo Serum im Lymphknoten	78
Abbildung 4.27 Zytokin-Expression der Lymphknotenzellen aus den <i>in vivo</i> T-Zell Assays nach NK-Zell-Depletion	79
Abbildung 4.28 Zytokin-Produktion von <i>in vivo</i> aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit von αCD3 und αCD28	80
Abbildung 4.29 Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von CFSE-markierten BMDC	82
Abbildung 4.30 Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und <i>P. aeruginosa</i>	83
Abbildung 4.31 Zellzusammensetzung der Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und <i>P. aeruginosa</i>	84

Abbildung 4.32 Zytokinproduktion der Lungen naiver BALB/c nach i.n. Applikation von BMDC und <i>P. aeruginosa</i>	85
Abbildung 4.33 Zytokin-Produktion von <i>in vitro</i> stimulierten NK-Zellen in Co-Kultur mit BMDC	87
Abbildung 4.34 Zellkontakt-abhängige Zytokin-Produktion von <i>in vitro</i> stimulierten NK-Zellen in Co-Kultur mit BMDC	88

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte	23
Tabelle 2.2 Reagenzien, Zytokine und Stimuli	24
Tabelle 2.3 Puffer und Lösungen	25
Tabelle 2.4 Verwendete Standardtests	26
Tabelle 2.5 Antikörper	27

8.4 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.5 Lebenslauf

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

8.6 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Pathogenese der chronischen Immunsuppression durch eine fehlerhafte Differenzierung von dendritischen Zellen nach Sepsis“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Eva Pastille befürworte.

Essen, den _____

Stefanie B. Flohé

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche 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 _____

Eva Pastille

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche 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 _____

Eva Pastille